

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI STANOVENÍ TĚKAVÝCH MASTNÝCH KYSELIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LENKA SVÍTILOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI STANOVENÍ TĚKAVÝCH MASTNÝCH KYSELIN

THE POSSIBILITIES OF THE ASSESSMENT OF VOLATILE FATTY ACIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

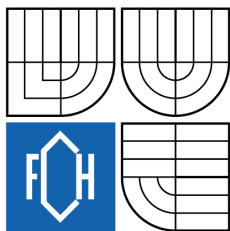
LENKA SVÍTILOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0371/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Lenka Svítlová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Eva Vítová, Ph.D.**
Konzultanti bakalářské práce:

Název bakalářské práce:

Možnosti stanovení těkavých mastných kyselin

Zadání bakalářské práce:

Zpracování literární rešerše zaměřené na:

- charakteristiku těkavých mastných kyselin
- výskyt, vlastnosti, strukturu a názvosloví
- možnosti stanovení těkavých mastných kyselin

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Lenka Svítlová
Student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá obecnou charakteristikou mastných kyselin, popisem struktury a názvosloví těkavých mastných kyselin, vlastnostmi a oblastmi jejich výskytu.

Dále jsou zmapovány možnosti identifikace těkavých mastných kyselin, mezi které se řadí plynová chromatografie, plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, mikroextrakce pevnou fází, spektrofotometrie a izotachoforéza.

Plynová chromatografie je nejvyužívanější metodou detekce těkavých mastných kyselin. Při stanovení se tyto látky vzhledem k jejich chemickým vlastnostem většinou převádějí na methylestery.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with common characteristics of fatty acids by description of the structure and terminology of volatile fatty acids, by description of the characteristics and areas of their occurrence.

Then possibilities of identification of volatile fatty acids are charted, to which gas chromatography, gas chromatography-mass spectrometry, high performance liquid chromatography, solid phase microextraction, spectrophotometry and isotachopheresis belong.

Gas chromatography is the most frequently used method of the detection of volatile fatty acids. During the assessment these substances are mostly converted to methylesters because of their chemical characteristics.

KLÍČOVÁ SLOVA

těkavé mastné kyseliny, GC

KEYWORDS

volatile fatty acids, GC

SVÍTILOVÁ, L. *Možnosti stanovení těžkých mastných kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 34 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

*Děkuji Ing. Evě Vítové, Ph.D. a RNDr. Hannelovi Dubskému, CSc.
za všestrannou pomoc při zpracování této bakalářské práce.*

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Obecná charakteristika mastných kyselin	8
2.2	Struktura a názvosloví těkavých mastných kyselin.....	8
2.3	Vlastnosti.....	9
2.4	Výskyt	10
3	STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN	13
3.1	Stanovení těkavých kyselin.....	13
3.2	Izotachoforéza	13
3.2.1	Experimentální uspořádání.....	14
3.2.2	Detektory.....	14
3.2.3	Využití izotachoforézy	14
3.3	Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra.....	14
3.3.1	Absorpční spektrofotometr.....	15
3.3.2	Příklady spektrofotometrického stanovení.....	16
3.4	Plynová chromatografie (Gas chromatography – GC).....	16
3.4.1	Instrumentace	17
3.4.1.1	Zdroj nosného plynu, mobilní fáze	17
3.4.1.2	Regulační systém.....	18
3.4.1.3	Čistící zařízení.....	18
3.4.1.4	Injektor (dávkovač).....	18
3.4.1.5	Kolony a stacionární fáze pro plynovou chromatografii.....	19
3.4.1.6	Termostat.....	19
3.4.1.7	Detektory.....	20
3.4.1.8	Vyhodnocovací zařízení.....	22
3.4.2	Použití plynové chromatografie	22
3.5	Plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (Gas chromatography-Mass spectrometry – GC-MS).....	22
3.5.1	Instrumentace hmotnostního spektrometru	23
3.5.2	Připojení plynového chromatografu k hmotnostnímu spektrometru.....	23
3.5.3	Aplikační oblast GC-MS.....	24
3.5.4	Analýza těkavých mastných kyselin pomocí GC-MS.....	24
3.6	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)	24
3.6.1	Instrumentace HPLC	25
3.6.1.1	Mobilní fáze v HPLC	26
3.6.1.2	Stacionární fáze v HPLC.....	26
3.6.1.3	Detektory.....	26
3.6.2	Využití kapalinové chromatografie.....	26
3.6.3	Analýza těkavých mastných kyselin pomocí HPLC	27
3.7	Extrakce pevnou fází (Solid Phase Extraction – SPE).....	27
3.7.1	Instrumentace SPE	28
3.7.2	Využití SPE.....	28
3.7.3	Analýza těkavých mastných kyselin pomocí SPME.....	28

4	ZÁVĚR.....	30
5	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	31
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	34

1 ÚVOD

Jako mastné kyseliny se označují nasycené alifatické karboxylové kyseliny, jejichž název má původ v jejich hlavním zdroji – tuku. Mastné kyseliny jsou nejvýznamnější složkou lipidů, které se řadí mezi skupinu látek biologického původu nerozpustných ve vodě, ale dobře rozpustných v nepolárních rozpouštědlech.

Některé mastné kyseliny se však nenacházejí v přírodních lipidech, ale mohou se vyskytovat v průmyslových tukových výrobcích.

Mastné kyseliny s počtem uhlíků nižším než deset se nazývají těkavé mastné kyseliny. Jsou to silně polární kapalné látky, které se vypařují již při pokojové teplotě.

Cílem této bakalářské práce je charakterizace těkavých mastných kyselin a popis možností jejich stanovení, zejména pomocí metody plynové chromatografie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecná charakteristika mastných kyselin

V přírodě bylo nalezeno více než 50 různých mastných kyselin. V organismech se vyskytují mastné kyseliny nejčastěji ve formě esterů. Kyseliny s více než 10 až 12 atomy uhlíku se v buňkách ve volné formě za normálních podmínek nenacházejí, jejich vysoká povrchová aktivita by narušovala biologické struktury [1, 2].

Nenasycené řetězce tvoří více než polovinu zbytků rostlinných a živočišných mastných kyselin. Dvojně vazby v mastných kyselinách jsou vždy v *cis*-konfiguraci. První se většinou objevuje mezi atomy uhlíku C₍₉₎ a C₍₁₀₎. Pokud se nachází v uhlíkovém řetězci více dvojných vazeb, bývají vůči sobě na každém třetím uhlíku, takže netvoří konjugovaný systém [1].

Některé mastné kyseliny vázané v lipidech patří mezi alicyklické nebo aromatické sloučeniny [3]. Bakteriální mastné kyseliny bývají zpravidla rozvětvené, hydroxylované, nebo obsahují cyklopropanové kruhy [1].

Mastné kyseliny s větším počtem nenasycených vazeb si některé živočišné druhy včetně člověka nedokáží syntetizovat, a proto jsou pro ně esenciální složkou potravy [4].

2.2 Struktura a názvosloví těkavých mastných kyselin

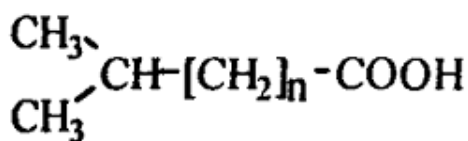
Obecný vzorec monokarboxylových kyselin je R-COOH. Systematické názvy monokarboxylových kyselin se tvoří z názvu příslušného uhlovodíku, který obsahuje stejný počet atomů uhlíku jako kyselina, příponou -ová. Odtržením -OH skupiny z karboxylu zůstávají acylovové zbytky R-CO- [5].

Vedle systematických názvů, odvozených od odpovídajících uhlovodíků, se užívají i triviální názvy, které zejména u obvyklých mastných kyselin v běžné praxi převládají (Tabulka 2.1) [3].

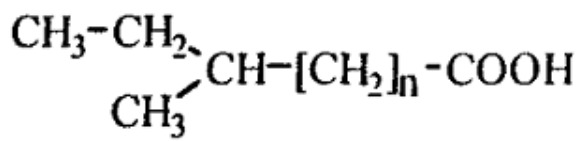
I latinské názvy tvoří základ pro názvosloví funkčních derivátů kyselin, ale jednotlivé jazyky disponují také vlastními názvy neodvozenými od latinských [6].

Těkavé mastné kyseliny obsahují 2 až 7 atomů uhlíku [7, 8], (jiné zdroje uvádějí maximální počet atomů uhlíku 10 [9]) a zpravidla rovný, nerozvětvený řetězec. Mastné kyseliny se sudým počtem atomů uhlíku jsou v malém množství doprovázeny mastnými kyselinami s lichým počtem atomů uhlíku.

