

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta



# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Září 2024

Doležalová Klára

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Klára Doležalová

# **STANOVENÍ MRAVENČANŮ VE VYBRANÝCH NÁPOJÍCH METODOU IONTOVÉ CHROMATOGRAFIE**

Determination of formate in selected beverages by the ion  
chromatography method

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Praha, 2024

## **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. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity

V Praze dne

Podpis

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se týkala optimalizace složení mobilní fáze pro stanovení mravenčanů a octanů v různých destilátech pomocí iontové chromatografie. Cílem této práce bylo identifikovat a zkvantifikovat přítomné anionty, přičemž byla věnována zvýšená pozornost právě mravenčanům a octanům. Pro vyhodnocení obsahu mravenčanů a octanů byla zvolena metoda externí kalibrace, konkrétně metoda kalibrační přímky. Tento typ způsobil velmi precizní a pravdivé stanovení koncentrace sledovaných aniontů. Dále byly v rámci validace analytické metody určeny hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro mravenčany a octany. Preciznost metody byla hodnocena opakovatelností měření, kdy byla prokázána stabilní hodnota při několikanásobných analýzách. Pravdivost metody byla vyjádřena výtěžností. Pro tento výzkum byl využit iontový chromatograf od firmy Metrohm, který mi poskytl spolehlivé a přesné výsledky. Optimalizace mobilní fáze vedla k vylepšení separace a detekce sledovaných aniontů, což umožnilo detailní analýzu složení studovaných destilátů.

**Klíčová slova:** iontová chromatografie, destiláty, mravenčany, octany, optimalizace, identifikace, mez detekce, mez stanovitelnosti

## **Abstract**

This bachelor thesis concerned the optimization of the mobile phase composition for the determination of formate and acetate in various distillates by ion chromatography. The aim of this work was to identify and quantify the anions present, with particular attention paid to formate and acetate. An external calibration method, namely the calibration line method, was chosen to evaluate the formate and acetate content. This type caused a very precise and true determination of the concentration of the anions of interest. Furthermore, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values for formate and acetate were determined as part of the validation of the analytical method. The precision of the method was evaluated by the repeatability of the measurements, where a stable value was demonstrated over multiple analyses. The trueness of the method was expressed as recovery. An ion chromatograph from Metrohm was used for this research and provided reliable and accurate results. Optimization of the mobile phase led to improved separation and detection

**Keywords:** ion chromatography, distillates, formate, acetate, optimization, limit of detection, limit of quantification, identification

## **Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce je optimalizovat složení mobilní fáze, a tím dosáhnout efektivního stanovení mravenčanů a octanů ve vybraných destilátech pomocí iontové chromatografie. Součástí cíle je identifikace přítomných aniontů a kvantifikace mravenčanů a octanů, a to za využití metody externí kalibrace. Práce si rovněž klade za cíl stanovit mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) pro analyzované anionty, a dále vyhodnotit preciznost metody prostřednictvím opakovatelnosti měření a pravdivosti metody vyjádřené jako výtěžnost. V rámci výzkumu bude použit iontový chromatograf od společnosti Metrohm.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce, paní RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za její neskutečnou trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi byly neuvěřitelně nápomocné nejen během laboratorního měření, ale také u písemného zpracování bakalářské práce.

Děkuji rovněž panu Ing. Jiřímu Balánovi za jeho pečlivé zaučení na iontovém chromatografu s firmou Metrohm, které mi umožnilo se s tímto přístrojem rychle seznámit a efektivně s ním pracovat pro potřeby mé práce.

# Obsah

1	Teoretická část.....	1
1.1	Iontová chromatografie .....	1
1.2	Princip iontové chromatografie .....	2
1.3	Stacionární fáze .....	4
1.4	Mobilní fáze .....	5
1.5	Supresor.....	5
1.6	Detektor .....	6
1.7	Validace .....	6
1.7.1	Preciznost .....	6
1.7.2	Pravdivost.....	7
1.7.3	Linearita .....	8
1.7.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	8
1.8	Mravenčany .....	8
2	Experimentální část .....	13
2.1	Použité chemikálie .....	13
2.2	Použité přístroje a pomůcky .....	14
2.2.1	Iontový chromatograf.....	14
2.2.2	Ostatní přístroje a pomůcky .....	18
2.3	Postup přípravy roztoků .....	18
3	Výsledky a diskuse.....	20
3.1	Optimalizace složení mobilní fáze.....	23
3.2	Validace metody.....	25
3.2.1	Opakovatelnost metody .....	25
3.2.2	Kalibrační závislost a linearita .....	27
3.2.3	Určení meze detekce a meze stanovitelnosti .....	29



3.3	Stanovení mravenčanů ve vzorcích destilátů .....	31
3.4	Stanovení octanů ve vzorcích destilátů .....	33
4	Závěr.....	35
5	Reference.....	36

## Seznam zkratek

LOQ – Mez stanovitelnosti (z ang. limit of quantification)

LOD – Mez detekce (z ang. limit of detection)

IC – Iontová chromatografie (z ang. Ion of chromatography)

U.S. EPA – Agentura pro ochranu životního prostředí (United States Environmental Protection Agency)

ASTM – Americká společnost pro testování a materiály (ASTM International)

SF – Stacionární fáze

MF – Mobilní fáze

PEEK – Polyetheretherketon

PP – Polypropylen

PS-DVB – Polystyren-divinylbenzenové kopolymery

PVA – Polyvinyl alkohol

UV-VIS – ultrafialovo-viditelná spektrometrie (z ang. Ultraviolet-visible spectroscopy)

p.a. – pro analýzu

FDH – formaldehyddehydrogenasa

THF – Tetrahydrofolát

ADH – Alkoholdehydrogenasa

UK – Ukrajinská vodka s papričkou

# 1 Teoretická část

## 1.1 Iontová chromatografie

První informace o iontové chromatografii (IC) pocházejí z roku 1850, kdy Harry Thompson se svým kolegou zkoumali adsorpci amoniaků v půdách. Po průtoku vodného roztoku hnojiva, který obsahoval amoniak, došli k závěru, že je voda chudší na amoniak, avšak s vyšší koncentrací vápníku po průchodu vrstvou půdy. Až v roce 1903 byla chromatografie objevena jako separační metoda ruským botanikem Semjonovičem Cvetem. O 24 let později byla poprvé použita iontově výměnná kolona pro anionty ke stanovení přítomnosti síranů v přírodních vodách německým vědcem Bahrtem. V 50. letech 20. století se chromatografické metody úspěšně uplatnily v chemické analýze. Další události spojené s vývojem iontové chromatografie jsou uvedeny v Tabulce 1. [1], [2], [3]

Tabulka 1 - Události ve vývoji iontové chromatografie

Rok	Událost
1903	Objev chromatografie jako separační metody, který provedl M. Tswett
1975	Zveřejnění zásadní studie o pelikulárních aniontoměničích, Small H., a kolektiv.
1975	Prezentace prvního iontového chromatografu na setkání American Chemical Society (Americké chemické společnosti) v Chicagu
1980	Zavedení IC bez potlačení vodivosti mobilní fáze (vodivostní detekce)
1981	Zavedení iontového chromatografu, ve kterém byly všechny části v kontaktu s eluentem vyrobeny z nekovových materiálů
1984	První počítačový program pro ovládání iontových chromatografů, zavedení mikromembránových supresorů vodivosti mobilní fáze
1984	Uznání IC jako referenční metody pro stanovení iontů ve vodě a odpadních vodách agenturami U.S. EPA a ASTM International
1992	Zavedení IC standardů pro stanovení iontů ve vodě a odpadních vodách
1997	Zavedení automatického generátoru eluentu, implementace myšlenky „Stačí přidat vodu“

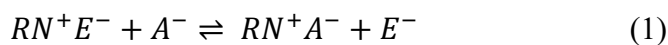
Iontová chromatografie je analytická metoda, kterou využíváme k separaci a kvantifikaci iontových sloučenin. Separace je založena na různě silné elektrostatické interakci mezi ionty, které jsou přítomny v eluentu, a nabitými funkčními skupinami fixovanými na chromatografickém nosiči. Iontová chromatografie je klíčovou metodou pro separaci a stanovení aniontů v roztocích. Pro stanovení kationtů lze kromě iontové chromatografie využít také metody atomové spektrometrie. Základní instrumentální uspořádání odpovídá metodě kapalinové chromatografie. K separaci dochází v chromatografické koloně, která je naplněna vhodnou ionexovou stacionární fází, a celým chromatografickým systémem protéká vhodně zvolená mobilní fáze. Za kolonou je zapojen průtokový detektor, nejčastěji vodivostní detektor. Vzorky se dávkuje pomocí šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou a pro zajištění konstantního průtoku mobilní fáze se využívá vysokotlaké čerpadlo. Mobilní fázi obvykle tvoří vodný roztok kyselin, zásad nebo solí. Stacionární fáze je nepohyblivá a je tvořena inertní organickou nebo anorganickou maticí, která je chemicky modifikovaná ionizovatelnými funkčními skupinami, které mohou vyměňovat a uvolňovat ionty. V blízkosti nabitých funkčních skupin stacionární fáze se vyskytují odpovídající protiionty, které se mohou vyměňovat za ionty stejného náboje obsažené v mobilní fázi. Kulovité částice ionexové stacionární fáze mají v průměru 5 až 10  $\mu\text{m}$  a jsou naplněny do nerezové nebo plastové kolony s dostatečnou tlakovou odolností. [1], [3], [4], [5]

Iontová chromatografie se využívá ke stanovení mnoha iontů v klinických a farmaceutických laboratořích, zejména k testování léčiv. Dále se používá při kontrole potravin a kontrole kvality vody, včetně stanovení obsahu fluoridů. Při analýzách životního prostředí se nejčastěji zaměřuje na dusitany a dusičnany ve vodách a potravinách. [6], [7], [8], [9]

## 1.2 Princip iontové chromatografie

Separace analytů je založena na různě silné elektrostatické vazbě na kladně nebo záporně nabitě skupiny fixované na stacionární fázi. Tyto skupiny interagují s volnými protiionty v mobilní fázi. Ionty analytu a nabitě ionty eluentu soutěží o opačně nabitě funkční skupiny na povrchu nosiče stacionární fáze. Při aniontové výměně jsou záporně nabitě analyty vytěšňovány přidáváním záporně nabitých iontů obsažených v mobilní fázi. Interakce mezi anionty mobilní fáze a funkčními skupinami nakonec převáží nad interakcí mezi analyzovanými anionty a funkčními skupinami a dochází tak k eluci analytu ze stacionární fáze.

Výměna každého iontu je popsána iontově výměnou rovnováhou, která charakterizuje jeho rozdělování mezi mobilní a stacionární fázi. Výměnná reakce aniontů v IC je popsána rovnicí (1). [10], [11], [12]



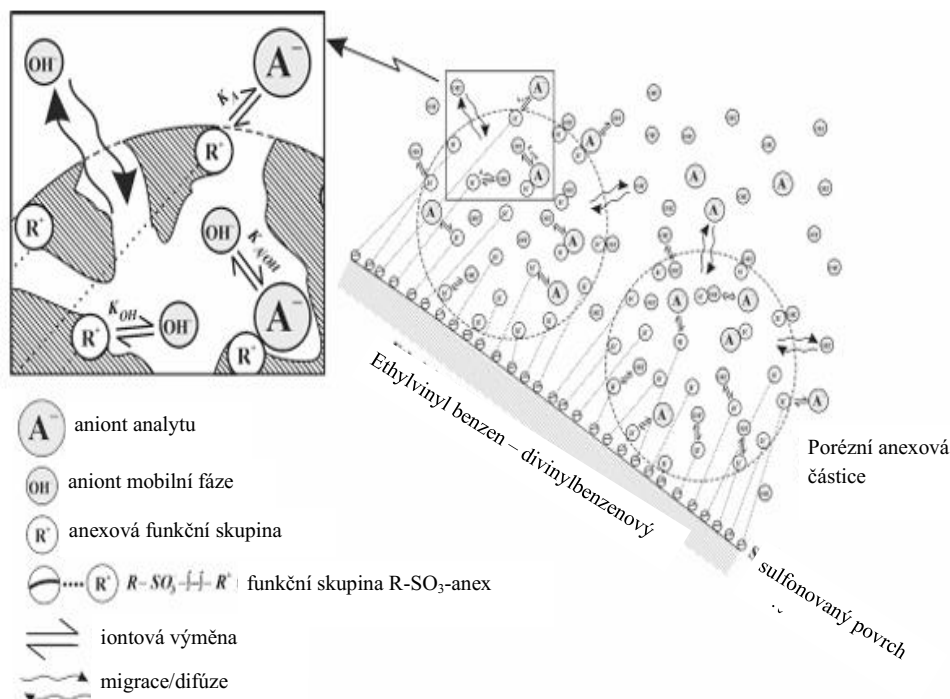
Výměnu aniontů z rovnice (1) lze charakterizovat koncentrační rovnovážnou konstantou  $K'_A$

$$K'_A = \frac{[A^-]_{SF} \cdot [E^-]_{MF}}{[A^-]_{MF} \cdot [E^-]_{SF}}$$

kde  $E^-$  značí aniontu eluentu, který se vyměňuje s aniontem analytu  $A^-$  vázaným na kladně nabitý povrch stacionární fáze  $RN^+$ . Pro dosažení rovnováhy mezi ionty analytu a eluentu jsou potřebné dva procesy:

1. Reverzibilní spojení aniontu analytu nebo aniontu eluentu s iontově výměnnými místy stacionární fáze díky elektrostatickému interakce
2. Iontová výměna mezi aniontem analytu a aniontem eluentu.

Celková situace při výměně aniontů na anexové stacionární fázi je znázorněna na obrázku 1, kde je také znázorněna elektrostatická vazba mezi částicemi s kvartérními aminovými skupinami a sulfonovaným povrchem polymerního nosiče (kopolymer ethylvinyl benzenu a divinyl benzenu). [3], [5], [10], [13]



Obrázek 1 – Výměna aniontů na pelikulární anexové stacionární fázi (převzato a upraveno:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305022235>) [10]

Iontovou chromatografií s vodivostní detekcí lze prakticky provést s potlačenou nebo nepotlačenou vodivostí mobilní fáze. U potlačené vodivostní detekce eluát vycházející z kolony proudí do supresoru, kde se chemicky snižuje vodivost eluentu a zvyšuje vodivost analytů, což zlepšuje poměr signálu k šumu detekčního signálu. U nepotlačené (přímé) iontové chromatografie se používají stacionární fáze s nízkou kapacitou a mobilní fáze o nízké koncentraci solí organických kyselin. Vodivost mobilní fáze je u přímé iontové chromatografie tedy nízká.