Mastné kyseliny, které mají boční řetězec tvořený jediným uhlíkem, se nazývají methylderiváty. Methylskupina je nejčastěji vázána na předposledním atomu uhlíku (*n*-1). Tyto kyseliny se obecně označují jako isokyseliny (Obr. 2.1). Pokud se methylskupina váže na třetí atom uhlíku od konce (*n*-2), jedná se o anteisokyseliny (Obr. 2.2). Mezi mastné kyseliny s rozvětveným uhlovodíkovým řetězcem se řadí např. kyseliny 3-methylbutanová (isovalerová) a 2,2-dimethylpropanová (pivalová) [3].



Obr. 2.1: Isokyseliny



Obr. 2.2: Anteisokyseliny [3]

Tabulka 2.1: Přehled těkavých mastných kyselin [6, 10]

Název kyseliny (systematický)	Název kyseliny (triviální)	Strukturní vzorec
metanová	mravenčí	HCOOH
etanová	octová	CH ₃ COOH
propanová	propionová	CH ₃ CH ₂ COOH
butanová	máselná	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH
methylpropanová	isomáselná	(CH ₃) ₂ CHCOOH
pentanová	valerová	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH
2-methylbutanová	isovalerová	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COOH
3-methylbutanová	methylethylactová	(CH ₃)(C ₂ H ₅)CHCOOH
2,2-dimethylpropanová	pivalová	(CH ₃) ₃ CCOOH
hexanová	kapronová	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH
heptanová	enanthová	CH ₃ (CH ₂) ₅ COOH
oktanová	kaprylová	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH
nonanová	pelargonová	CH ₃ (CH ₂) ₇ COOH
dekanová	kaprinová	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH

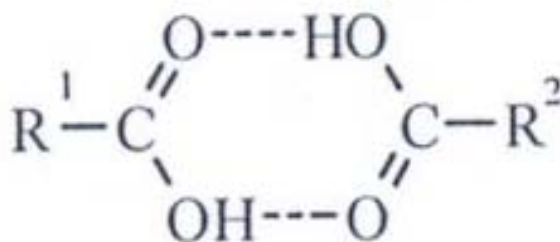
2.3 Vlastnosti

Karboxylové kyseliny patří mezi polární a velmi reaktivní sloučeniny. Karboxylová skupina se vyznačuje výrazně kyselými vlastnostmi, protože snadno odštěpuje proton. Je to způsobeno spojením hydroxylové skupiny se skupinou karbonylovou, která svým –I–efektem usnadňuje disociaci ve vodném roztoku. Vzniklý anion se stabilizuje díky delokalizaci π –elektronů a existují zde dvě rovnocenné vazby [5].

Síla kyselin závisí zejména na povaze uhlovodíkového zbytku a je charakterizována disociační konstantou. Karboxylové kyseliny se řadí do skupiny slabých kyselin, avšak kyseliny mravenčí a octová patří mezi podstatně silnější kyseliny, než jsou vyšší homology této řady [3, 5, 11].

Nižší mastné kyseliny jsou bezbarvé kapaliny těkající za atmosférického tlaku. Bod tání závisí na počtu atomů uhlíku. Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků mají o něco nižší bod tání než sudé mastné kyseliny o jeden atom uhlíku chudší [3]. Hustota v homologické řadě klesá [10].

Teploty varu jsou vzhledem k jejich molekulové hmotnosti nepoměrně vysoké, protože tvoří intermolekulární vodíkové vazby. Při teplotě varu jsou kapalné mastné kyseliny asociovány vodíkovými vazbami svých karboxylových skupin jako dimery, které mohou existovat dokonce i v plynném stavu (Obr. 2.3) [3, 5, 6].

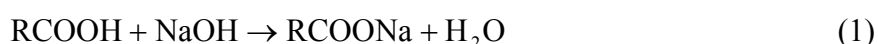


Obr. 2.3: Asociace karboxylových mastných kyselin [3]

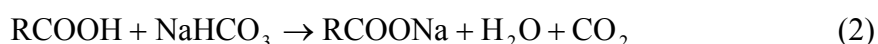
Karboxylové kyseliny se rozpouštějí v méně polárních rozpouštědlech (ether, benzen, ethanol apod.) [6].

Mastné kyseliny obsahující krátký uhlíkový řetězec jsou s vodou mísitelné nebo rozpustné. Rozpustnost ve vodě klesá s rostoucím počtem atomů uhlíku v řetězci, protože v malých molekulách dominuje hydrofilní karboxylová skupina, ale ve větších molekulách se stává dominantním uhlovodíkový zbytek (Tabulka 2.2) [3, 5].

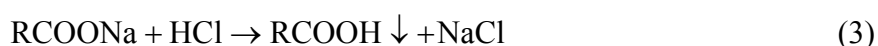
Většina solí karboxylových kyselin je ve vodě rozpustná, avšak rozpustnost v nepolárních sloučeninách se snižuje. Této skutečnosti lze využít k oddělení karboxylových kyselin tak, že se např. z roztoku směsi organických látek v nepolárním rozpouštědle extrahují zředěným roztokem hydroxidu sodného (přecházejí do vodné vrstvy jako sodné soli):



Při použití slabší báze NaHCO_3 místo NaOH lze takto selektivně extrahovat kyseliny na rozdíl od fenolů:



Z vodných roztoků RCOONa se získá opět (méně rozpustná) kyselina RCOOH okyselením minerální kyselinou, např.:



[6].

Tabulka 2.2: Vlastnosti některých mastných kyselin [6]

Název kyseliny (triviální)	Bod tání °C	Bod varu °C	Hustota $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$	Index lomu n_D^{20}	Bod vzplanutí °C	Rozpustnost g/100 g H_2O
mravenčí	8,5	100,8	1220	1,3714	68	∞
octová	16,63	119,9	1049,2	1,3716	40	∞
propionová	-21	140,8	993,4	1,3865	51	∞
máselná	-5,3	163,3	958,2	1,3980	77	∞
isomáselná	-46	154	950	1,3925	55	17
valerová	-33,7	185,5	939	1,4080	88	4,97
pivalová	35,5	163,8	905 ⁻⁵⁰	1,3931 ²⁷	63	2,5
kapronová	-4,0	205,7	926,5	1,4168	104	0,968

2.4 Výskyt

Volné mastné kyseliny vzniklé hydrolýzou lipidů za katalytického působení hydrolas se vyskytují v rostlinných a živočišných organismech pouze v omezeném množství.

Ve většině případech bývají vázány jako estery nebo amidy v homolipidech a heterolipidech. Jiné mastné kyseliny jsou specifické jen pro mikroorganismy, rostliny, živočichy, určité rody, čeledě nebo řády. Mají tudíž význam v taxonomii.

Nasycené mastné kyseliny s lichým počtem uhlíkových atomů jsou poměrně vzácné a vyskytují se jen jako stopové složky [3].

Nasyčené mastné kyseliny s kratším řetězcem, např. kyselina máselná a skupina kyselin s 6–10 uhlíky v molekule, jsou typické pro mléčný tuk (kravský, buvolí) [3, 12]. Kombinací margarínu – jedlého roztíratelného tuku ve formě emulze vody v oleji a mléčného tuku vznikají směsné roztíratelné tuky (Tabulka 2.3) [12].

Tabulka 2.3: Složení hlavních mastných kyselin mléčného tuku (% veškerých mastných kyselin) [3]

Mastná kyselina	Kravské mléko	Mateřské mléko
máselná	2,8–4,0	4–8
kapronová	1,4–3,0	1–4
kaprylová	0,5–1,7	2–4
kaprinová	1,7–3,2	2–6

Na vzájemném poměru mastných kyselin závisí jak významné fyzikálně-chemické vlastnosti tuků, tak jejich nutriční hodnota. Množství i spektrum jednotlivých mastných kyselin v tukové složce potravin může hrát jistou roli v prevenci kardiovaskulárních onemocnění.

Mezi potraviny s vysokým počtem nasycených mastných kyselin se řadí např. máslo, sýry, tučné maso, masné výrobky (uzeniny, paštiky), tučné mléčné výrobky, pečivo, sádlo, ztužené tuky, palmový a kokosový olej [12].

Tuky z palmových semen disponují obecně malým množstvím olejové kyseliny a jen stopami kyselin s vyšším počtem dvojných vazeb; typickým příkladem je kokosový nebo palmojádrový tuk [3].

Kokosové ořechy obsahují sice menší celkový obsah tuků (36 %), ale téměř 90 % z nich tvoří nasycené mastné kyseliny s kratšími či středně dlouhými uhlovodíkovými řetězci: C 6:0, C 8:0, C 10:0, C 12:0, C 14:0 (Tabulka 2.4) [12].

Tabulka 2.4: Složení hlavních mastných kyselin tuků palmových semen (% veškerých mastných kyselin) [3]

Mastná kyselina	Kokosový ^{a)}	Palmojádrový ^{b)}	Babassu ^{c)}
kapronová	0,0–0,6	0,0–0,8	–
kaprylová	4,6–9,4	2,1–4,7	2,6–7,3
kaprinová	5,5–7,8	2,6–4,5	1,2–7,6

^{a)} Z endospermu palmy kokosové (*Cocos lucifera*). ^{b)} Z endospermu semen palmy olejné (*Elaeis guineensis*). ^{c)} V Brazílii z endospermu semen palmy corozo (*Orbignya speciosa*).

Trávení a vstřebávání tuků je velmi komplikovaným procesem. Působením enzymů dochází k hydrolýze lipidů na triacylglyceroly a mastné kyseliny s dlouhým uhlíkatým řetězcem. Relativně polární mastné kyseliny s řetězcem o 10 uhlících a kratším se však neprevádějí na triacylglyceroly, ale vstřebávají se přímo. Následně jsou transportovány krevním oběhem do jater, kde se metabolizují a nemají teda vliv na obsah cholesterolu v LDL a na intenzitu srážení LDL v krevní plazmě [13].

Těkavé mastné kyseliny (octová, propionová, mléčná a máselná) vznikají působením bifidogenní mikroflóry. Bakterie mléčného kvašení, zejména bifidobakterie vstupující do organismu při konzumaci kysaných mléčných výrobků, přežívají v prostředí trávicího traktu

a jejich produkty vykazují různé zdraví prospěšné vlastnosti. Bifidogenní mikroflóra zajišťuje β -oxidací hydrolyzu prebiotik (nestravitelných složek potravy – převážně komplexní cukry) na monomerní jednotky a následně je metabolizuje na těkavé mastné kyseliny a plyny (CO_2 , H_2 , CH_4). Vznikající krátké řetězce mastných kyselin představují nejen zdroj energie, ale také stimulují střevní peristaltiku. Kyselina máselná má navíc ochranný vliv na buňky intestinální mukosy. Kyselina octová a mléčná snižují pH, na základě čehož se zlepšuje absorpce některých minerálů (vápník, železo) ve střevech a klesá počet patogenních organismů (*Clostridium perfringens*), které kyselé prostředí nesnášejí [14].

Rozvětvené karboxylové kyseliny a jejich estery – známé přírodní aromatické sloučeniny se nacházejí v ovoci a sýrech. Přítomnost racemických směsí těchto látek v potravinách může znamenat jejich užití jako umělých aditiv, což není vždy povoleno.

2-methylbutanová kyselina a její methyl- a ethyl- estery byly nalezeny v opticky čisté (*S*)-formě v jablkách, kterým propůjčují příjemně ovocné sladké aroma. Rovněž všechny přírodní jablečné produkty obsahují opticky čistou (*S*)-2-methylbutanovou kyselinu. Přídavek umělé racemické sloučeniny je snadno rozpoznatelný, (*R*)-enantiomer této kyseliny disponuje pronikavým sýrově nasládlým zápachem.

3-methylpentanová, 4-methyloktanová, 4-ethylloktanová a 4-methylnonanová kyselina byly detekovány v sýrech. Ve všech případech vykazovaly (*S*)-enantiomery dvojnásobně nižší práh zápalu než (*R*)-enantiomery. Je tedy zřejmé, že stáří resp. kvalitu sýrů lze určovat podle zastoupení (*R*)-forem příslušných kyselin, a to jak na základě pouhého čichu, tak instrumentální analytickou metodou [15].

3 STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN

3.1 Stanovení těkavých kyselin

Jednou z možností stanovení těkavých kyselin je tato:

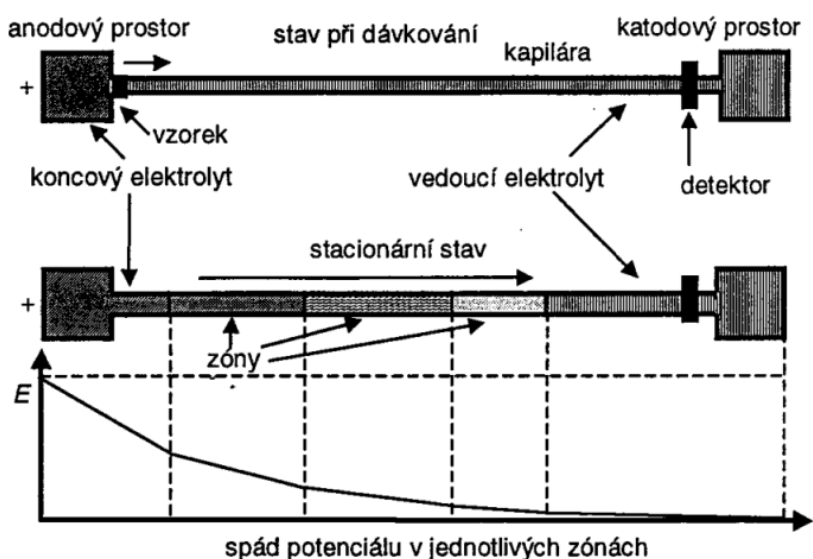
Těkavé kyseliny se oddestilují s vodní parou a stanoví se alkalimetry titrací odměrným roztokem hydroxidu na indikátor fenolftalein. Vyjadřují se jako kyselina octová. Metoda se používá na stanovení těkavých kyselin ve šťávách, vínech, okurkách, rybách apod.

Mezi instrumentální metody využívané ke stanovení jednotlivých karboxylových kyselin patří kapilární plynová chromatografie, izotachoforéza, spektrofotometrie a kapalinová chromatografie [16, 17].

3.2 Izotachoforéza

Izotachoforéza se začleňuje mezi elektromigrační separační metody. Vzorek se vnáší mezi dva elektrolyty s odlišnou pohyblivostí iontů. Oddělují se buď jenom kationty, nebo jen anionty. Jestliže se separují kationty (pro separaci aniontů je postup analogický), vzorek se vnese mezi vedoucí elektrolyt, jehož kationty mají větší pohyblivost, a koncový elektrolyt, jehož kationty disponují nižší pohyblivostí než jakýkoliv kation vzorku. Vedoucí elektrolyt se na začátku izotachoforézy nachází v katodovém prostoru a v koloně, koncový elektrolyt v anodovém prostoru. Kromě separovaných iontů jsou vždy obsaženy i opačně nabitě protionty, díky nimž je zachována v zónách elektroneutralita [18].

Po spuštění separačního napětí se vzorek začne dělit podle pohyblivosti svých složek. Rychlejší kationty se dostávají dopředu a pomalejší se opožďují. Po určité době se ustaví stacionární stav, ve kterém tvoří jednotlivé kationty zóny seřazené za sebou podle klesající pohyblivosti. Ve stacionárním stavu se zóny pohybují stálou a stejnou rychlostí. Koncentrace iontu uvnitř zóny je konstantní. Závisí na jeho elektroforetické pohyblivosti, koncentraci a druhu vedoucího elektrolytu. Méně pohyblivé ionty se pohybují stejně rychle jako ionty pohyblivější proto, že v každé zóně vzniká jiný gradient potenciálu (potenciálový spád). Gradient potenciálu se vytváří tím vyšší, čím méně pohyblivé ionty se v zóně nacházejí, tudíž na méně pohyblivé ionty působí větší hnací síla (Obr. 3.1) [18, 19].



Obr. 3.1: Schéma izotachoforézy a průběh potenciálu v zónách [18]

3.2.1 Experimentální uspořádání

K separaci dochází v teflonové kapiláře o vnitřním průměru cca 0,5 mm a délky cca 50 cm. Zařízení obsahuje zásobníky na vedoucí a koncový elektrolyt a vzorek. Elektrodové prostory odděluje frit, která brání proniknutí produktů elektrolyzy do kapiláry [18].

3.2.2 Detektory

Detektory se dělí na dvě skupiny:

- **Univerzální** – odezva je určena pohyblivostí iontů v zóně.
Vodivostní – měří vodivost zóny procházející přes detektor.
Teplotní (termočlánky, termistory) – měří teplotu v určitém místě kapiláry.
- **Specifické** – odezva je určena jinými vlastnostmi látky v zóně než elektroforetickou pohyblivostí. Zejména se využívá fotometrický detektor sledující absorpci ultrafialového záření [18].