### 1.3 Stacionární fáze

Ionexová stacionární fáze je tvořena organickým nebo anorganickým nosičem, na který jsou navázány iontoměničové funkční skupiny, ty se účastní procesu výměny. Pokud jsou funkční skupiny zakotveny přímo na nosič stacionární fáze, jedná se o povrchově funkcionalizovaný ionex. Pokud je na aktivovaný nosič stacionární fáze mechanicky nebo pomocí hydrofobní či elektrostatické interakce zachycena malá povrchově funkcionalizovaná částice, jedná se o pelikulární ionex.

Katexy jsou iontoměniče, které mají záporně nabitě funkční skupiny a přitahují kladně nabitě kationty. Anexy jsou naopak iontoměniče, které mají kladně nabitě funkční skupiny a přitahují záporně nabitě anionty. Nejčastěji se v IC používají stacionární fáze na bázi silikagelu nebo modifikovaných organických polymerů. Mezi ně patří polystyren-divinyl benzenové kopolymery (PS-DVB), polymethakryláty a polyvinyl alkoholy (PVA), které mají schopnost pracovat při vyšších tlacích a mají lepší chemickou odolnost než silikagelové ionexy. Především při separaci organických iontů může docházet k interakci s nosičem ionexové stacionární fáze, proto při vývoji metody je třeba vyzkoušet různé nosiče ionexové SF. Charakteristické katexové a anexové funkční skupiny jsou uvedeny v Tabulce 2. [1], [3], [10], [14]

Tabulka 2 – Charakteristické funkční skupiny katexů a anexů

Typ výměny	Skupina	Typické protiionty
<b>Silný katex</b>	Kyselina sulfonová	Na <sup>+</sup> , H <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup>
<b>Slabý katex</b>	Karboxylová kyselina	Na <sup>+</sup> , H <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup>
<b>Silný anex</b>	Kvartetní amin*	Cl <sup>-</sup> , HCOO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>Slabý anex</b>	Primární, sekundární a terciární amin	Cl <sup>-</sup> , HCOO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>

\* Nejčastěji je používán trimethylamin nebo ethyldimethylamin

## 1.4 Mobilní fáze

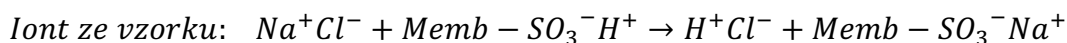
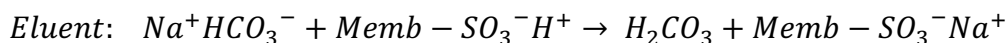
Jako mobilní fáze se v iontové chromatografii využívá eluent, který je tvořen vodným roztokem soli nebo směsí solí. Vodnou mobilní fázi lze modifikovat přidávkou polárního organického rozpouštědla, nejčastěji methanolu, acetonitrilu anebo acetonu. Při optimalizaci složení mobilní fáze jsou nejdůležitějšími parametry typ a koncentrace soli, tedy druh a koncentrace konkurenčního iontu s afinitou k iontové výměnné skupině stacionární fáze, a pH mobilní fáze. pH mobilní fáze ovlivňuje stupeň disociace (náboj) ionexové funkční skupiny stacionární fáze a analytu. [5], [13], [14]

Při iontové chromatografii aniontů je mobilní fáze nejčastěji tvořena zředěným roztokem uhličitanu sodného nebo hydrogenuhličitanu sodného, případně jejich směsí. Uhličitanové ionty mají velkou eluční sílu, naopak hydrogenuhličitanové ionty jsou slabým elučním činidlem. [5], [13], [14]

Kromě druhu soli, její koncentrace a pH mobilní fáze ovlivňují eluci rozpuštěných látek také průtok eluentu a separační teplota. Zvýšení teploty obecně vede k urychlení analýzy, tedy snížení retenčních časů. Vyšší průtoky eluentu způsobují snížení elučních časů, protože ionty rozpuštěných látek mají méně příležitostí interagovat s iontově výměnnými skupinami. Velmi důležité je odplynění eluentu, aby se předešlo poškození kolony. Před zahájením měření je třeba kolonu dostatečně dlouho promývat eluentem, dokud není dosaženo rovnováhy, což ilustruje stabilní základní linie (base line). Látka, aby byla vhodná jako eluent, musí splňovat následující podmínky: dostupnost ve vysoké čistotě, dostatečně vysoká eluční síla bez poškození kolony, absence generování takzvaných falešných píků v důsledku reakcí na koloně nebo v supresoru, a neovlivňování či inhibování supresorového zařízení.[3], [14], [15], [16]

## 1.5 Supresor

Součástí iontového chromatografu je supresor, který má za úkol potlačit vodivost mobilní fáze před vlastní detekcí analytů. Snížení vodivosti mobilní fáze se využívá při analýze aniontů, pro analýzu a detekci kationtů není potřeba supresor používat. Při chemické supresi je za aniontově výměnnou kolonou zapojena kationtově výměnná supresorová jednotka, která převádí eluent (uhličitan nebo hydrogenuhličitan) na kyselinu uhličitou a protiiont ze vzorku aniontů, nejčastěji ze sodíku nebo draslíku, na vodík. Kyselina uhličitá velmi málo disociuje, je nestabilní a rozkládá se na oxid uhličitý a vodu. Vzniklý oxid uhličitý je z mobilní fáze odstraněn ve formě plynného CO<sub>2</sub> v MCS modulu (CO<sub>2</sub> degaser). Výměna iontů (kationtů) při chemické supresi je schematicky vyjádřena následujícími chemickými rovnicemi:



Po chemické supresi lze použít vodivostní detektor, protože vodivost mobilní fáze je velmi nízká (okolo  $1 \mu\text{S cm}^{-1}$  nebo méně) a anionty analytů, ve skutečnosti jejich  $\text{H}^+$  protiionty, jsou naopak vysoce vodivé. Měřený signál analytu je tedy součtem vodivosti aniontu a jeho  $\text{H}^+$  protiontu. [1], [5], [16], [17]

## 1.6 Detektor

Nejběžnější detektor, který se využívá v iontové chromatografii, je detektor vodivostní. Výhodou vodivostní detekce je její velká citlivost a selektivita pro analyty iontové povahy. Eluát z chromatografické kolony je veden do průtokové detekční cely, která obsahuje dvě elektrody. Na tyto elektrody je vkládáno střídavé napětí. Ionty ze vzorku při svém průchodu detekční celou zvyšují vodivost eluátu, pro dosažení co největší citlivosti detekce by samotná mobilní fáze měla být co nejméně vodivá.

V iontové chromatografii lze také využít UV-VIS detektor nebo elektrochemický detektor. Přímou UV-VIS detekci lze v iontové chromatografii využít pro detekci látek obsahující ve své struktuře různé chromoforové skupiny jako např. ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , dvojně vazby  $\text{C}=\text{C}$  nebo  $\text{N}=\text{N}$ , fenyl, keton, aromatický kruh), tedy pro ionty organických molekul jako jsou organické kyseliny, aminy, aminokyseliny, aromatické sloučeniny. [3], [16]

## 1.7 Validace

Při validaci analytické metody se ověřuje, že je daná metoda vhodná pro konkrétní analytický úkol a že poskytuje precizní a pravdivé výsledky. Během validace metody se hodnotí následující výkonnostní charakteristiky: preciznost (opakovatelnost a mezilehlá preciznost), pravdivost (odchylka/bias), selektivita, pracovní rozsah, linearita/lineární rozsah, analytická citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti a robustnost. Charakteristiky, které se budou zkoumat, se vybírají podle konkrétního analytického úkolu. [18]

### 1.7.1 Preciznost

Preciznost měření vyjadřuje, jak těsně spolu souhlasí naměřené hodnoty získané opakovanými měřeními na stejném přístroji za stejných podmínek. Při hodnocení preciznosti se posuzuje opakovatelnost, mezilehlá preciznost a reprodukovatelnost měření. Preciznost lze vyjádřit číselně pomocí směrodatné odchylky, rozptylu nebo variačního koeficientu. [19]



V této bakalářské práci byla preciznost měření vyhodnocena jako opakovatelnost měření na stejném přístroji, stejnou osobou, za stejných experimentálních podmínek a v krátkém časovém rozmezí. Opakovatelnost měření byla vyjádřena jako směrodatná odchylka ( $s$ , viz rovnice 2) a relativní směrodatná odchylka ( $s_r$ , viz rovnice 3) z deseti opakovaných měření na dvou koncentračních hladinách.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

kde  $x_i$  je hodnota  $i$ -tého měření,  $\bar{x}$  je aritmetický průměr hodnot pro všechna měření a  $n$  je počet měření.

$$s_r (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3)$$

kde  $s$  je směrodatná odchylka a  $\bar{x}$  je aritmetický průměr hodnot pro všechna měření. [19]

### 1.7.2 Pravdivost

Pravdivost měření je těsnost shody mezi mediánem nebo aritmetickým průměrem opakovaných měření (střední hodnota základního souboru) a referenční hodnotou veličiny. Pravdivost je kvantifikována vychýlením (bias). Vychýlení  $b$  lze vyjádřit absolutně nebo relativně v procentech, jak je vidět z rovnic 4 a 5

$$b = \bar{x} - x_{ref} \quad (4)$$

$$b (\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \cdot 100 \quad (5)$$

Kde  $\bar{x}$  je aritmetický průměr hodnot pro všechna měření a  $x_{ref}$  je referenční hodnota.

Vychýlení je možné určit analýzou referenčních materiálů, vyhodnocením výtěžnosti nebo porovnáním s výsledky získanými jinou analytickou metodou. V této bakalářské práci byla vyhodnocena výtěžnost pro vzorek se známým přidaným množstvím standardu analytu. Výtěžnost  $R_f$  v procentech byla vypočítána podle rovnice 6

$$R_f (\%) = \frac{c_2 - c_1}{c_{přid}} \cdot 100 \quad (6)$$

kde  $c_2$  odpovídá pozorované koncentraci s přidavkem standardu,  $c_1$  odpovídá pozorované koncentraci bez přidavku standardu a  $c_{přid}$  odpovídá skutečné koncentraci přidavku standardu. [19]

### 1.7.3 Linearita

Linearita metody určuje rozsah kalibrace, ve kterém je měřený signál přímo úměrný změně koncentrace analytu ve vzorku, a kalibrační závislost lze vyjádřit rovnicí přímky ve tvaru  $y = ax + b$ . K hodnocení linearity lze také použít korelační koeficient  $R$  kalibrační přímky.

### 1.7.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) analytické metody je nejnižší koncentrace analytu, která poskytuje signál detektoru významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je koncentrace analytu, kterou je možné stanovit se stanovenou přesností.

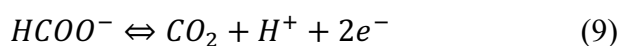
Mez detekce a mez stanovitelnosti v této bakalářské práci byly určeny z výšky šumu  $h_n$  základní linie a směrnice kalibrační přímky  $m$  závislosti výšky píků na koncentraci analytu s využitím rovnic 7 a 8. [19]

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m} \quad (7)$$

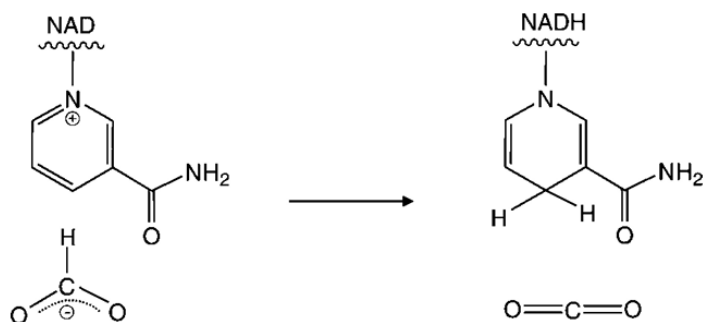
$$LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m} \quad (8)$$

## 1.8 Mravenčany

Mravenčan nebo-li formiát je běžným růstovým substrátem nebo produktem různých druhů reakcí, katalyzovaných anaerobními eukaryotickými organismy a archeobakteriemi. Funguje také jako tzv. akcesorický reduktant, což je látka, která slouží jako redukční činidlo v chemické reakci, ale sama není hlavním činidlem a zároveň slouží jako meziprodukt v energeticky úsporných drahách. Různorodé mikroorganismy využívají různé metabolické dráhy k produkci nebo spotřebě mravenčanů. Mezi tyto mikroorganismy patří anaerobní eukaryota, archea a eukaryotické kvasinky. Všechny obsahují formaldehyddehydrogenasu, enzym, který katalyzuje dvou elektronovou oxidaci mravenčanu, viz. rovnice 9. [20]



Formaldehyddehydrogenasa (FDH), je v přírodě široce rozšířený enzym, který regeneruje koenzymy při chirálních syntézách, které jsou závislé na nikotinamidadeninukloetid fosfát NADP<sup>+</sup> Obrázek 2.



Obrázek 2 - Schéma oxidační katalýzy mravenčanu na oxid uhličitý (převzato:

[https://www.researchgate.net/publication/51420640\\_A\\_Theoretical\\_Study\\_of\\_the\\_Catalytic\\_Mechanism\\_of\\_Formate\\_Dehydrogenase](https://www.researchgate.net/publication/51420640_A_Theoretical_Study_of_the_Catalytic_Mechanism_of_Formate_Dehydrogenase))[21]

FDH má významný biotechnologický potenciál jako katalyzátor pro syntézu organických kyselin a regeneraci koenzymů při výrobě farmaceutických produktů. Kromě toho se využívá k měření koncentrace kyseliny mravenčí a šťavelové v roztocích a fyziologických tekutinách. Tento enzym je tvořen dvěma identickými podjednotkami o velikosti 42 kDa, přičemž každá podjednotka má své nezávislé aktivní místo. Pozorovaná rychlostní konstanta  $7,3 \text{ s}^{-1}$  naznačuje, že tento enzym je relativně méně účinný ve srovnání s jinými  $\text{NAD}^+$  závislými dehydrogenasami. Pravděpodobnou příčinou je silná interakce mezi substrátem v jeho základním stavu a několika zbytky v aktivním místě. [21]

Mravenčan vzniká jako meziprodukt při nesacharolytickém kvašení; vyrábí se z formyltetrahydrofolátu během kvašení purinů a redukuje se z oxidu uhličitého při kvašení hypoxantinu. Mnoho fakultativních a přísně anaerobních bakterií získává energii pro svůj růst pomocí fosforylace spojené s přenosem elektronů, což zahrnuje oxidaci mravenčanu a redukcí exogenních látek, jako jsou dusičnany a fumarát, které slouží jako elektronové akceptory. Methylotrófní organismy, které postrádají ribulósa-5-fosfátový cyklus pro asimilaci uhlíku, přeměňují methanol na mravenčan, který je dále oxidován na oxid uhličitý. Methylotrófní aerobní organismy také využívají mravenčan jako jediný zdroj energie. *Pseudomonas oxalaticus* roste na oxalátu jako jediném zdroji energie a mravenčan vytvořený při této reakci je následně oxidován na oxid uhličitý. Širší spektrum anaerobních bakterií je schopno metabolizovat mravenčan. Kyselina mravenčí vzniká během fermentace cukrů, buď katalyzované pyruvát formylasou, nebo redukcí oxidu uhličitého. Formiát je také produktem fermentace aromatických sloučenin, L-(+)- kyseliny šťavelové a oxalátu. [20]

Mravenčanový aniont představuje nejjednodušší člen řady solí karboxylových kyselin, které všechny obsahují karboxylátovou skupinu a  $\text{sp}^2$  hybridizovaný atom uhlíku.

Karboxylátová funkční skupina ( $\text{RCOO}^-$ ) je všudypřítomná v organismu. Všechny aminokyseliny obsahují alespoň jednu kyselou skupinu  $\text{RCOOH}$ .  $\text{RCOO}^-$  také tvoří polární skupinu v mnoha molekulách povrchově aktivních látek a její interakce s vodou je důležitá pro tvorbu lamelových fází, vezikul a micel. Mravenčanový aniont je považován za indikátor otravy formaldehydem, methanolem a kyselinou mravenčí. Kvůli metabolickému přeměně ethanolu na kyselinu octovou je acetát často považován za indikátor orální konzumace ethanolu. Mravenčan i acetát lze stanovit z krve nebo moči. [22], [23], [24]

Methanol je jedna z neznámějších chemických látek, kterou charakterizuje jednoduchá struktura  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Tato látka má sama o sobě nízkou toxicitu, ovšem v lidském těle je metabolizována alkoholdehydrogenasou (ADH) na formaldehyd a kyselinu mravenčí. Malé množství methanolu se může vyskytovat v komerčních alkoholických nápojích jako vedlejší produkt fermentace a destilace, ale vyskytuje se i v čerstvém ovoci a zelenině. Při nevhodném skladování destilátů se může koncentrace methanolu ve výrobku zvýšit, a to prostřednictvím bakteriální dehydrogenasy. [25], [26], [27]

Kyselina mravenčí je bezbarvá kapalina, která při  $8,4\text{ }^\circ\text{C}$  tuhne a při  $101\text{ }^\circ\text{C}$  vře. Má ostrý zápach a je mísitelná ve všech poměrech s vodou. Kyselina mravenčí vykazuje závažnou toxicitu, a to jak akutní (krátkodobou) lokální, tak akutní systémovou. Vykazuje mírnou chronickou (dlouhodobou) systémovou toxicitu a mírnou chronickou lokální toxicitu. Proto je třeba se vyvarovat expozice kůže, požití a vdechování. Kyselina mravenčí je nejsilnější z nesubstituovaných monokarboxylových kyselin. Její  $\text{pK}_a$  je 3,77, oproti 4,77 u kyseliny octové. [21], [28]

Estery kyseliny mravenčí jsou těkavé, hořlavé, sladce vonící kapaliny. Jsou málo rozpustné ve vodě. Tyto estery mají středně akutní (krátkodobou) lokální a systémovou toxicitu. Dráždí kůži a sliznici. Ve vysoké koncentraci působí narkoticky.

Formamid je bezbarvá kapalina se zápachem amoniaku. Je to velmi polární materiál (dielektrická konstanta 109) má vysoký bod varu ( $210\text{ }^\circ\text{C}$ ), taje při  $3\text{ }^\circ\text{C}$  a je zcela rozpustný ve vodě. Je to středně toxická látka a při zahřátí poskytuje kyanovodík. [20], [21], [28]

Vysoká hladina kyseliny mravenčí se pomalu metabolizuje na  $\text{CO}_2$  a vodu, nebezpečná je vysoká hladina samotné kyseliny mravenčí, která může v lidském těle způsobit řadu vážných onemocnění, s fatálními následky pro lidský organismus. Patří mezi ně poškození optického nervu, selhání jater a ledvin. Tato kyselina se do těla může dostat stravou, požitím methanolu nebo vdechnutím jeho par. Hromadění této kyseliny v těle se nazývá metabolická acidóza, je

lčena podáním hydrogenuhličitanu sodného, který napomáhá normalizovat hodnotu pH v krevním oběhu. Dále narušuje aktivitu cytochromoxidasy v těle a způsobuje tzv. hypoxii, což je stav, kdy tkáň v organismu nedostává dostatečné množství kyslíku. [9], [20], [27], [29]

V savčích buňkách je hlavním zdrojem mravenčanu aminokyselina serin. Jeho nedostatek způsobuje zastavení buněčného cyklu u proliferujících lymfocytů a nádorových buněk. Pomocí tetrahydrofolátu (THF) může být serin katabolizován na formiát komplementárními dráhami (cytosol, mitochondrie). Od kvasinek až po savce jsou tyto dráhy zachovány, což naznačuje, že kompartmentalizace metabolismu 1C byla ranou událostí v evoluci eukaryotních buněk. V kvasinkových i savčích buňkách se mitochondriální dráha vyznačuje vysokou produkcí mravenčanu, zatímco cytosolová dráha ho opětovně získává pro využití při syntéze serinu a nukleotidů. Inaktivace mitochondriální produkce mravenčanů vyvolává přepracování metabolismu 1C. Aby se nedostatek mitochondriální produkce formiátu kompenzoval, přepne se cytosolová dráha z produkce serinu na katabolismus serinu. Nedostatek mitochondriální produkce glycinu však toto přepnutí nekompensuje a buňky se stávají závislými na dostupnosti extracelulárního glycinu. Je však třeba poznamenat, že nadměrná suplementace glycinem přesouvá cytosolickou dráhu z katabolismu serinu na syntézu serinu, což inhibuje adaptaci na neaktivní mitochondriální metabolismus 1C. [25], [30]

U savců se hladiny mravenčanů v cirkulaci (v krvi) pohybují v rozmezí 10 až 100 mmol/dm<sup>3</sup> a poločas mravenčanů v krvi je v rozmezí 40 až 100 min. Cirkulující mravenčan podléhá celotělové kompartmentalizaci, která se nápadně podobá Coriho cyklu glukózo-laktátového metabolismu, kde serin hraje roli glukózy a mravenčan/glycin roli laktátu.

Mravenčan je získán z různých zdrojů potravin, avšak u některých savců jako jsou například myši se vyskytuje mravenčan v milimolárních koncentracích ve střevním lumenu. Střevní mravenčan může vstupovat do oběhu a přispívat k cirkulujícímu mravenčanu. Dalším vedlejším produktem metabolismu střevního mikrobiomu je methanol, který může být v játrech metabolizován na formaldehyd a následně na mravenčan. Pektin, přirozená složka ovoce, je střevním mikrobiomem degradován na methanol.

Další zdrojem mravenčanu může být štěpení glycinu, katabolismus cholinu, katabolismus tryptofanu, syntéza cholesterolu a syntéza sterolů. Sladidlo aspartam se metabolizuje na aspartát, fenylalanin a methanol. Nadměrná konzumace nápojů obsahujících aspartam proto může působit jako další zdroj mravenčanů prostřednictvím metabolismu methanolu.

Intoxikace methanolem je léčena inhibitory alkoholdehydrogenasy, aby se inhiboval základní metabolický krok v metabolismu methanolu na jeho toxický vedlejší produkt formiát. Inhibice alkoholdehydrogenasy zabraňuje akumulaci mravenčanu a methanol může být odstraněn vylučováním močí. Protože alkoholdehydrogenasa katalyzuje přeměnu methanolu na formaldehyd a ethanolu na acetaldehyd, působí ethanol jako kompetitivní inhibitor metabolismu methanolu alkoholdehydrogenasou. Syntetický inhibitor alkoholdehydrogenasy fomepizol se také používá v souvislosti s otravou methanolem. [28], [30]

## 2 Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie

Chemikálie, které byly použity v této bakalářské práci jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tabulka 3- Použité chemikálie

Chemikálie	Čistota	Výrobce	Stát
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Bezvodý, p.a.	Supelco	Německo
NaHCO <sub>3</sub>	p.a.	Supelco	Německo
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	96% p.a.	Lach-Ner, s.r.o	CZ
Vinan sodno-draselný	p.a.	Lachema N.P.Brno	CZ
Šťavelan vápenatý	p.a.	Lachema N.P.Brno	CZ
Kyselina jantarová	p.a.	Lachema N.P.Brno	CZ
F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , HCOO <sup>-</sup> , CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Br <sup>-</sup> , BrO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1000 mg/dm <sup>3</sup>	Sigma Aldrich	USA
Kyselina malonová	1000 mg/dm <sup>3</sup>	Merck Group	Německo

Destiláty, ve kterých byly stanovovány mravenčany jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 - Vybrané destiláty, ve kterých probíhalo stanovení analytů

Destilát	Obsah alkoholu (obj.)	Výrobce	Stát
Amundsen vodka	37,5 %	STOCK Plzeň-Božkov s.r.o.	CZ
Ukrajinská vodka s papričkou	40 %	LLC „Lviv Liqour and Vodka“	UA
Becherovka	38 %	Karlovarská Becherovka, a.s.	ČSR
Pepermint	19 %	STOCK Plzeň-Božkov s.r.o.	CZ

## 2.2 Použité přístroje a pomůcky

### 2.2.1 Iontový chromatograf

K měření byl použit iontový chromatogram 850 Professional IC Anion od společnosti Metrohm AG (Švýcarsko), který se skládal z následujících částí:

1. **Dávkovací ventil:** k ventilu byla připojena dávkovací smyčka (PEEK, polyetheretherketon) o objemu 20  $\mu\text{l}$ , pomocí přepínání šesticestného ventilu je naplněna dávkovací smyčka a následně je požadované množství vzorku nadávkováno na separační kolonu.
2. **Vysokotlaké čerpadlo:** dvoupístové nízkopulzní čerpadlo, pracuje v rozsahu 0,001 až 20 ml/min, maximální pracovní tlak 50 MPa, je vybaveno čipem, kde jsou uloženy technické specifikace (provozní hodiny, servisní údaje)
3. **Peristaltické čerpadlo:** dvoukanálové čerpadlo, které se může otáčet v obou směrech; jedno čerpadlo se využívá k transportu vzorku z dávkovacího karuselu do dávkovací smyčky; druhé peristaltické čerpadlo regeneruje a oplachuje (deionizovaná voda) chemický supresor (katex).
4. **Kolonový termostat:** kontroluje teplotu kolony a eluentu, zajišťuje stabilní podmínky pro měření v rozsahu 0 °C až 80 °C pro 2 separační kolony.
5. **Tlumič pulzů:** chrání kolonu před poškozením, které může být způsobeno kolísáním tlaku při přepínání dávkovacího ventilu.
6. **Inline filtr:** chrání kolonu před kontaminacemi z eluentu. Filtrační destičky mají velikost pórů 2  $\mu\text{m}$  a mohou odstraňovat mikroorganismy, řasy nebo bakterie.
7. **Separální kolona (Metrosep A Supp 7–250/4):** je jádrem celé IC chromatografie, je vyplněná anexem, složená z polyvinylalkoholu s navázanými kvartérními aminovými skupinami, které umožňují výměnu aniontů. Tělo kolony je z PEEK, tento materiál je vhodný pro analýzy, které probíhají při vysokých tlacích. S chemickým supresorem je doporučován 3,6 mmol/l uhličitan sodný jako mobilní fáze. Veškeré podrobné informace o koloně jsou uvedeny v Tabulce 5.
8. **Metrohm Suppressor Module (MSM):** používá se k chemickému potlačení vodivosti mobilní fáze při analýze aniontů, je tvořen třemi katexovými kolonami.
9. **Odplynovač eluentu:** odstraňuje bublinky plynu a rozpuštěné plyny z eluentu. Při odplyňování proudí eluent do vakuové komory kapilárami ze speciálního fluoropolymeru.



10. **Odplynovač vzorků:** odstraňuje bublinky plynu a rozpuštěné plyny z roztoku vzorku, vzorek proudí do vakuové komory přes speciální fluoropolymerovou kapiláru.
11. **Vodivostní detektor:** měří vodivost procházející kapaliny, naměřená data vysílá v digitální formě, vykazuje vysokou teplotní stabilitu (<0,001 °C).