3.2.3 Využití izotachoforézy

Izotachoforéza našla uplatnění v analýze vod, nápojů, půd, hnojiva a vzorcích biologického původu. Dále se této metody využívá při separaci a stanovení alifatických a aromatických karboxylových sloučenin, fenolů, aldehydů a jiných organických sloučenin, ale také anionů nebo kationů prvků [18, 20].

3.3 Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra

Molekuly pohlcují elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek, což je dáno jejich schopností excitovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Pokud molekula přejde ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, absorbuje záření o frekvenci ν , která odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami E_p a E_q obou kvantových stavů podle Bohrovy frekvenční podmínky:

$$\Delta E = E_p - E_q = h\nu = hc/\lambda \quad (4)$$

kde c je rychlost světla, λ vlnová délka h Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s); podle konvence se excitovaná hladina označuje indexem p , základní indexem q .

Přechody mezi elektronovými energetickými hladinami jsou energeticky nejnáročnější. Způsobuje je absorpce ultrafialového (190–400 nm) a viditelného záření (400–800 nm). Absorpci záření lze měřit na přístrojích zvaných absorpční spektrofotometry [21].

Pokud na vzorek dopadá monochromatické záření, poklesne v důsledku absorpce původní zářivý tok dopadajícího paprsku Φ_0 na hodnotu Φ . Poměr obou zářivých toků τ se nazývá propustnost (transmittance):

$$\tau = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (5)$$

Dekadický logaritmus převrácené hodnoty propustnosti se nazývá absorbance A :

$$A = -\log \tau \quad (6)$$

Závislost propustnosti nebo absorbance na vlnové délce představuje absorpční spektrum vzorku. Absorbance roztoku absorbující látky při vlnové délce λ je přímo úměrná látkové koncentraci c ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Platí Lambert-Beerův zákon:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} b c = k \cdot c \quad (7)$$

Konstantu úměrnosti vyjadřuje součin vrstvy b (cm) a molárního absorpčního koeficientu při dané vlnové délce ε_{λ} , který vykazuje rozměr $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [21, 22].

Vlnové délky maxim a minim v absorpčním spektru, jeho tvar a velikost absorpčních koeficientů závisí na struktuře látky. Při absorpci záření v ultrafialové a viditelné oblasti se energie absorbovaných fotonů spotřebuje na přechod valenčních elektronů molekuly ze základního do energeticky bohatšího kvantového stavu.

Nutnou podmínkou pro absorpci záření látkou ve viditelné nebo ultrafialové oblasti je přítomnost valenčních elektronů o dostatečně nízké excitační energii v její molekule. Pokud sloučenina neobsahuje funkční skupinu s takovými elektrony (tzv. chromofor), pak v této oblasti záření neabsorbuje. Mezi tyto látky patří voda, nasycené uhlovodíky, alkoholy, ethery, estery, kyseliny, apod. Tyto sloučeniny se využívají jako vhodná rozpouštědla pro měření spekter látek, které v této oblasti absorbují.

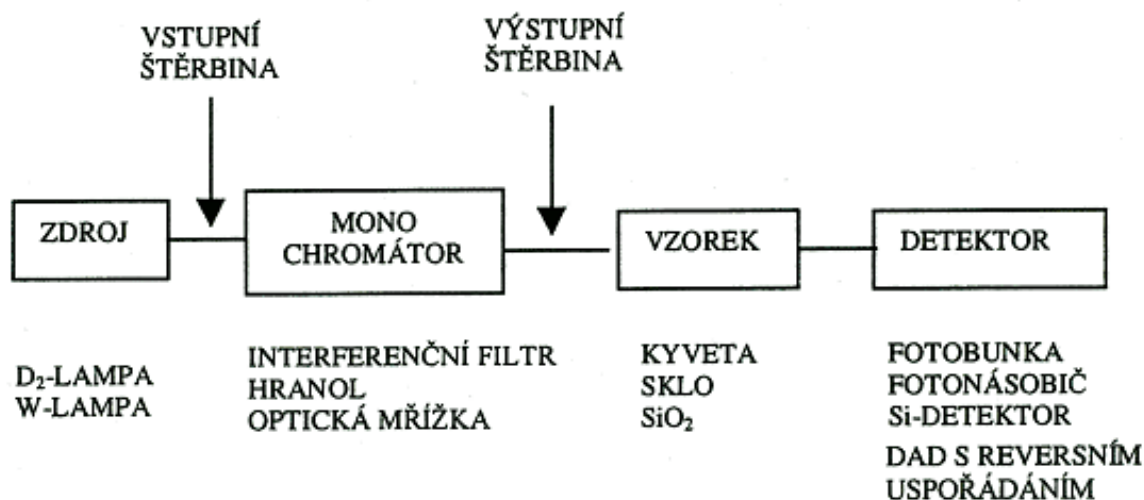
Souvislost struktury látky s průběhem absorpčního spektra se značně uplatňuje při identifikaci látek nebo při určování typů chromoforů přítomných v jejich molekulách. V mnohých případech lze neznámou sloučeninu detekovat na základě porovnání jejího spektra se spektry standardních látek změřených za stejných experimentálních podmínek [22].

3.3.1 Absorpční spektrofotometr

Absorpční spektrofotometr se skládá z těchto částí (Obr. 3.2):

- **Zdroj záření** – pro spojitě elektromagnetické záření pro viditelnou oblast se využívá wolframová nebo halogenová žárovka.
- **Monochromátor** – je tvořen vstupní a výstupní mřížkou, rozkladným prvkem (hranol, reflexní mřížka) a zrcadlovou nebo čočkovou soustavou. Natáčením rozkladného prvku se postupně zobrazují jednotlivé monochromatické obrazy vstupní štěrbinou na štěrbinu výstupní.
- **Absorpční prostředí** – je využívána kyveta s měrným, případně srovnávacím roztokem. Materiál kyvet se řídí proměřovanou oblastí spektra. Absorpční prostředí tvoří roztok látky ve vhodném rozpouštědle.
- **Detekční systém** – se skládá z detektoru záření a elektronického zařízení na zpracování jeho odezvy. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál, který se zpracovává v zesilovači a jeho výstup se zobrazí na displeji. Pro detekci záření ve viditelné oblasti se používají fotonky, fotonásobiče nebo fotoodpory.

Svazek polychromatického záření vycházející ze zdroje dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Následuje rozklad na reflexní mřížce nebo hranolu. Poté vychází z výstupní štěrbinou svazek monochromatického záření, které charakterizuje interval vlnových délek procházejících štěrbinou. Po průchodu absorpčním prostředím dopadá monochromatické záření na fotoelektrický detektor a vzniklý fotoproud se převádí na elektrický výstup [21].



Obr. 3.2: Součásti spektrofotometru [20]

3.3.2 Příklady spektrofotometrického stanovení

Tato metoda nalézá uplatnění při stanovení prvků, kationů vázaných v komplexech, anionů nekovů, organických sloučenin s heterocyklickými atomy, aromatických sloučenin, sloučenin s konjugovanými násobnými vazbami, při analýze tělních tekutin, potravin a drog.

Kvalitativním důkazem výskytu analyzovaného prvku bývá často vznik anomálního zbarvení (tvorba komplexních sloučenin anorganických analytů).

Spektrofotometrie se dále využívá jako detekční a kvantifikační princip v kapalinové a iontové chromatografii nebo při elektromigračních metodách [20].

3.4 Plynová chromatografie (Gas chromatography – GC)

Analytická metoda založená na rozdílech v rozdělovacích koeficientech látek dělicích se mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází se nazývá chromatografie. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku [18, 23]. Základním požadavkem kvalitativní analýzy je úplná separace všech složek [24].

Metoda plynové chromatografie vyžaduje, aby se veškeré látky vstupující do dělicího systému nacházely v plynné fázi. Tento požadavek určuje rozsah analyzovaných látek a možnost jejich kvantifikování [25].

Vzorek je dávkován do proudu plynu, který jej unáší kolonou. Mobilní fáze se tedy nazývá nosný plyn. Složky se separují v koloně na základě odlišné schopnosti poutat se na stacionární fázi. Jednotlivé komponenty opouštějící kolonu indikuje detektor. Z časového průběhu signálu vyhodnoceného detektorem se určí druh a kvantitativní zastoupení složek [18].