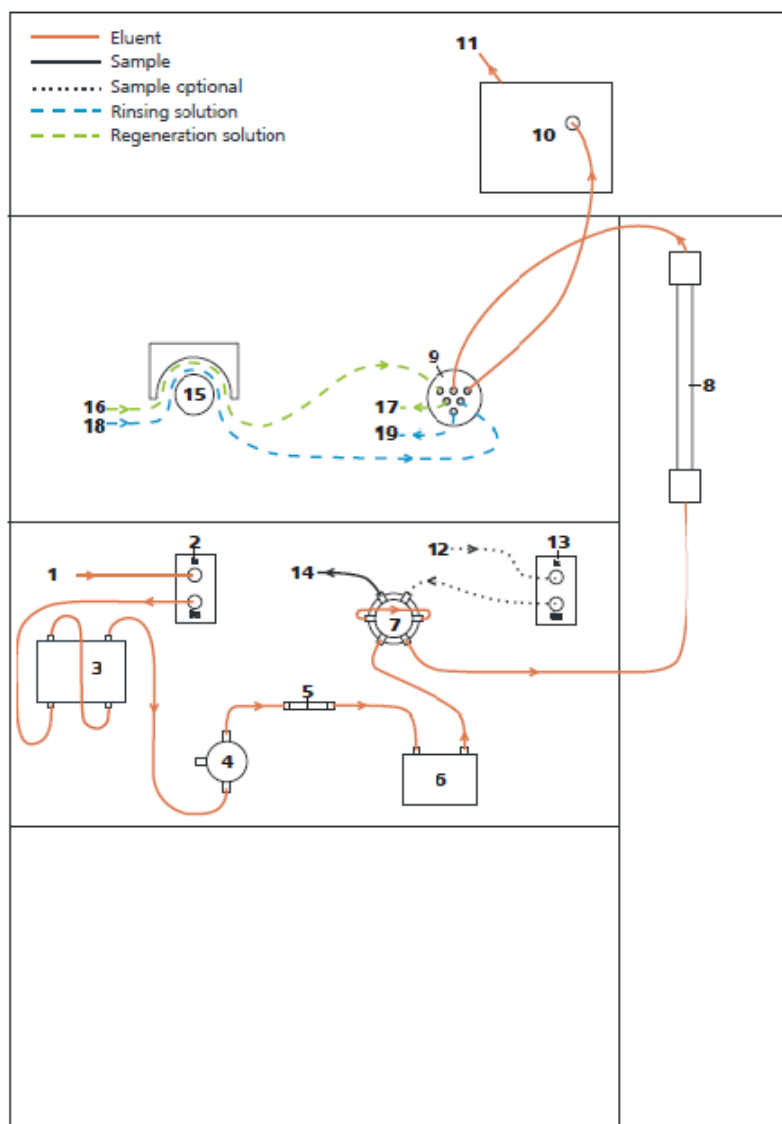
Tabulka 5 - Parametry kolony Metrosep A Supp 7–250/4

<b>Výplň</b>	Polyvinylalkohol s kvartérními aminovými skupinami
<b>Rozměry</b>	250 x 4 mm
<b>Tělo kolony</b>	PEEK
<b>Kapacita</b>	110 μmol (Cl <sup>-</sup> )
<b>Velikost částic</b>	5 μm
<b>Maximální tlak</b>	15 MPa
<b>Optimální tlak</b>	9,2 ± 2 MPa
<b>Maximální průtok</b>	1 ml · min <sup>-1</sup>
<b>Optimální průtok</b>	0,7 ml · min <sup>-1</sup>
<b>Rozsah pH</b>	3 – 12
<b>Rozsah teplot</b>	20 – 60 °C
<b>Doporučená teplota</b>	45 °C
<b>Skladování kolony</b>	4 – 8 °C

Na následujících obrázcích (Obrázek 3 a 4) je zobrazen použitý iontový chromatograf Metrohm 850 Professional IC Anion.



Obrázek 3 - Ionový chromatograf Metrohm 850 Professional IC Anion (převzato a upraveno z Manual for 850 Professional IC, 2.850.2010 – Anion, dostupné na [https://www.metrohm.com/cs\\_cz/products/2/8502/28502010.html](https://www.metrohm.com/cs_cz/products/2/8502/28502010.html))[31], 1. vodivostní detektor, 2. peristaltické čerpadlo, 3. MSM modul (chemický supresor), 4. dávkovací ventil 5. odplyňovač mobilní fáze, 6. vysokotlaké čerpadlo, 7. promývací ventil, 8. tlumič pulsů, 9. odplyňovač vzorku, 10. separační kolona, 11. kolonový termostát



Obrázek 4 – Schéma iontového chromatografu Metrohm 850 Professional IC Anion (převzato a upraveno z Manual for 850 Professional IC, 2.850.2010 – Anion, dostupné na [https://www.metrohm.com/cs\\_cz/products/2/8502/28502010.html](https://www.metrohm.com/cs_cz/products/2/8502/28502010.html)[31], 1. vstup mobilní fáze, 2. odplyňovač mobilní fáze, 3. vysokotlaké čerpadlo, 4. promývací ventil (purge valve), 5. inline filtr; 6. tlumič pulzů, 7. dávkovací ventil, 8. separační kolona, 9. chemický supresor (MSM), 10. detektor, 11. výstup mobilní fáze, 12. vstup vzorku, 13. odplyňovač vzorku, 14. výstup vzorku, 15. peristaltické čerpadlo, 16. vstup regeneračního roztoku pro supresor, 17. výstup regeneračního roztoku, 18. vstup oplachovacího roztoku pro supresor, 19. výstup oplachovacího roztoku

K iontovému chromatografu 850 Professional IC byl připojen 947 Professional UV/VIS Detector Vario, 941 Eluent Production Module a 858 Professional Sample Processor, vše od společnosti Metrohm. 858 Professional Sample Processor byl složen z dávkovacího karuselu a robotického ramene a pomocí peristaltického čerpadla byl vzorek nasáván z plastových (PP) zkumavek o celkovém objemu 11 ml do 20  $\mu$ l dávkovací smyčky.

## 2.2.2 Ostatní přístroje a pomůcky

Všechny pevné chemikálie byly naváženy na analytických vahách Nimbus NBL 254-i od výrobce Adam Equipment (USA). Kapalně vzorky byly vzorkovány pomocí automatických pipet (Biohit). K přípravě mobilních fází, kapalin pro regeneraci a oplach supresoru, a kalibračních roztoků byla použita deionizovaná voda (odpor  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ), která byla připravena laboratorním systémem Elga Veolia (PURELAB). Naměřená data byla vyhodnocena pomocí software MagIC Net 4.2. (Metrohm). Výsledky a grafy byly zpracovány v programu Excel Microsoft a OriginLab 2018.

## 2.3 Postup přípravy roztoků

### Příprava mobilních fází

- Při měřeních bylo použito více mobilních fází, které byly připraveny buď z čistého uhličitanu sodného nebo ze směsi uhličitanu a hydrogenuhličitanu sodného, aby se lépe odseparovaly octany a mravenčany.
- 1. Pro přípravu mobilní fáze složené z  $3,6 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3$  bylo naváženo 0,7639 g uhličitanu sodného. Tato navážka byla kvantitativně převedena do 2000ml odměrné baňky, která byla deionizovanou vodou doplněna po rysku. Stejným způsobem byly připravovány ostatní MF viz. Tabulka 6.

Tabulka 6 - Složení mobilních fází

Složení MF [ $\text{mmol/dm}^3$ ]	Navážka [g]	Objem odměrné baňky [ml]
$3,6 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3$	0,7639	2000
$2,0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3$	0,1060	500
$3,6 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 1,6 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaHCO}_3$	0,1908 + 0,0672	500
$1,8 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 1,8 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaHCO}_3$	0,1093 + 0,0530	500
$1,0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 2,6 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaHCO}_3$	0,1092 + 0,0530	500
$1,0 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 2,6 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaHCO}_3$	0,4372 + 0,2123	2000

#### Příprava regenerační kapaliny supressoru

- Při přípravě jednoho litru  $250\text{mmol/dm}^3$  kyseliny sírové bylo pomocí odměrného válce odměřeno 14,00 ml 96% kyseliny sírové a doplněno deionizovanou vodou po rysku 1000ml odměrné baňky.

#### Příprava kalibračních roztoků octanů a mravenčanů ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , $\text{HCOO}^-$ )

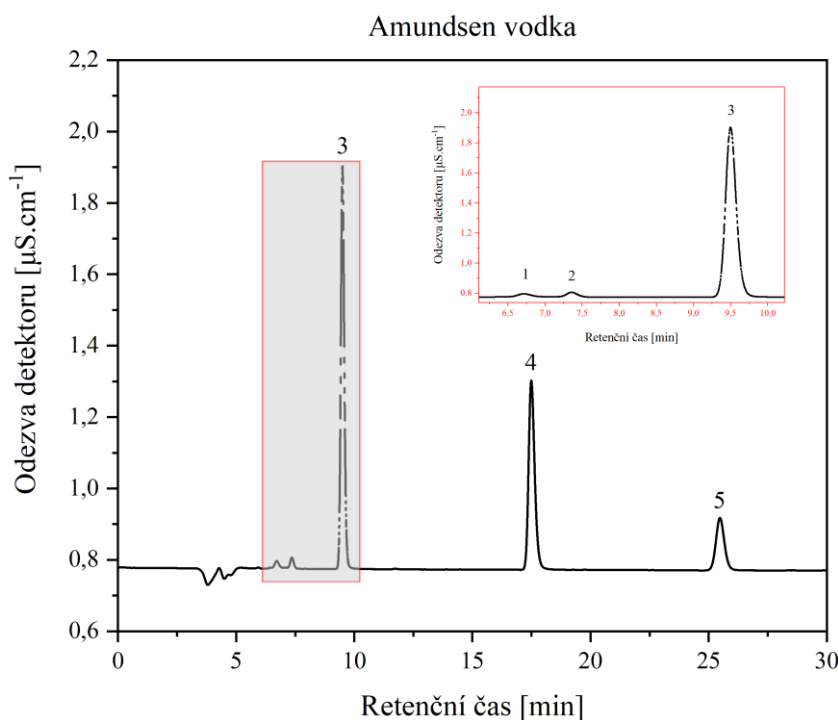
- Kalibrační roztoky mravenčanového a octanového aniontu byly připraveny o koncentracích 0,1; 1; 5; 10 a 20  $\text{mg/dm}^3$ . Např. Při koncentraci 0,1  $\text{mg/dm}^3$  bylo napipetováno 10 $\mu\text{l}$  zásobního roztoku  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ( $c = 1000 \text{ mg/dm}^3$ ) a 10 $\mu\text{l}$  zásobního roztoku  $\text{HCOONa}$  ( $c = 1000 \text{ mg/dm}^3$ ) do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněno po rysku deionizovanou vodou.

#### Příprava zásobních roztoků aniontů

- Pro většinu iontů byly využity certifikované standardní roztoky o koncentraci  $(1000\pm 4) \text{ mg/dm}^3$ . Pokud nebyl k dispozici certifikovaný standardní roztok, byl roztok aniontu připraven navážením přesné hmotnosti příslušné soli a rozpuštěním v deionizované vodě. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1000  $\text{mg/l}$  šťavelanu vápenatého, vinanu sodno-draselného a malonanu disodného.

### 3 Výsledky a diskuse

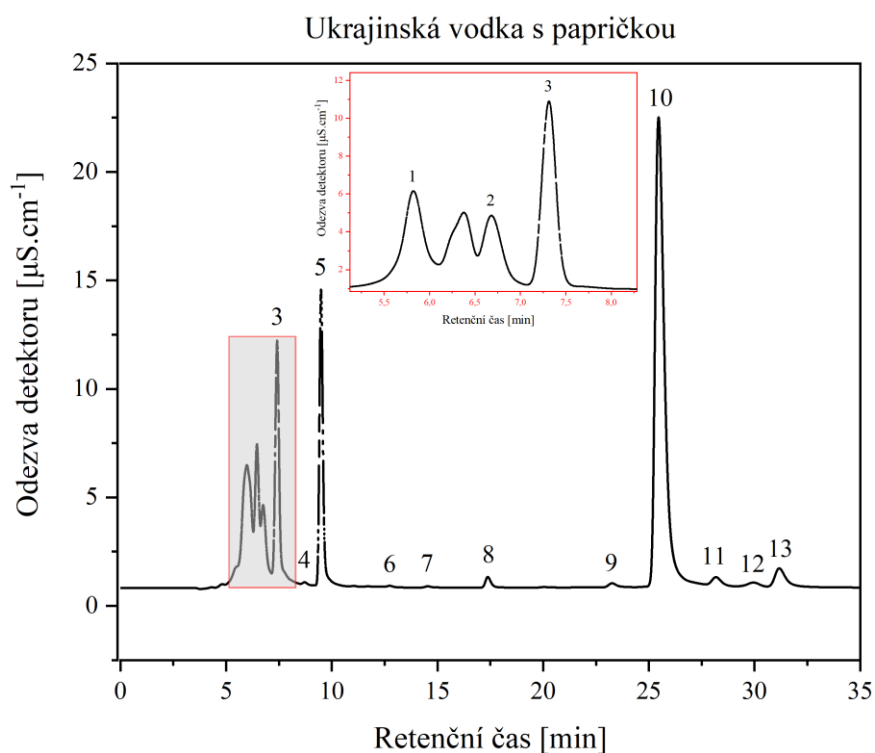
Nejdříve byl jako MF použit 3,6mmol/dm<sup>3</sup> roztok uhličitanu sodného, průtoková rychlost MF činila 0,8 ml/min, dávkovaný objem vzorku byl 20 µl a kolona byla zahřata na 45 °C. Tyto parametry byly nastaveny na základě informací z produktového listu pro použitou kolonu od firmy Metrohm. Nejprve byl u vybraných destilátů změřen retenční profil a metodou přidavku standardu byly identifikovány přítomné anionty. K měření byla vybrána Amundsen vodka, Ukrajinská vodka s papričkou, Peprmint a Becherovka. Retenční profily Retenční profily studovaných destilátů jsou demonstrovány na obrázcích 5 až 8. Při prvotních experimentech bylo zjištěno, že polypropylenové zkumavky, do kterých se odměřovaly vzorky pro následné dávkování pomocí robotického ramene, je třeba nechat přes noc naplněné deionizovanou vodou, aby nedocházelo k přenosu aniontů mezi vzorky



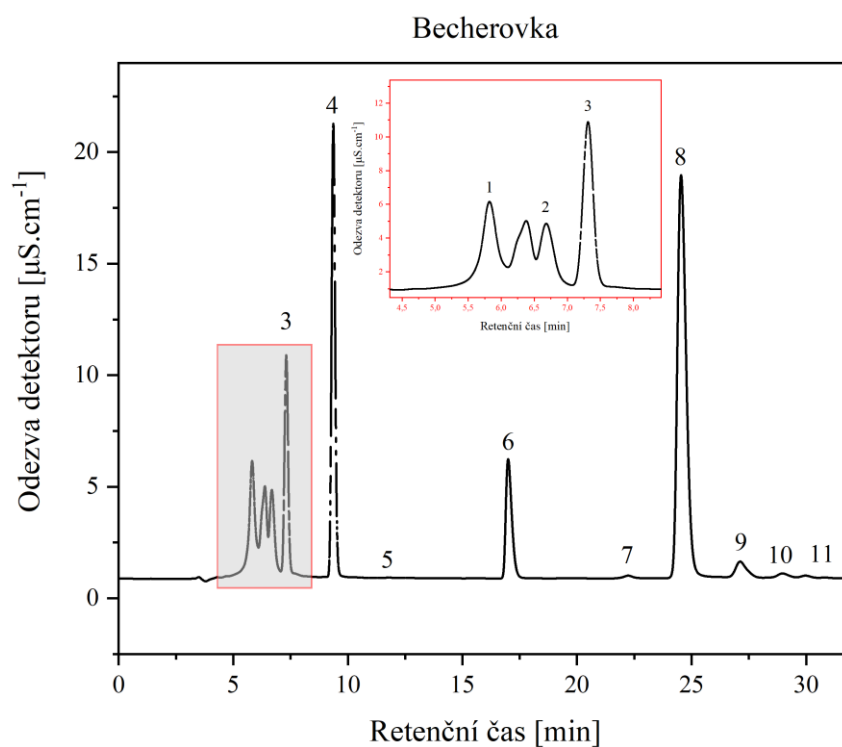
Obrázek 5 - Chromatogram Amundsen vodky. Experimentální podmínky: MF 3,6mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, průtok MF 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C. Koncentrace standardů aniontů, objem nástriku 20 µl, identifikace píků: 1=CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, 2=HCOO<sup>-</sup>, 3=Cl<sup>-</sup>, 4=NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 5=SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

Identifikace jednotlivých aniontů v naměřených chromatogramech byla provedena metodou standardního přidavku, tedy tzv. naspikováním konkrétního aniontů do čistého destilátu. Nejprve byly změřeny roztoky standardů jednotlivých aniontů v deionizované vodě, a to o koncentraci 10 mg/dm<sup>3</sup> pro každý aniont. Tím se zjistil retenční čas jednotlivých aniontů a poté byla za stejných podmínek proveden analýza na čistém destilátu se spikem konkrétního aniontu o koncentraci 10 mg/dm<sup>3</sup> pro majoritní píky a 1 mg/dm<sup>3</sup> pro minoritní píky.