Podle stacionární fáze, kterou plynová chromatografie využívá, se tato metoda dále dělí na plynovou adsorpční chromatografii (GSC) a plynovou rozdělovací chromatografii (GLC). U GSC je řídicím procesem adsorpce složky z plynné fáze na povrch tuhého adsorbentu (např. aktivní uhlí, silikagel, aluminu), při GLC dochází k distribuci složky mezi plynnou mobilní a kapalnou stacionární fází [26].

Plynová chromatografie nalézá uplatnění zejména při analýze směsí plynů, těkavých látek a organických sloučenin s bodem varu menším než cca 400 °C a relativní molekulovou hmotností menší než 1000 g·mol⁻¹. Hojně využívaným postupem je chemická změna analytů

s nevyhovujícími vlastnostmi na deriváty použitelné v analýze plynovou chromatografií [18, 20].

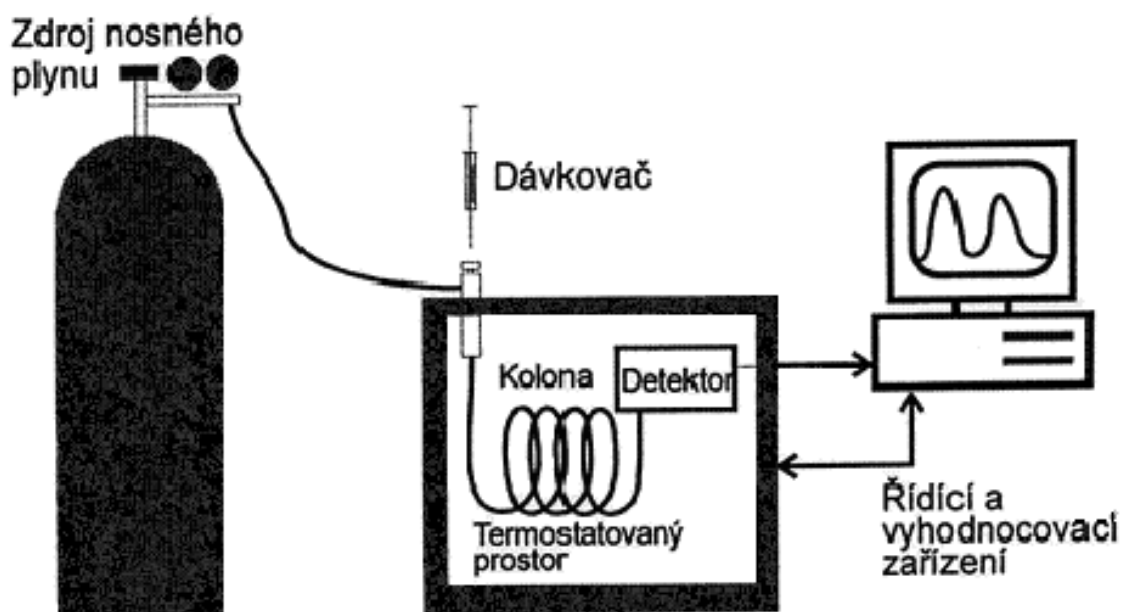
Mastné kyseliny patří mezi silně polární látky. Vzhledem k jejich chemickým vlastnostem negativně ovlivňuje jejich stanovení adsorpce na nosiči a dimerizace. Proto se většinou převádějí na methylestery (v přítomnosti katalyzátoru se používá methanol), které se rozdělují plynovou chromatografií s použitím polyesterů jako stacionární fáze a plamenového ionizačního detektoru. Složky se identifikují na základě elučních časů a z plochy píků se následně vypočítá poměrné zastoupení jednotlivých kyselin ve směsi v hmotnostních procentech. Tato metoda však není vhodná pro kyseliny s krátkým řetězcem [16, 24].

Nižší mastné kyseliny je někdy výhodnější stanovit ve volné formě. Tehdy bývají používány buď kyselé kapalně fáze jako je 2-nitrotereftalová kyselina, nebo kombinace polyesterové fáze s kyselinou fosforečnou, aby byla potlačena disociace volných kyselin. Při analýze těchto látek se kvůli slabě kyselému charakteru fenolů využívá přísavka kyseliny fosforečné [24].

3.4.1 Instrumentace

Plynový chromatograf se skládá z těchto částí (Obr. 3.3):

- zdroje nosného plynu
- dávkovače
- chromatografické kolony a detektoru umístěných v termostátovaném prostoru
- regulačního a čistícího zařízení
- řídicího a vyhodnocovacího zařízení [27].



Obr. 3.3: Schéma plynového chromatografu [27]

3.4.1.1 Zdroj nosného plynu, mobilní fáze

Jako mobilní fáze se používá inertní plyn (vodík, dusík, helium nebo argon), jehož úkolem je transportovat složky vzorku kolonou. Jako zdroj slouží generátory nebo tlakové láhve.

Nosný plyn má být vysoké čistoty, bez vlhkosti a kyslíku. Z tohoto důvodu se do potrubí zařazují sušičky a absorbery kyslíku.

Volba nosného plynu je určena druhem kolony a detektoru a má vliv na separační účinnosti na základě rozdílných difusních koeficientů složek v různých plynech [18, 20, 26].

3.4.1.2 Regulační systém

Regulační systém (mechanické, elektronické regulátory) zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu. Elektronickou regulací lze dosáhnout stanoveného průtoku i během změn teploty při separaci [18, 20].

- **Průtoková rychlost** – v chromatografickém systému lze měřit průtokovou rychlost buď na výstupu kolony za detektorem nebo na vstupu do kolony před dávkovačem. K měření průtokové rychlosti nosného plynu a všech dalších přídavných plynů se používají nejčastěji mýdlové průtokoměry, kapilární průtokoměry, průtokoměry s clonkou nebo rotametry. Mýdlové průtokoměry v rozsahu průtokových rychlostí jsou velmi přesné, zatímco rotametry slouží pouze k hrubé orientaci [23, 28]. Na průchod nosného plynu kolonou má vliv pneumatický odpor kolonou, který se projeví vznikem tlakového spádu. Protože jsou retenční data na tlakovém spádu závislá, je třeba pro přesná měření průtoku naměřené hodnoty na tlakový spád korigovat. Z tohoto důvodu se před vstup do kolony zařazuje nanometr [28].

3.4.1.3 Čistící zařízení

Čistící zařízení zachycuje vlhkost, nečistoty v nosném plynu a nežádoucí stopy ostatních plynů, zejména reaktivního kyslíku, který významně poškozuje stacionární fázi v koloně [18].

3.4.1.4 Injektor (dávkovač)

Injektor slouží k zavedení vzorku na počátek kolony, převedení vzorku do plynného stavu a vnesení do proudu nosného plynu [20]. Teplota injektoru je volena tak, aby při dávkování došlo k okamžitému vypaření vzorku a byla o 50 °C vyšší než teplota kolony. Převod tepla mezi vypařovaným vzorkem a injektorem je vždy sáláním [25].

Dávkování se uskutečňuje nad ústí kolony umístěné na konci injektoru nebo přímo na kolonu pomocí dávkovacích ventilů, plynové mikrostřikačky, ručních a automatických dávkovačů. Existují různé způsoby nástřiku:

- **Nástřik s děličem toku (*split injector*)** – používá se u vzorků obsahujících velké množství analyzovaných složek a při kvalitativní analýze, pokud je hlavním požadavkem značné rozlišení zón separovaných látek. Skleněná vata umístěná v odpařovací trubici zajišťuje promíchání vzorku před vstupem do kolony a následné homogenní odpařování. Pro vlastní analýzu se využívá pouze menší část a zbytek je oddělen.
- **Nástřik bez děliče toku (*splitless injector*)** – využívá se k analýze zředěných vzorků a relativně velkých objemů, které je nutno použít pro stopovou analýzu. Vzorek se dávkuje pomalu do odpařovací trubice a nechá se cca 60 s odpařovat. Následně je proveden oplach septa. Díky rozpouštědлу s vysokou teplotou varu, které zkondenzuje a vytvoří kapalný film v koloně, se analyty ve filmu zachytí. Po oplachu septa a zvýšení teploty začne probíhat separace.

- **Nástřík přímo do kapilární kolony (*on column injector*)** – je používán k analýzám látek, jejichž komponenty se těsně nad bodem varu rozkládají. Do kolony zahřáté na nižší teplotu, než je bod varu rozpouštědla použitého pro rozpuštění vzorku, se rychle nastříkne analyzát, který vytvoří kapalný film na stěně kolony.
- **Nástřík s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku** – součástí injektoru je vložka s chromatografickou náplní sloužící k odstranění rozpouštědla, nízkomolekulárních sloučenin a zachycení netěkavých sloučenin či nečistot [18, 20].