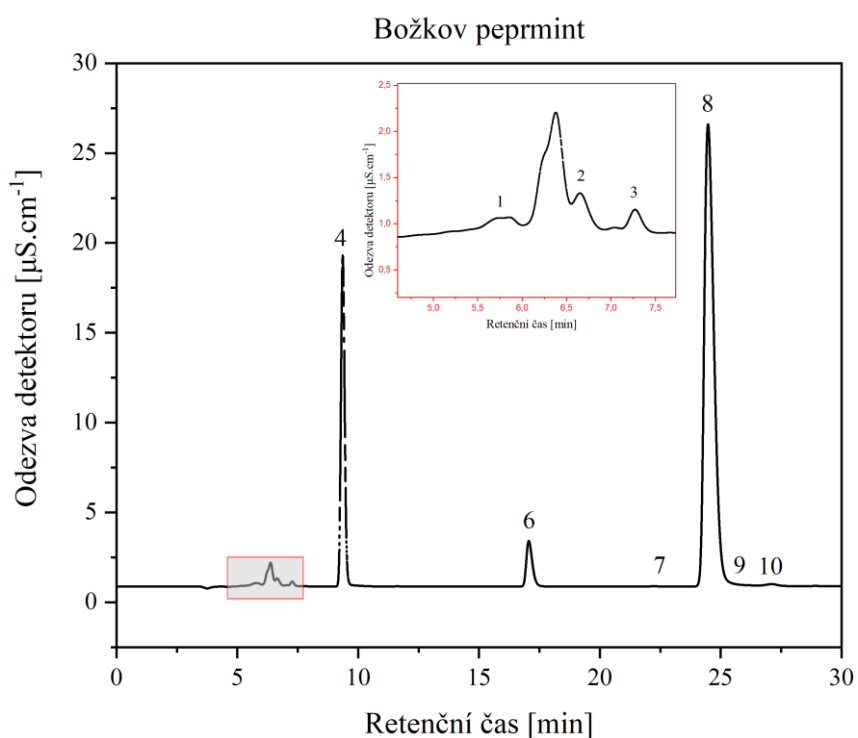
Nejčistším destilátem byla Amundsen vodka (obrázek 5), ve které byly identifikovány octany, mravenčany, chloridy, dusičnany a sírany. V ukrajinské vodce s papričkou, bylo identifikováno nejvíce aniontů, konkrétně byly identifikovány fluoridy, octany, mravenčany, bromičnany, chloridy, dusičnany, bromidy/chlorečnany dusitany, fosforečnany, sírany, vinany, malonáty a šťavelany. Pík pro  $\text{ClO}_3^-$  iont splynul s píkem  $\text{Br}^-$  aniontu, tudíž nebylo možné rozhodnout, který z aniontů se v destilátu Ukrajinská vodka nachází. V destilátu Becher byly identifikovány fluoridy, octany, mravenčany, chloridy, dusičnany, dusitany, fosforečnany, sírany, vinany, malonáty a šťavelany. Destilát Božkov peprmint obsahoval fluoridy, octany, mravenčany, chloridy, dusičnany, dusitany, fosforečnany, sírany, vinany a malonáty.



Obrázek 6 - Chromatogram ukrajinské vodky s papričkou. Experimentální podmínky:  $\text{MF } 3,6\text{mmol/dm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3$ , průtok  $\text{MF } 0,8 \text{ ml/min}$ , teplota kolony  $45^\circ\text{C}$ , objem nástřiku  $20 \mu\text{l}$ , identifikace píků: 1= $\text{F}^-$ , 2= $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , 3= $\text{HCOO}^-$ , 4= $\text{BrO}_3^-$ , 5= $\text{Cl}^-$ , 6= $\text{NO}_3^-$ , 7= $\text{Br}^-/\text{ClO}_3^-$ , 8= $\text{NO}_2^-$ , 9= $\text{PO}_4^{2-}$ , 10= $\text{SO}_4^{2-}$ , 11=Vinan, 12=Malonát, 13= Šťavelan



Obrázek 7 - Chromatogram destilátu Becher. Experimentální podmínky: MF  $3,6\text{mmol/dm}^3$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , průtok  $0,8\text{ ml/min}$ , teplota kolony  $45\text{ }^\circ\text{C}$ . Koncentrace jednotlivých iontů ve vzorku bylo  $1000\text{ mg/l}$ , objem nástřiku  $20\text{ }\mu\text{l}$ ; 1=F<sup>-</sup>, 2=CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, 3=HCOO<sup>-</sup>, 4=Cl<sup>-</sup>, 5=NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 6=NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 7=PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 8=SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 9=Vinan, 10=Malonát, 11=Šťávelan

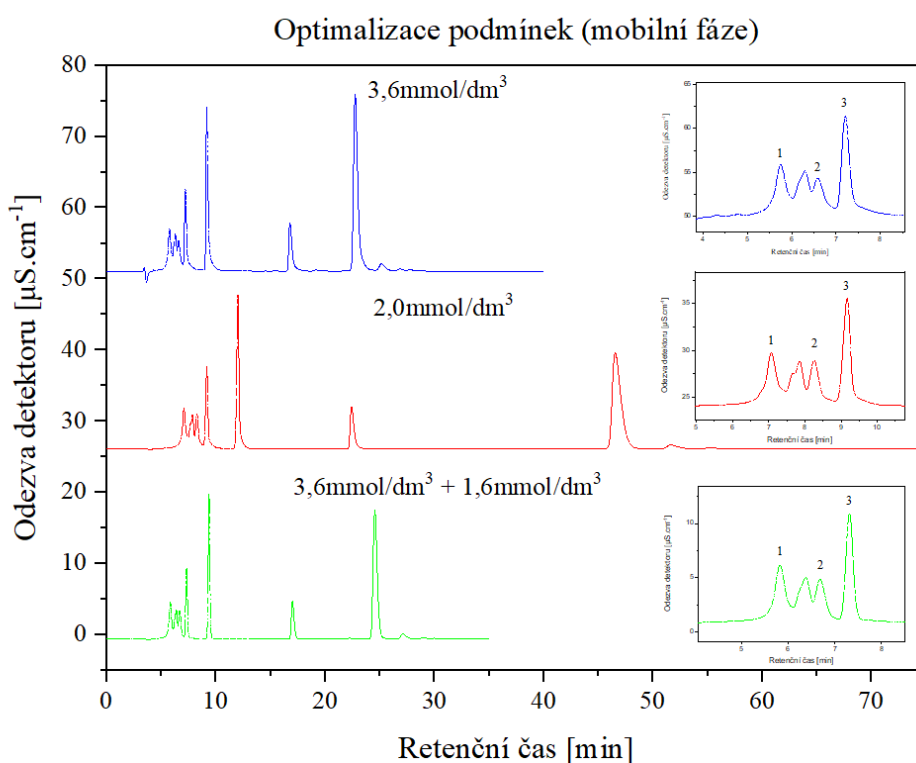


Obrázek 8 - Chromatogram Božkov pepřmint. Experimentální podmínky: MF  $3,6\text{mmol/dm}^3$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , průtok MF  $0,8\text{ ml/min}$ , teplota kolony  $45\text{ }^\circ\text{C}$ , objem nástřiku  $20\text{ }\mu\text{l}$ , identifikace píků: 1=F<sup>-</sup>, 2=CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, 3=HCOO<sup>-</sup>, 4=Cl<sup>-</sup>, 5=NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 6=NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 7=PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 8=SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 9=Vinan, 10= Malonát



### 3.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Pro nalezení nejvhodnějších separačních podmínek, byla provedena optimalizace složení mobilní fáze. Byly zkoušeny různé MF a bylo zkoumáno, jestli se nezlepšuje rozlišení píků v počáteční části chromatogramu, kde eluují fluoridy, octany a mravenčany, a současně zda se retenční časy později elujících aniontů nezkracují a tím pádem by analýzy destilátů neprobíhaly rychleji. V průběhu optimalizace složení MF byly vyzkoušeny tyto MF: 3,6mmol/dm<sup>3</sup> roztok uhličitanu sodného, 2,0mmol/dm<sup>3</sup> roztok uhličitanu sodného, směs 3,6mmol/l roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1,6mmol/l roztoku NaHCO<sub>3</sub> a směs 1,0mmol/dm<sup>3</sup> roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2,6mmol/dm<sup>3</sup> roztoku NaHCO<sub>3</sub>. Na obrázku 9. jsou zobrazeny naměřené chromatogramy pro destilát Becherovka v MF obsahujících roztok uhličitanu sodného o koncentracích 3,6mmol/l, 2,0mmol/l a směsný roztok 3,6mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,6mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>.

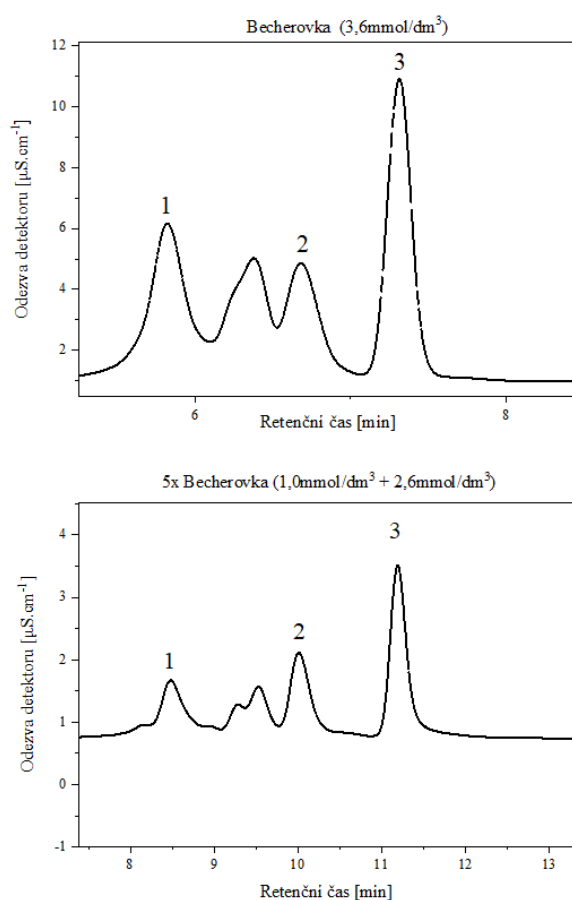


Obrázek 9 - Chromatogramy destilátu Becherovka naměřené v různých mobilních fázích. Experimentální podmínky: MF 3,6mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,0mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 3,6mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+ 1,6mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>, průtok MF 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C, objem nástřiku 20 μl, identifikace píků: 1=F<sup>-</sup>, 2=CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, 3=HCOO<sup>-</sup>.

Z obrázku 9 je zřejmé, že MF obsahující 2,0mmol/dm<sup>3</sup> uhličitan sodný oddělila počáteční píky 1, 2 a 3 (fluorid, octan a mravenčan) trochu lépe než původní MF složená z 3,6mmol/dm<sup>3</sup> uhličitanu sodného, ale čas analýzy se výrazně prodloužil. Také došlo u organických aniontů delšími retenčními časy k rozmytí píků a splnutí se šumem základní linie.

Při použití MF obsahující  $3,6\text{mmol/dm}^3 + 1,6\text{mmol/dm}^3$  MF se opět zkrátila doba analýzy, která byla srovnatelná s měřením v MF  $3,6\text{mmol/l Na}_2\text{CO}_3$ , ale rozlišení  $\text{F}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  a  $\text{HCOO}^-$  iontů bylo lepší. Přídavek hydrogenuhličitanu sodného do MF pomohl k lepšímu oddělení dříve eluujících aniontů.

K úplnému oddělení octanového iontu od neznámého píku došlo při použití MF složené z  $1,0\text{mmol/dm}^3 \text{Na}_2\text{CO}_3$  a  $2,6\text{mmol/dm}^3 \text{NaHCO}_3$ . Pro snížení vlivu matrice byl vzorek destilátu 5x zředěn. Na následujícím obrázku 10 jsou zobrazeny naměřené chromatogramy pro destilát Becherovka ve dvou MF, a to původní MF složené z  $3,6\text{mmol/l Na}_2\text{CO}_3$  a optimalizované MF složené z  $1,0\text{mmol/dm}^3 \text{Na}_2\text{CO}_3$  a  $2,6\text{mmol/dm}^3 \text{NaHCO}_3$ .



Obrázek 10 - Srovnání úvodní části naměřených chromatogramů pro: (MF  $3,6\text{mmol/dm}^3 \text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 2. 5x zředěná Becherovka ( $1,0\text{mmol/dm}^3 \text{Na}_2\text{CO}_3 + 2,6\text{mmol/dm}^3 \text{NaHCO}_3$ ), průtok MF  $0,8 \text{ ml/min}$ , teplota kolony  $45^\circ\text{C}$ , objem nástřiku  $20 \mu\text{l}$ , identifikace píků: 1= $\text{F}^-$ , 2= $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , 3= $\text{HCOO}^-$ .

V rámci optimalizace separačních podmínek byl sledován vliv teploty na retenční chování fluoridů, octanů a mravenčanů, které eluují blízko sebe. Kromě doposud používané teploty separační kolony  $45^\circ\text{C}$  byla vyzkoušena také teplota  $40^\circ\text{C}$  a  $50^\circ\text{C}$ . Nižší ani vyšší teplota kolony nezlepšily rozlišení fluoridů, octanů a mravenčanů, proto byla pro měření nadále využívána teplota kolony  $45^\circ\text{C}$ .

### 3.2 Validace metody

Optimalizovaná mobilní fáze umožnila validovat metodu pro současné stanovení mravenčanu a octanu ve vybraných destilátech. Proto byla výsledková část rozšířena o validaci metody pro stanovení octanu a o vyhodnocení koncentrace octanu ve vzorcích destilátů.

#### 3.2.1 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody byla vyhodnocena pro měření roztoků standardu mravenčanu a octanu o koncentraci 0,1 mg/dm<sup>3</sup> a 5 mg/dm<sup>3</sup>. Měření stejného roztoku bylo provedeno ve dvou dnech, každý den bylo provedeno 7 opakovaných měření. Pro vyhodnocení opakovatelnosti metody byly vypočítány hodnoty směrodatné odchylky  $s$  a relativní směrodatné odchylky  $s_r$  podle rovnic 2 a 3 (viz oddíl 1.7.1 Preciznost metody) pro plochu píku, výšku píku a retenční čas. Naměřené hodnoty ploch píků, výšek píků a retenčních časů pro mravenčanu jsou shrnuty v Tabulce 7, pro octany v Tabulce 8. V Tabulkách 7 a 8 jsou také uvedeny vypočítané hodnoty směrodatné odchylky ploch píků, výšek píků a retenčních časů mravenčanu.

Tabulka 7 - Vyhodnocení opakovatelnosti metody pro koncentraci mravenčanu 0,1 a 5 mg/dm<sup>3</sup>

Koncentrace mravenčanu 0,1 mg/dm <sup>3</sup>			Koncentrace mravenčanu 5 mg/dm <sup>3</sup>		
Plocha [μS·cm <sup>-1</sup> ·min]	Výška [μS·cm <sup>-1</sup> ·l·mg <sup>-1</sup> ]	Ret.čas [min]	Plocha [μS·cm <sup>-1</sup> ·min]	Výška [μS·cm <sup>-1</sup> ·l·mg <sup>-1</sup> ]	Ret.čas [min]
0,031	0,128	11,09	1,261	4,983	11,02
0,031	0,124	11,06	1,269	4,924	11,04
0,030	0,123	11,08	1,222	4,957	11,03
0,025	0,103	11,04	1,274	4,981	11,04
0,030	0,125	11,06	1,285	4,987	10,97
0,029	0,125	11,02	1,267	5,064	10,95
0,029	0,122	10,96	1,266	4,961	11,00
0,031	0,122	10,95	1,265	4,978	11,00
			1,284	4,909	11,00
			1,286	4,985	11,03
			1,282	4,996	11,02

<b>0,030</b>	0,122	11,03	<b>Průměr</b>	1,283	4,963	11,02	
<b>0,0019</b>	0,0072	0,049	<i>s</i>	1,272	5,005	10,99	
<b>6,3</b>	6,0	0,45	<i>s<sub>r</sub> (%)</i>	1,270	4,976	11,01	<b>Průměr</b>
				0,016	0,037	0,026	<i>s</i>
				1,3	0,73	0,24	<i>s<sub>r</sub> (%)</i>

Nejhorsí opakovatelnost byla zjištěna pro plochu píků a koncentraci mravenčanu 0,1 mg/dm<sup>3</sup>. Hodnota *s<sub>r</sub>* byla 6,3 % pro plochu píku mravenčanu. Pro výšku píku a koncentraci mravenčanu 0,1 mg/dm<sup>3</sup> byla hodnota *s<sub>r</sub>* 5,9 % a pro retenční čas 0,60 %. Pro koncentraci mravenčanu 5 mg/dm<sup>3</sup> byla hodnota *s<sub>r</sub>* pro plochu píku 1,3 %, pro výšku píku 0,73 % a retenční čas 0,24 %.

Tabulka 8 - Vyhodnocení opakovatelnosti metody pro koncentraci octanu 0,1 a 5 mg/dm<sup>3</sup>

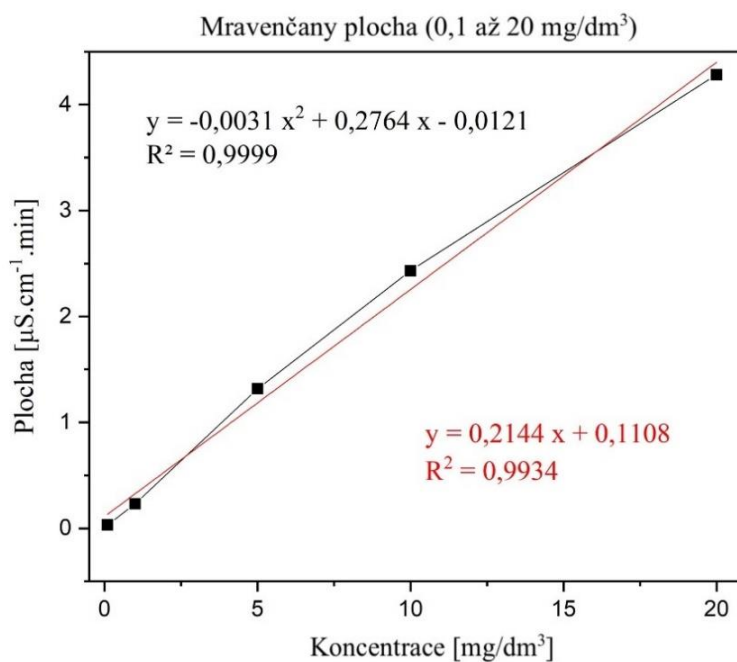
Koncentrace octanu 0,1 mg/dm <sup>3</sup>			Koncentrace octanu 5 mg/dm <sup>3</sup>				
Plocha [μS·cm <sup>-1</sup> ·min]	Výška [μS·cm <sup>-1</sup> ·l·mg <sup>-1</sup> ]	Ret.čas [min]	Plocha [μS·cm <sup>-1</sup> ·min]	Výška [μS·cm <sup>-1</sup> ·l·mg <sup>-1</sup> ]	Ret.čas [min]		
<b>0,016</b>	0,059	9,92	0,627	2,098	9,86		
<b>0,016</b>	0,056	9,89	0,629	2,092	9,86		
<b>0,015</b>	0,056	9,91	0,630	2,047	9,87		
<b>0,015</b>	0,058	9,87	0,617	2,083	9,86		
<b>0,016</b>	0,059	9,89	0,633	2,099	9,87		
<b>0,016</b>	0,058	9,84	0,645	2,081	9,81		
<b>0,016</b>	0,059	9,75	0,647	2,135	9,79		
<b>0,017</b>	0,062	9,76	0,642	2,081	9,84		
<b>0,016</b>	0,059	9,79	0,636	2,096	9,83		
	0,056	9,79	0,636	2,047	9,84		
		9,80	0,643	2,099	9,86		
<b>0,016</b>	0,058	9,83	<b>Průměr</b>	0,648	2,06	9,85	
<b>0,0006</b>	0,002	0,056	<i>s</i>	0,644	2,101	9,84	
<b>3,78</b>	3,1	0,57	<i>s<sub>r</sub> (%)</i>	0,64	2,09	9,84	<b>Průměr</b>
				0,009	0,023	0,023	<i>s</i>
				1,39	1,11	0,23	<i>s<sub>r</sub> (%)</i>

U octanu byla nejhorší opakovatelnost pro plochu píku při koncentraci 0,1 mg/dm<sup>3</sup>. Hodnota  $s_r$  byla 3,8 %. Pro výšku píku a koncentraci 0,1 mg/dm<sup>3</sup> byla hodnota  $s_r$  3,1 % a pro retenční čas 0,57 %. Pro koncentraci octanů 5 mg/dm<sup>3</sup> byla hodnota  $s_r$  pro plochu píku 1,4 %, pro výšku píku 1,11 % a retenční čas 0,23 %.

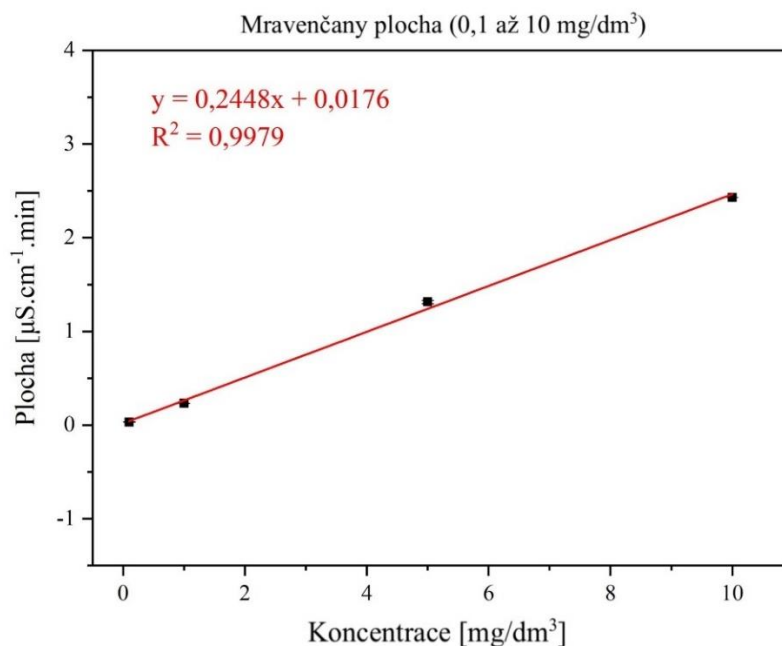
Nižší preciznost vyjádřená jako opakovatelnost metody byla vyhodnocena pro koncentraci 0,1 mg/dm<sup>3</sup>, a to především z důvodu nižší opakovatelnosti dávkovacího procesu s využitím otočného karuselu a peristaltického čerpadla, které plnilo vzorek do 20 μl smyčky. Ze čtrnácti opakovaných měření bylo ve skutečnosti nadávkováno a vyhodnoceno osm měření. Pro koncentraci 5 mg/dm<sup>3</sup> došlo k chybnému dávkování jen jednou, pro vyhodnocení opakovatelnosti tedy bylo zpracováno 13 opakovaných měření.

### 3.2.2 Kalibrační závislost a linearita

Za optimalizovaných experimentálních podmínek byly změřeny směsné kalibrační roztoky octanového a mravenčanového aniontu v deionizované vodě, každý o koncentraci 0,1; 1; 5; 10 a 20 mg/dm<sup>3</sup>. Každá koncentrační hladina byla změřena třikrát a mediány ploch byly vyneseny do kalibračního grafu, který je uveden na obrázku 11 pro rozsah koncentrace mravenčanu 0,1 až 20 mg/dm<sup>3</sup> a na obrázku 12 pro rozsah koncentrace mravenčanu 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup>. Vynesenými body byly proloženy regresní křivky a byly vypočítány koeficienty determinace.



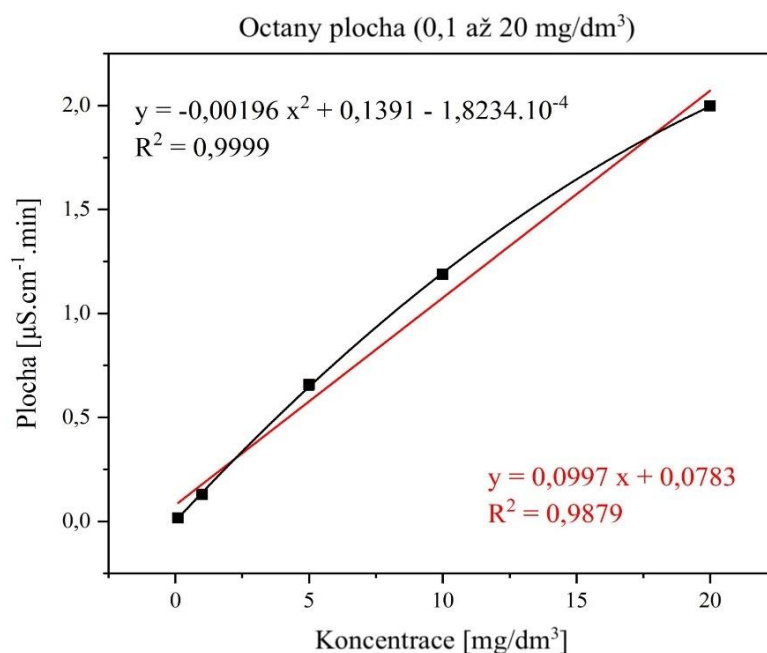
Obrázek 11 - Kalibrační závislost pro mediány ploch mravenčanů v koncentracích 0,1 až 20 mg/dm<sup>3</sup>, Experimentální podmínky: MF 1,0 mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2,6 mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>, průtok MF 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C, objem nástřiku 20 μl.



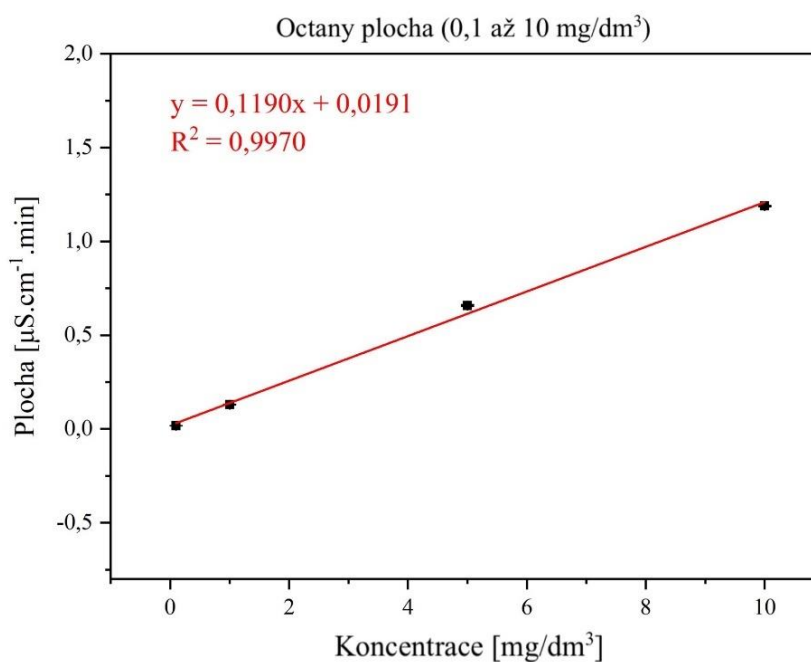
Obrázek 12 - Kalibrační závislost pro mediány ploch mravenčanu v koncentracích 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup>, Experimentální podmínky: MF 1,0mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2,6mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>, průtok MF 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C, objem nástřiku 20  $\mu\text{l}$ .