3.4.1.5 Kolony a stacionární fáze pro plynovou chromatografii

Kolona je část chromatografu, ve které se nachází stacionární fáze a kde dochází k separaci složek [18]. V plynové chromatografii se využívá několik set různých stacionárních fází, které se vyznačují vysokou tepelnou a chemickou stabilitou [20, 25]. Jako zakotvující fáze bývají používány netěkavé a při dané teplotě chemicky inertní kapaliny. Stacionární fáze musí disponovat nepatrnou tenzí par při pracovní teplotě, jinak by došlo v průběhu analýzy k jejímu vypaření [20].

V plynové chromatografii jsou používány kolony náplňové nebo účinnější kapilární separační kolony [26, 27].

- **Náplňové kolony** – jsou tvořeny do spirály stočenou kovovou nebo skleněnou trubicí o vnitřním průměru 2–6 mm a délce 1–5 m. Kolony se plní adsorbenty na bázi silikagelu a aktivního uhlí, aluminou, molekulovými sítě (křemičitany) nebo porapaky (kopolymer styrenu a divinylbenzenu). Jako neaktivní nosiče pro kapalnou fázi slouží křemelina nebo modifikovaná křemelina. Částice adsorbentů a neaktivních nosičů dosahují průměru 0,13–0,40 mm. Čím menší částice se použijí, tím více se zvýší účinnost. Náplňové kolony mají vyšší kapacitu než kolony kapilární. Vzhledem k horšímu rozlišení se využívají tehdy, je-li požadován větší objem stacionární fáze, pro preparativní účely nebo k oddělování málo zadržovaných plynů.
- **Kapilární kolony** – jsou vyrobeny z křemenné, skleněné, plastové nebo kovové kapiláry o vnitřním průměru 100–700 μm a délce 15–100 m. Kvůli zvýšení mechanické odolnosti se potahují vrstvou polymeru (polyamidu) nebo hliníku. Na vnitřní stěně kapiláry se nachází stacionární fáze o tloušťce 0,1–10 μm . Na základě charakteru zakotvené fáze se rozlišují kolony WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) s kapalnou stacionární fází tvořící tenký film, kolony SCOT (*Support Coated Open Tubular*) s vrstvou nosiče se zakotvenou kapalinou a kolony PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) s tenkou vrstvičkou pórovitého materiálu jako absorbentu. Kapilární kolony dosahují vysokých separačních účinností několika set teoretických pater při celkové délce až 100 m. Nevýhodou je malé množství dávkovaného vzorku [18, 20, 27].

3.4.1.6 Termostat

Termostat zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru kvůli udržení vzorku v plynném stavu. Detektor a dávkovač mají většinou vlastní řízené zahřívání. Optimální teplota kolony závisí na bodu varu jednotlivých komponent a požadovaném rozlišení. Separaci směsi složek s širokým rozmezím bodů varu je vhodné provádět s pomocí

teplotního gradientu. Zvýšením teploty kolony dojde k zvýšení tlaku par složky a k snížení retenčního času. Tímto způsobem se dosáhne zkrácení analýzy a rovnoměrné eluce zón. Teplota kolony je zvyšována skokově nebo kontinuálně. Ve většině případech se pracuje v teplotním rozmezí 50–300 °C [18, 20].

3.4.1.7 Detektory

Detektory jsou zařízení reagující na přítomnost protékající mobilní fáze a vysílající signál, který se zaznamenává v závislosti na čase. Detektory umožňují sledování takové vlastnosti plynu z kolony, která závisí na koncentraci a druhu složek. Podle povahy závislosti signálu se rozlišují detektory:

- **Koncentračně závislé** – signál detektoru je funkcí koncentrace složky vstupující do detektoru
- **Hmotnostně závislé** – signál detektoru je funkcí množství složky vstupující do detektoru
- **Univerzální** – používají se k detekci rozsáhlého spektra sloučenin
- **Selektivní** – slouží k detekci sloučenin specifických vlastností

Mezi důležité vlastnosti detektorů patří citlivost (nízký detekční limit), odezva, lineární dynamický rozsah odezvy, rychlost odezvy, šum produkovaného signálu a nejmenší detekovatelná koncentrace nebo hmotnostní průtok [18, 20, 27].

Druhy detektorů:

Tepelně-vodivostní detektor (*Thermal Conductivity Detector – TCD*)

Je typem universálního a nedestrukčního detektoru. Nosný plyn (vodík, helium) proudí přes vlákno žhavené stálým elektrickým proudem a ochlazuje ho na určitou teplotu. Tepelná vodivost prostředí kolem vlákna, teplota a elektrický odpor jsou změněny díky přítomnosti složky. Většinou se pracuje se dvěma žhavými vlákny. Přes jedno proudí plyn z kolony, přes druhé čistý nosný plyn. Jejich elektrické odpory se srovnávají ve Wheatstonově můstku, kde jeho rozladění značí přítomnost složky (Obr. 3.4).

TCD se často používá ve spojení s kapilárními kolonami při analýzách anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek. Hlavní předností TCD je velmi široký dynamický rozsah, mezi nevýhody patří nízká citlivost [18, 20, 27].

Ionizační detektory

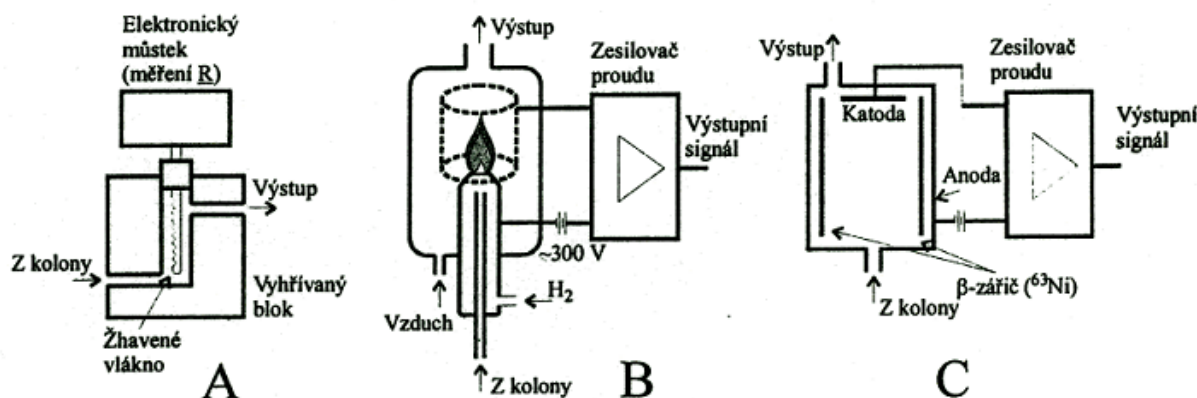
- **Plamenový ionizační detektor (*Flame Ionization Detector – FID*)** – univerzální detektor s vynikající stabilitou signálu, malým efektivním objemem a rychlou odezvou určený pro detekci organických látek. Vzorek unášený nosným plynem z kolony se spaluje ve vodíkovo-vzduchovém plameni, který hoří mezi dvěma elektrodami. Anodou je kovová část tělesa hořáku, jako katoda slouží kovová trubička nebo síťka umístěná nad plamenem. Mezi elektrodami se nachází potenciálový rozdíl asi 500 V. Molekuly organických sloučenin poskytují radikály, které se mění na ionty, které zvyšují vodivost plamene. Detektorem následně probíhá proud úměrný koncentraci sloučeniny v nosném plynu [20].

- **Plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem** – obsahuje v blízkosti plamene sůl alkalického kovu. Ionty alkalického kovu se působením tepla kyslíkovodíkového plamene dostávají do plynné fáze, kde reagují s heteroatomy organických látek (dusíkem a fosforem). Díky tomu organické sloučeniny s těmito prvky dávají velký signál (Obr. 3.4) [18, 20].
- **Plamenový fotometrický detektor** – v plášti se nachází okénko oddělující optickou soustavu a fotonásobič. Je selektivní pro sloučeniny obsahující fosfor nebo síru. Při spalování těchto látek vznikají částice S₂ nebo POH, které vydávají zelenou nebo modrou chemiluminiscenci [20].
- **Bezplamenový detektor s alkalickým kovem** – jako zdroj iontů alkalického kovu slouží elektricky vyhřívaná sůl alkalického kovu, na jejímž povrchu se díky vysoké teplotě spaluje vodík. Energie vzniklá při spalování dostačuje na specifické reakce s fragmenty obsahujícími dusík a fosfor. Díky vysoké citlivosti a selektivitě se používá na detekci látek používaných v dopingů, opiátů apod. [18].
- **Fotoionizační detektor (*PhotoIonization Detector* – PID)** – velmi citlivý. Ionizaci látek způsobuje ultrafialové záření. Selektivita detektoru se ovlivní volbou vlnové délky tohoto záření. Ionizovány jsou organické látky, amoniak, sulfan a kyslík. Mezi neionizující se látky patří např. dusík, oxidy uhelnatý a uhličitý, voda a helium [18].
- **Detektor elektronového záchytu (*Electron Capture Detector* – ECD)** – radioaktivní zářič ⁶³Ni svým zářením β ionizuje molekuly dusíku jako nosného plynu a vyvolává ionizační proud. Pomalé elektrony se uvolňují, zachycují elektronegativní atomy složek a způsobují pokles ionizačního proudu. ECD může zachytit 10⁻¹² mol analytu a je velmi citlivý na halogenové sloučeniny, látky obsahující kyslík, fosfor, síru, areny, nitrosloučeniny nebo olovo. Hlavní nevýhodou je poměrně úzký lineární dynamický rozsah (Obr. 3.4) [18, 27].
- **Argonový detektor** – atomy argonu jsou excitovány do metastabilního stavu (E = 11,7 eV) Ar → Ar* při interakci s alfa zářením resp. beta zářením ze ⁹⁰Sr nebo ³H. Excitované atomy Ar srážkově ionizují organické sloučeniny prošlé kolonou a mezi elektrodami polarizovanými na E = 750 – 1500 V se měří ionizační proud. Tento proud je úměrný množství organické sloučeniny. Na stejném principu funguje Heliový detektor [20].

Pro identifikaci nebo objasnění povahy složek složitých směsí má zvláštní význam kombinace plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (MS) [6]. Po získání hmotnostního spektra každé složky následuje identifikace na základě porovnání jejího spektra s knihovnou spekter sloučenin uloženou v počítači [18].

Atomový emisní detektor

Využívá emise záření vzorkem. Plyn vstupuje z kolony do plazmové hlavice, atomizuje se a emituje záření, které se po rozkladu mřížkou analyzuje diodovým polem. Poté následuje určení obsahu prvků [18].



Obr. 3.4: Schéma tepelně vodivostního detektoru (A), plamenově ionizačního detektoru (B) a detektoru elektronového záchytu (C) [27]

3.4.1.8 Vyhodnocovací zařízení

Vyhodnocovací zařízení zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku (chromatogram) a provádí její vyhodnocení [18].

3.4.2 Použití plynové chromatografie

Plynová chromatografie je účinným nástrojem poznání v mnoha vědních disciplínách (organické chemii, biochemii, pracovním a soudním lékařství atd.) a ekonomicky významným pomocníkem v mnohých průmyslových odvětvích (chemii ropy, plastických hmot, dehtu, kapalných a plynných paliv atd.).

Této separační metody se dále využívá k dělení: směsí uhlovodíků, spalných produktů, výfukových plynů, aminokyselinových zbytků z polypeptidů a proteinů, nedisociovatelných kapalin, pevných organických molekul, organokovových látek, esterů cholesterolu nebo pro stanovení léčiv v biologických tekutinách [18, 23, 29]. Není však vhodná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí [18].

Plynová chromatografie nalézá uplatnění i v mnoha aplikačních oblastech, jako je:

- **analýza životního prostředí** – analýza plynných a těkavých organických polutantů v ovzduší a vodách, analýza pesticidů, herbicidů a insekticidů ve vzorcích vody a půd
- **analýza potravin nebo kosmetických přípravků** – hodnocení chutí a vůní
- **klinická a toxikologická analýza** – monitorování obsahu drog v krvi [27].

3.5 Plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (Gas chromatography-Mass spectrometry – GC-MS)

Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty dělí na základě hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z [18]. MS se řadí mezi metody destrukční, spotřeba látky k identifikaci je však velmi malá (pg až ag).

Spektrum organické látky obsahuje zpravidla více píků, vzhledem k fragmentaci molekuly při analýze. Pík, který odpovídá molekulové hmotnosti nefragmentované (původní) molekuly a nese informaci o molekulové hmotnosti analyzované látky, se nazývá molekulový. Pík, shodný s fragmentem s nejvyšší relativní četností, se označuje jako základní pík, jehož výška odpovídá konvenčně relativní četnosti rovné jedné [30].

Základními kroky v této technice jsou:

- odpaření vzorku
- ionizace
- akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru
- separace iontů hmotnostním filtrem
- detekce iontů [18]

Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami (zejména kapalinovou a plynovou chromatografií) výrazně zvyšuje selektivitu a provádí identifikaci komponent vzorku ve složité matici. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě registrace zón látek eluovaných z kolony uskutečnit i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra [19].

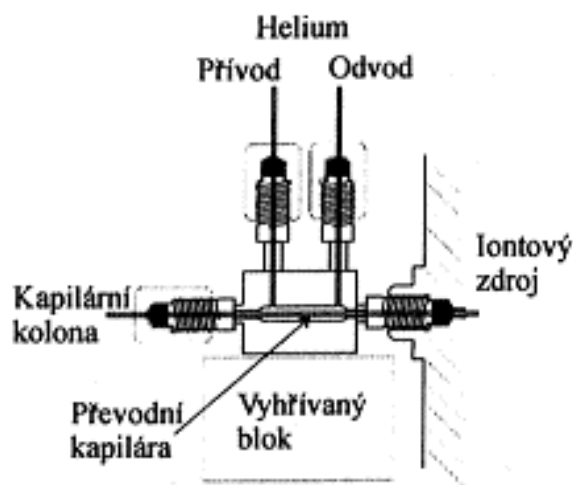
3.5.1 Instrumentace hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr se skládá z těchto částí:

- iontový zdroj
- hmotnostní analyzátor
- detektor
- vakuový systém
- vyhodnocovací zařízení [18]

3.5.2 Připojení plynového chromatografu k hmotnostnímu spektrometru

Primárním předpokladem úspěšného spojení GC-MS je dostatečně výkonný čerpací systém, schopný s rezervou odčerpávat nadbytek nosného plynu z prostoru ionizace [19]. Mezi chromatografickou kolonou a iontovým zdrojem se zařadí separátor nebo dělič toku (Obr. 3.5). Průtok mobilní fáze kapilární kolonou je podstatně nižší a vakuový systém jej odčerpá při svém obvyklém výkonu, takže kapilární kolona se zavede do evakuovaného prostoru MS těsně před iontovým zdrojem. Použití helia jako nosného plynu je výhodné při spojení GC s iontovou pastí, v ostatních případech se přednostně ionizuje helium a srážky jeho iontů s analyty mají vyšší účinný průřez pro interakci analytů s primárními elektrony, což vede k větším ionizačním výtěžkům [20].



Obr. 3.5: Spojení kapilární kolony plynového chromatografu s iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru pomocí otevřeného děliče [19]

3.5.3 Aplikační oblast GC-MS

Aplikovatelnost GC-MS je omezena požadavkem dostatečné těkavosti analyzované látky, která musí projít separační kolonou. Tuto podmínku splňuje asi 10 % známých organických látek. GC-MS se využívá pro analýzu komplikovaných směsí látek, u nichž je identifikace komponent na základě porovnání retenčních časů nemožná, a pro komplexní vzorky obsahující neznámé složky. Díky vysoké citlivosti detekce hmotnostním spektrometrem sahá aplikovatelnost GC-MS do oblasti stopové a ultrastopové analýzy.

GC-MS nalézá uplatnění v praxi v těchto oblastech:

- **Potravinářský a kosmetický průmysl** – hodnocení chutí a vůní, jejichž nositelem jsou často těkavé látky
- **Farmaceutický průmysl** – laboratorní a provozní hodnocení čistoty vyrobených preparátů a strukturní identifikace doprovodných nečistot a produktů degradace, farmakokinetické studie při sledování časového koncentračního profilu léčiva v tělních tekutinách a mechanismu odbourávání
- **Toxikologie** – identifikace a kvantifikace běžně návykových látek v tělních tekutinách, analytická metoda dopingových a toxikologických laboratoří
- **Ekologie** – stopová a ultrastopová analýza organických polutantů ve vzorcích půd, vod a ovzduší [19]

3.5.4 Analýza těkavých mastných kyselin pomocí GC-MS

Těkavé mastné kyseliny byly identifikovány pomocí GC-MS např. ve švýcarském sýru a v Loureiro a Alvarinhově vínech z regionu Vinhos Verdes [31, 32].