Z kalibračních grafů na obrázcích 11 a 12 je vidět, že pro kalibrační závislost plochy píku mravenčanu v koncentračním rozsahu 0,1 až 20 mg/dm<sup>3</sup> má koeficient determinace nižší hodnotu ( $R^2 = 0,9934$ ) než pro koncentrační rozsah 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup> ( $R^2 = 0,9979$ ). Nejlepší proložení experimentálních bodů poskytl polynom druhého stupně s hodnotou koeficientu determinace ( $R^2 = 0,9999$ ). Proložení vynesných bodů regresní přímkou v rozsahu koncentrací mravenčanu 0,1 mg/dm<sup>3</sup> až 10 mg/dm<sup>3</sup> vykazuje vyšší linearitu než v celém měřeném rozsahu koncentrace mravenčanu (0,1 – 20 mg/dm<sup>3</sup>), proto pro kvantifikaci mravenčanu ve vybraných destilátech a pro vyhodnocení výtěžnosti metody byla využita rovnice regresní přímky v rozsahu koncentrace mravenčanového aniontu 0,1 mg/dm<sup>3</sup> až 10 mg/dm<sup>3</sup>, viz. obrázek 12.

Mediány naměřených ploch octanu byly vyneseny do kalibračního grafu, který je uveden na obrázku 14 pro rozsah koncentrace octanu 0,1 až 20 mg/dm<sup>3</sup> a na obrázku 13 pro rozsah koncentrace octanu 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup>. Vynesnými body byly proloženy regresní křivky a byly vypočítány koeficienty determinace.



Obrázek 13 - Kalibrační přímka pro mediány ploch octanů v koncentračním rozsahu 0,1 až 20 mg/dm<sup>3</sup>, Experimentální podmínky: MF 1,0mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2,6mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>, průtok MF 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C, objem nástříku 20 μl.



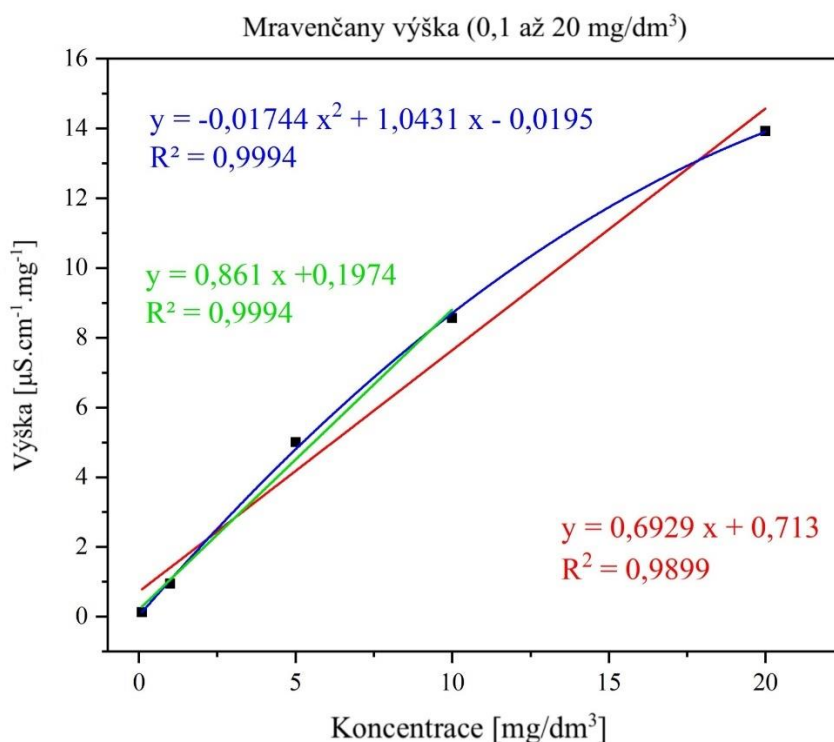
Obrázek 14 - Kalibrační přímka pro mediány ploch octanů v koncentračním rozsahu 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup>, Experimentální podmínky: MF 1,0mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2,6mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>, průtok MF 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C, objem nástříku 20 μl.

Z kalibračních grafů na obrázcích 13 a 14 lze pozorovat, že lineární kalibrační závislost pro plochy píku octanu v rozsahu koncentrací 0,1 až 20 mg/dm<sup>3</sup> má koeficient determinace R<sup>2</sup>=0,9879, je tedy nižší, než poskytl polynom druhého stupně, který má hodnotu R<sup>2</sup>=0,9999.

Stejně jako u mravenčanu byla pro vyhodnocení obsahu octanů v destilátech a pro vyhodnocení výtěžnosti metody využita rovnice regresní přímky v rozsahu koncentrace octanu 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup> s koeficientem determinace R<sup>2</sup>=0,9970.

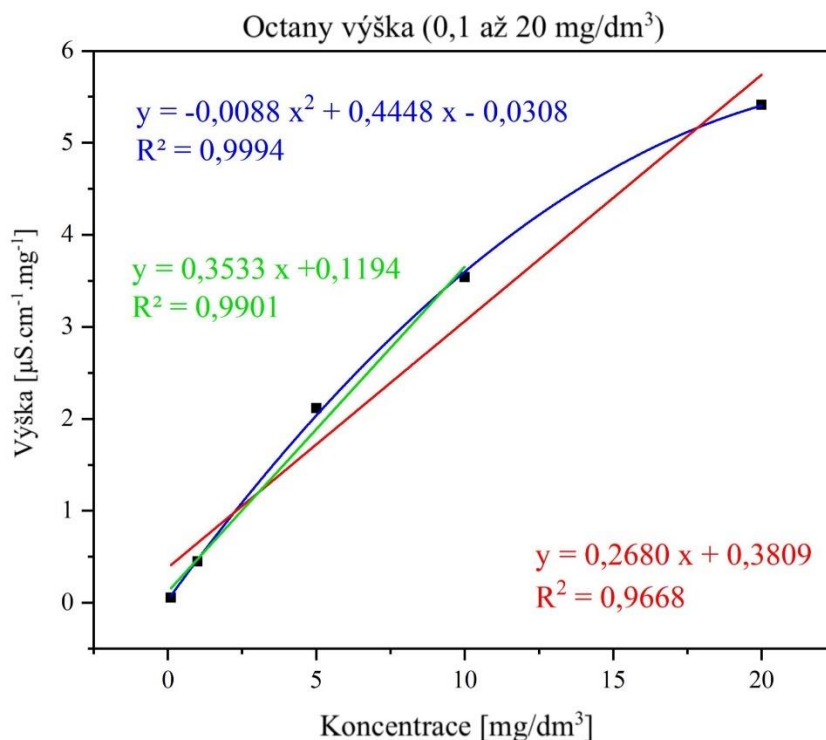
### 3.2.3 Určení meze detekce a meze stanovitelnosti

Pro určení meze detekce a meze stanovitelnosti byla celkem třináctkrát odečtena hodnota výšky šumu základní linie. Průměrná hodnota výšky šumu byla 0,002636 μS·cm<sup>-1</sup>. Z této hodnoty výšky šumu a směrnice lineární části kalibrační závislosti výšek píků na koncentraci mravenčanu (viz obrázek 14) nebo na koncentraci octanu (viz obrázek 15, rozsah koncentrace 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup>) byly s využitím rovnic 7 a 8 z oddílu 1.7.4 (Mez detekce a stanovitelnosti) vypočítány následující hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Směrnice regresní přímky pro závislost výšky píku mravenčanu na koncentraci má hodnotu 0,861 μS·cm<sup>-1</sup>·l·mg<sup>-1</sup>, pro výšku píku octanu 0,3533 μS·cm<sup>-1</sup>·l·mg<sup>-1</sup>.



Obrázek 15 - Kalibrační závislost pro mediány výšek píků mravenčanu v koncentračním rozsahu 0,1 až 20 mg/dm<sup>3</sup> (červená a modrá křivka) a 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup> (zelená křivka). Experimentální podmínky: MF 1,0mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2,6mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>, průtok MF 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C, objem nástřiku 20 μl.





Obrázek 16 - Kalibrační závislost pro mediány výšek píků octany v koncentračním rozsahu 0,1 až 20 mg/dm<sup>3</sup> (červená a modrá křivka) a 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup> (zelená křivka). Experimentální podmínky: MF 1,0mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2,6mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>, průtok MF 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C, objem nástřiku 20 μl.

Mez detekce pro mravenčany v rozsahu má hodnotu 0,01 (0,009) mg/dm<sup>3</sup>, a mez stanovitelnosti hodnotu 0,03 (0,031) mg/dm<sup>3</sup>. Pro octany má mez detekce hodnotu 0,02 (0,022) mg/l a mez stanovitelnosti 0,075 (0,07).

### 3.3 Stanovení mravenčanů ve vzorcích destilátů

V optimalizované mobilní fázi byly třikrát proměřeny 5x zředěné vzorky těchto destilátů: Becherovka, ukrajinská vodka s papričkou a Pepermint. Důvodem ředění bylo potlačení vlivu matrice a zlepšení rozlišení dříve eluujících píků a také aby naměřené plochy píku mravenčanu ležely v lineárním rozsahu kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci, tedy v rozsahu 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup>.

Naměřené plochy píků jsou uvedeny v Tabulce 9. a jejich dosazením do rovnice kalibrační přímky pro plochu píku mravenčanu ve tvaru  $y = 0,2448x + 0,0176$  (viz obrázek 13) byl vypočítán obsah mravenčanů v 5x zředěných destilátech. Výtěžnost metody byla ověřena proměřením 5x zředěných destilátů s přidavkem 3 mg/dm<sup>3</sup> mravenčanu. V rámci ověření výtěžnosti byl každý vzorek změřen třikrát. Pro výpočet výtěžnosti byla využita rovnice 4. a 5. z oddílu 1.7.2 (Pravdivost). Vypočítané hodnoty koncentrací po přidavku 3 mg/dm<sup>3</sup> standardu mravenčanu a hodnoty výtěžností jsou shrnuty v Tabulce 10.

Tabulka 9 - Plochy piků v 5x zředěných destilátech

<b>Plocha:</b>		<b><math>y = 0,2448x + 0,0176</math></b>						
<b>5x UK</b>	<b>y</b>	<b>x</b>	<b>5x Becherovka</b>	<b>y</b>	<b>x</b>	<b>5x Pepermint</b>	<b>y</b>	<b>x</b>
	0,561	2,22		0,682	2,71			-
	0,550	2,17		0,682	2,71			-
	0,548	2,17		0,679	2,70		0,003	-
<b>medián</b>		2,17			2,71			-

Výtěžnost metody byla ověřena proměřením 5x zředěných destilátů s přidavkem standardu mravenčanu o koncentraci 3 mg/dm<sup>3</sup>. V rámci ověření výtěžnosti byl každý vzorek změřen třikrát. Pro výpočet výtěžnosti byla využita rovnice 6 z oddílu 1.7.2 (Pravdivost). Vypočítané hodnoty koncentrací mravenčanu po přidavku 3 mg/dm<sup>3</sup> standardu mravenčanu a hodnoty výtěžností jsou shrnuty v Tabulce 10.

Tabulka 10 - Ověření výtěžnosti metody mravenčanu pro 5x zředěné destiláty

<b>Koncentrace mravenčanu [mg/dm<sup>3</sup>]</b>			
	<b>5x UK</b>	<b>5x Becherovka</b>	<b>5x Pepermint</b>
<b>Před přidavkem</b>			
<b>medián</b>	2,17	2,71	pod LOQ
<b>s</b>	0,023	0,006	
<b>s<sub>r</sub> (%)</b>	1,07	0,21	
<b>Po přidavku</b>			
<b>medián</b>	5,21	5,47	
<b>s</b>	0,115	0,0042	
<b>s<sub>r</sub> (%)</b>	2,21	0,76	
<b>výtěžnost, %</b>			
<b>medián</b>	101,3	92,2	
<b>s</b>	4,59	1,33	
<b>s<sub>r</sub> (%)</b>	4,54	1,44	

Naměřená plocha mravenčanu v 5x zředěném destilátu Peprmin je zhruba 10x menší než plocha pro kalibrační roztok mravenčanu o koncentraci 0,1 mg/dm<sup>3</sup>. Obsah mravenčanu v tomto destilátu se tedy pohybuje okolo 0,01 mg/dm<sup>3</sup>, což je pod hodnotou LOQ a mravenčanu v destilátu nelze kvantifikovat.

Koncentrace mravenčanů byla vypočítána také pro neředěné destiláty, vypočítané hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 11. V neředěných vzorcích destilátů byly vypočítány tyto koncentrace mravenčanů: ukrajinská vodka s papričkou ( $10,87 \pm 0,13$ ) mg/dm<sup>3</sup> ( $n=3$ ,  $sr=1,07$  %), Becherovka ( $13,57 \pm 0,03$ ) mg/dm<sup>3</sup> ( $n=3$ ,  $sr=0,21$  %).

Tabulka 11 - Koncentrace mravenčanů vypočítané pro neředěné destiláty

<b>Koncentrace mravenčanů [mg/dm<sup>3</sup>]</b>			
	<b>UK</b>	<b>Becherovka</b>	<b>Peppermint</b>
	11,1	13,6	-
	10,9	13,6	-
	10,8	13,5	-
			-
<b>medián</b>	10,9	13,6	-
<b>s</b>	0,117	0,029	-
<b>sr (%)</b>	1,07	0,21	-
<b>Interval spolehlivosti</b>	0,13	0,03	-

### 3.4 Stanovení octanů ve vzorcích destilátů

Naměřené plochy píků octanů v 5x zředěných destilátech jsou uvedeny v Tabulce 11 a jejich dosazením do rovnice kalibrační přímky pro plochu píku octanu ve tvaru  $y = 0,1190x + 0,0191$  (viz obrázek 14) byl vypočítán obsah octanů v 5x zředěných destilátech. Vypočítané hodnoty koncentrace octanů v 5x zředěných destilátech jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12 - Plochy píků v 5x zředěných destilátech

<b>Plocha:</b>		<b><math>y=0,1190x+ 0,0191</math></b>						
<b>5x UK</b>	<b>y</b>	<b>x</b>	<b>5x Becherovka</b>	<b>y</b>	<b>x</b>	<b>5x Peppermint</b>	<b>y</b>	<b>x</b>
	0,246	1,91		0,295	2,71		0,235	1,81
	0,235	1,81		0,303	2,71		0,282	2,21
	0,247	1,91		0,308	2,70		0,343	-
<b>medián</b>		1,91			2,71			2,01

Výtěžnost metody byla ověřena proměřením těchto 5x zředěných destilátů s přidavkem standardu octanu o koncentraci 3 mg/dm<sup>3</sup> octanu, přičemž každý vzorek byl

změřen třikrát. Výsledky jsou shrnuty Vypočítané koncentrace octanu po přidavku 3 mg/dm<sup>3</sup> standardu octanu a hodnoty výtěžností jsou shrnuty v Tabulce 13.

Tabulka 13 - Výsledky stanovení octanů v 5x zředěných destilátech a ověření výtěžnosti metody

	Koncentrace octanů [mg/dm <sup>3</sup> ]		
	UK	Becherovka	Peppermint
<b>Před přidavkem</b>			
<b>medián</b>	1,91	2,39	2,01
<i>s</i>	0,046	0,045	0,197
<i>s<sub>r</sub></i> (%)	2,40	1,89	9,82
<b>Po přidavku</b>			
<b>medián</b>	5,23	4,75	5,31
<i>s</i>	0,103	0,099	0,196
<i>s<sub>r</sub></i> (%)	2,169	2,086	3,705
<b>výtěžnost, %</b>			
<b>medián</b>	114,01	80,95	103,36
<i>s</i>	3,594	2,302	5,835
<i>s<sub>r</sub></i> (%)	3,153	2,844	5,645

Koncentrace octanů byla vypočítána také pro neředěné destiláty, vypočítané hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 14.

Tabulka 14 - Koncentrace octanů vypočítané pro neředěné destiláty

	Koncentrace mravenčanů [mg/dm <sup>3</sup> ]		
	UK	Becherovka	Peppermint
	9,53	11,59	9,07
	9,07	11,93	11,05
	9,58	12,14	13,61
<b>medián</b>	9,53	11,93	11,05
<i>s</i>	0,231	0,224	0,987
<i>s<sub>r</sub></i> (%)	2,42	1,89	8,94
<b>Interval spolehlivosti</b>	0,26	0,25	1,12

V neředěných vzorcích destilátů byly stanoveny následující koncentrace octanů: ukrajinská vodka s papričkou (9,53±0,26) mg/dm<sup>3</sup> (*n*=3, *s<sub>r</sub>*=2,42 %), Becherovka (11,93±0,25) mg/dm<sup>3</sup> (*n*=3, *s<sub>r</sub>*=1,89 %), Peppermint (11,05±1,12) mg/dm<sup>3</sup> (*n*=3, *s<sub>r</sub>*=8,94 %).

## 4 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na optimalizaci složení mobilní fáze pro efektivní stanovení mravenčanů a octanů ve vybraných destilátech pomocí iontové chromatografie. Optimalizace mobilní fáze na 3,6 mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1,6 mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub> zkrátila dobu analýzy a zlepšila rozlišení iontů ve srovnání s původní mobilní fází 3,6 mmol/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. K úplnému oddělení octanového iontu od neznámého píku došlo při použití mobilní fáze s 1,0 mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2,6 mmol/dm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>.

V rámci cíle identifikace aniontů byly ve všech třech destilátech identifikovány octany, mravenčany, chloridy, dusičnany a síran. V Ukrajinské vodce s papričkou, Becherovce a Peprmintce byly navíc nalezeny fluoridy, fosforečnany, dusitany, vinany a malonáty, které se v Amundsen vodce nevyskytují. Ukrajinská vodka a Becherovka obsahují rovněž šťavelany.

Pro mravenčany a octany byly stanoveny mez detekce a mez stanovitelnosti s využitím průměrné hodnoty šumu slepého pokusu a lineární části kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci příslušného aniontu, tedy v rozsahu koncentrace 0,1 až 10 mg/dm<sup>3</sup>. Mez detekce pro mravenčany má hodnotu 0,009 mg/dm<sup>3</sup>, zatímco mez stanovitelnosti činila 0,031 mg/dm<sup>3</sup>. Pro octany má mez detekce hodnotu 0,022 mg/dm<sup>3</sup> a mez stanovitelnosti 0,075 mg/dm<sup>3</sup>. Hodnoty výtěžnosti metody se pohybovaly v intervalu 92 % až 101 % pro mravenčany a 80 % až 114 % pro octany. Pravdivost použité analytické metody je tedy vyšší pro mravenčany.

Opakovatelnost měření ukázala různé úrovně preciznosti měření. Nejhorší opakovatelnost byla zaznamenána při koncentraci 0,1 mg/dm<sup>3</sup> pro mravenčany, Tabulka 7., kde byla hodnota  $s_r$  (relativní směrodatná odchylka) 6,3 % pro plochu píku a 5,9 % pro výšku píku. Při koncentraci mravenčanů 5 mg/dm<sup>3</sup> byla hodnota  $s_r$  pro plochu píku 1,3 % a pro výšku píku 0,73 %. U octanů byla horší opakovatelnost rovněž zaznamenána při koncentraci 0,1 mg/dm<sup>3</sup>, Tabulka 8., kde  $s_r$  pro plochu píku činila 3,8 % a pro výšku píku 3,1 %. Při koncentraci octanů 5 mg/l byla hodnota  $s_r$  pro plochu píku 1,4 % a pro výšku píku 1,11 %. Opakovatelnost retenčních časů byla velmi dobrá, hodnota  $s_r$  se pohybovala mezi 0,23 až 0,60 %.

Analýzou 5x zředěných destilátů a následným přepočtem byly u neředěných vzorků destilátů získány následující výsledky: Koncentrace mravenčanů byly určeny jako (10,87±0,13) mg/dm<sup>3</sup> v destilátu ukrajinská vodka s papričkou ( $n=3$ ,  $s_r=1,07$  %) a (13,57±0,03) mg/dm<sup>3</sup> v Becherovce ( $n=3$ ,  $s_r=0,212$  %), viz. Tabulka 10. Koncentrace octanů byly (9,53±0,26) mg/dm<sup>3</sup> v ukrajinské vodce s papričkou ( $n=3$ ,  $s_r=2,42$  %), (11,93±0,25) mg/dm<sup>3</sup> v Becherovce ( $n=3$ ,  $s_r=1,89$  %) a (11,05±1,12) mg/dm<sup>3</sup> v Peprmintu ( $n=3$ ,  $s_r=8,94$  %).

## 5 Reference

- [1] Rajmund Michalski, “Recent Development and Applications of Ion Chromatography,” vol. 1, no. 2, pp. 90–99, 2014.
- [2] J. S. Fritz, “Early milestones in the development of ion-exchange chromatography: a personal account,” *J Chromatogr A*, vol. 1039, no. 1, pp. 3–12, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.068>.
- [3] O. B. Acikara, “Ion-Exchange Chromatography and Its Applications,” in *Column Chromatography*, D. F. Martin and B. B. Martin, Eds., Rijeka: IntechOpen, 2013, p. Ch. 2. doi: 10.5772/55744.
- [4] P. Janoš, “Retention models in ion chromatography: the role of side equilibria in ion-exchange chromatography of inorganic cations and anions,” *J Chromatogr A*, vol. 789, no. 1, pp. 3–19, 1997, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00696-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00696-1).
- [5] J. S. Fritz, “Ion Chromatography,” *Anal Chem*, vol. 59, no. 4, pp. 335A–344A, Feb. 1987, doi: 10.1021/ac00131a737.
- [6] A. Antczak-Chrobot, P. Bąk, and M. Wojtczak, “The use of ionic chromatography in determining the contamination of sugar by-products by nitrite and nitrate,” *Food Chem*, vol. 240, pp. 648–654, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.158>.
- [7] Y. Kitamaki, J.-Y. Jin, and T. Takeuchi, “Simultaneous determination of inorganic nitrogen species by microcolumn ion chromatography,” *J Chromatogr A*, vol. 1003, no. 1, pp. 197–202, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00836-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00836-7).
- [8] E. L. C. Silveira, L. B. de Caland, and M. Tubino, “Simultaneous quantitative analysis of the acetate, formate, chloride, phosphate and sulfate anions in biodiesel by ion chromatography,” *Fuel*, vol. 124, pp. 97–101, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.095>.
- [9] Rajmund Michalski, “Application of ion chromatography in clinical studies and pharmaceutical industry,” *Mini Rev Med Chem*, vol. 14, no. 10, pp. 862–72, 2014.
- [10] K. Horváth and P. Hajós, “Retention profiles and mechanism of anion separation on latex-based pellicular ion exchanger in ion chromatography,” *J Chromatogr A*, vol. 1104, no. 1, pp. 75–81, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.064>.

- [11] P. Hatsis and C. A. Lucy, "Effect of temperature on retention and selectivity in ion chromatography of anions," *J Chromatogr A*, vol. 920, no. 1, pp. 3–11, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01226-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01226-7).
- [12] J. Crommen, G. Schill, D. Westerlund, and L. Hackzell, "Indirect detection in liquid chromatography I. Response models for reversed-phase ion-pairing systems," *Chromatographia*, vol. 24, no. 1, pp. 252–260, 1987, doi: [10.1007/BF02688487](https://doi.org/10.1007/BF02688487).
- [13] P. Haddad, "Ion chromatography," *Anal Bioanal Chem*, vol. 379, pp. 341–343, Jul. 2004, doi: [10.1007/s00216-004-2572-7](https://doi.org/10.1007/s00216-004-2572-7).
- [14] C. A. Pohl, J. R. Stillian, and P. E. Jackson, "Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography," *J Chromatogr A*, vol. 789, no. 1, pp. 29–41, 1997, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00705-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00705-X).
- [15] Y. Chen, L. Jing, X. Li, and Y. Zhu, "Suppressed anion chromatography using mixed zwitter-ionic and carbonate eluents," *J Chromatogr A*, vol. 1118, no. 1, pp. 3–11, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.074>.
- [16] H. Schäfer, M. Läubli, and R. Dörig, "Ion Chromatography 2 nd Edition."
- [17] L. Barron and B. Paull, "Direct detection of trace haloacetates in drinking water using microbore ion chromatography: Improved detector sensitivity using a hydroxide gradient and a monolithic ion-exchange type suppressor," *J Chromatogr A*, vol. 1047, no. 2, pp. 205–212, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.100>.
- [18] Z. Plzák, "Detekční schopnost analytické metody, mez detekce, mez stanovitelnosti," *Metodické listy* 7, 2011.
- [19] V. Červený *et al.*, *KVALIMETRIE Stručný přehled metrologie v chemii*, Eurachem-ČR. Ústí nad Labem, 2018.
- [20] J. G. Ferry, "Formate dehydrogenase," *FEMS Microbiol Rev*, vol. 7, no. 3–4, pp. 377–382, Dec. 1990, doi: [10.1111/j.1574-6968.1990.tb04940.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04940.x).
- [21] R. Castillo, M. Oliva, S. Martí, and V. Moliner, "A Theoretical Study of the Catalytic Mechanism of Formate Dehydrogenase," *J Phys Chem B*, vol. 112, no. 32, pp. 10012–10022, Aug. 2008, doi: [10.1021/jp8025896](https://doi.org/10.1021/jp8025896).

- [22] K. G. Kidd and H. H. Mantsch, "Formate anion: The physical force field," *J Mol Spectrosc*, vol. 85, no. 2, pp. 375–389, 1981, doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2852\(81\)90210-1](https://doi.org/10.1016/0022-2852(81)90210-1).
- [23] K. Leung and S. B. Rempe, "Ab Initio Molecular Dynamics Study of Formate Ion Hydration," *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 1, pp. 344–351, Jan. 2004, doi: [10.1021/ja036267q](https://doi.org/10.1021/ja036267q).
- [24] S. Kage, K. Kudo, H. Ikeda, and N. Ikeda, "Simultaneous determination of formate and acetate in whole blood and urine from humans using gas chromatography–mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 805, no. 1, pp. 113–117, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.029>.
- [25] O. DESTANOĞLU, M. GÜLER, and G. GÜMÜŞ YILMAZ, "SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FLUORIDE, ACETATE, FORMATE, CHLORIDE, NITRATE, AND SULFATE IN DISTILLED ALCOHOLIC BEVERAGES WITH ION CHROMATOGRAPHY/CONDUCTIVITY DETECTOR," *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, vol. 7, no. 3, pp. 661–674, 2020, doi: [10.18596/jotcsa.700636](https://doi.org/10.18596/jotcsa.700636).
- [26] M. Balcerzak and D. Kapica, "Fast Ion Chromatographic Method for the Determination of Formates in Alcoholic Drinks," *Food Anal Methods*, vol. 10, no. 7, pp. 2358–2364, 2017, doi: [10.1007/s12161-017-0812-7](https://doi.org/10.1007/s12161-017-0812-7).
- [27] A.W.Jones, "Clinical and forensic toxicology of methanol". *Forensic Sci Rev.* 2021 Jul;33(2):117-143. PMID: 34247144.
- [28] H. W. Gibson, "THE CHEMISTRY OF FORMIC ACID AND ITS SIMPLE DERIVATIVES.", *Chem. Rev.* Jan;27, pp. 673-692, 1969, doi: [10.1021/cr60261a005](https://doi.org/10.1021/cr60261a005)
- [29] A. J. Paine and A. D. Dayan, "Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks," *Hum Exp Toxicol*, vol. 20, no. 11, pp. 563–568, Nov. 2001, doi: [10.1191/096032701718620864](https://doi.org/10.1191/096032701718620864).
- [30] M. Pietzke, J. Meiser, and A. Vazquez, "Formate metabolism in health and disease," *Mol Metab*, vol. 33, pp. 23–37, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.05.012>.
- [31] Metrohm, "Manual for 850 Professional IC, 2.850.2010 - Anion8." [Online]. Available: [www.metrohm.com](http://www.metrohm.com)