Sýrové aroma je výsledkem složité směsi těkavých látek vznikajících na základě rozkladných procesů způsobených mikroflórou během zrání sýrů. Výsledkem první analýzy švýcarského sýra byla identifikace kyseliny propionové v přítomnosti kmenů propionibakterií. Mezi další detekované těkavé mastné kyseliny patřily kyseliny 2-methylbutanová a 3-methylbutanová [31].

Při druhé analýze švýcarského sýra – Ementálu byla použita k identifikaci volných mastných kyselin a dalších těkavých látek metoda extrakce nadkritickou tekutinou (CO₂)-plynová chromatografie. Kyseliny octová a propionová převládaly nad kyselinami o počtu atomů uhlíku 12–18, počet mastných kyselin s dlouhými řetězci rostl s koncentrací během zrání sýru [33].

Na základě analýzy několika polotvrdých kozích sýrů z různých oblastí Španělska bylo identifikováno pomocí GC-MS 50 těkavých látek. Z těchto sloučenin značně ovlivňovaly sýrové aroma mastné kyseliny s krátkým řetězcem (zejména kyselina 3-methylbutanová), ketony, laktony a ethylestery dodekanové a hexanové kyseliny [34].

Analýza Loureiro a Alvarinhova vína ukázala přítomnost 77 glykosidicky vázaných sloučenin a 120 volných těkavých látek, např. alkoholů, mastných kyselin, ethylesterů, esterů organických kyselin, acetátů, těkavých fenolů, těkavých mastných kyselin, atd. [32].

3.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. V HPLC se dosahuje vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic [27]. Na rozdíl od plynové chromatografie hraje mobilní fáze v případě HPLC aktivní roli.

Podle mechanismu separace se používají rozpouštědlové směsi různé polariry, přičemž změna vlastností mobilní fáze je v systému s danou stacionární fází hlavním faktorem ovlivňujícím retenci jednotlivých složek směsi a tím i jejich vzájemné rozdělení [20].

Mezi výhody HPLC patří široká oblast použitelnosti, možnost ovlivnění separace složením mobilní fáze, která na rozdíl od GC není inertní (Tabulka 3.1). Nevýhodou ve srovnání s GC je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace [19].

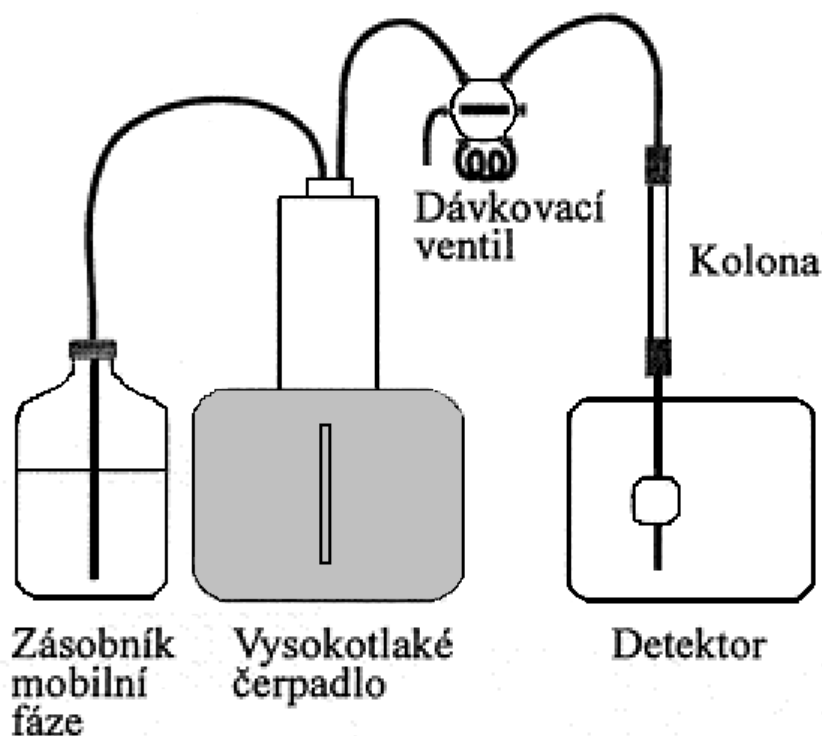
Tabulka 3.1: Rozsah použitelnosti HPLC ve srovnání s GC [19]

Metoda	Přibližný rozsah molekulových hmotností analytů M_r	Analyzované látky
HPLC	3–10 ⁶	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery
GC	1–400	přímo plyny, látky těkavé a teplotně stabilní, po derivatizaci i netěkavé, po pyrolýze i makromolekulární

3.6.1 Instrumentace HPLC

Základní schéma přístroje pro HPLC se skládá z těchto částí (Obr. 3.6):

- zásobník mobilní fáze
- vysokotlaké čerpadlo
- dávkovací ventil
- kolona
- detektor
- vyhodnocovací zařízení (počítač) [19]



Obr. 3.6: Schéma přístroje pro HPLC [27]

3.6.1.1 Mobilní fáze v HPLC

Složení mobilní fáze je ovlivňováno změnami složení rozpouštědel, pH, iontové síly, iontově párovými činidly atd. Mobilní fázi charakterizují polarita – schopnost rozpouštědla podílet se na polárních interakcích a selektivita, která se definuje jako relativní retence dvou sousedních látek.

Mobilní fáze by měla dávat v detektoru minimální signál a tím umožňovat co nejcitlivější detekci solutů. Viskozita, stlačitelnost, toxicita a hrana absorpce ultrafialového záření by měly být co nejnižší [19].

3.6.1.2 Stacionární fáze v HPLC

Separační kolony v HPLC musí odolat vysokému tlaku mobilní fáze. Většinou se vyrábí z ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice o vnitřním průměru 2–5 mm a délce 30–200 mm. Kolony jsou naplněny vhodnou stacionární fází. Tou bývá obvykle oxid křemičitý vhodné zrnitosti, nejčastěji chemicky modifikovaný navázáním vhodných funkčních skupin. Typ funkční skupiny na povrchu oxidu křemičitého určují výslednou polohu zakotvené fáze.

V HPLC se používají hydrofobní stacionární fáze s navázanými uhlovodíkovými funkčními skupinami nebo i granulovaný iontoměnič, tvořený nejčastěji síťovaným polystyrenem s kationogenními nebo anionogenními funkčními skupinami [27].

3.6.1.3 Detektory

Druhy detektorů:

- **Fotometrický detektor** – umožňuje sledovat absorpenci látek vystupujících z chromatografické kolony. Pracuje v ultrafialové oblasti a je pro organické látky prakticky univerzální, vykazuje široký lineární dynamický rozsah a nízké meze detekce.
- **Fluorimetrický detektor** – pro látky vykazující fluorescenci, umožňuje dosáhnout velmi nízkých mezí detekce, jež se pro silně fluoreskující látky pohybují v řádu jednotek pg.
- **Hmotnostní detektor** – identifikuje jednotlivé separované látky vycházející z kolony na základě získaných hmotnostních spekter.
- **Elektrochemické detektory:**
 - Ampérometrický** – využívá se pro detekci látek, které je třeba redukovat nebo oxidovat.
 - Vodivostní** – používá se v iontové chromatografii při analýze anorganických iontů [27].

3.6.2 Využití kapalinové chromatografie

Kapalinovou chromatografií lze použít k identifikaci molekulárních a biochemicky významných látek, zejména v potravinářském průmyslu, klinické chemii, biochemii a v průmyslu zpracování plastů a dřeva [35].

Nejvíce se však této metody využívá k separaci komplikovanějších směsí látek [19].

Mezi typické aplikační oblasti HPLC patří:

- **Analýza životního prostředí** – sledování různých typů organických a anorganických polutantů ve vzorcích vod a půdy
- **Farmaceutická analýza** – lékopisná metoda doporučená k identifikaci a hodnocení substancí a finálních lékových forem, využívá se také v rámci farmakologických studií pro určování koncentrace léčiv v tělních tekutinách [27]

3.6.3 Analýza těkavých mastných kyselin pomocí HPLC

Těkavé mastné kyseliny nacházející se ve vodním prostředí – mořských sedimentech byly identifikovány pomocí HPLC. Vzhledem k nízké koncentraci těkavých mastných kyselin v životním prostředí jsou znalosti o jejich izotopovém složení omezené. Analýza prokázala přítomnost acetátu sodného v důlních vodách. Na základě tohoto výsledku a rozbořem kapalin získaných inkubací z mořských sedimentů byla získána řada informací o izotopovém složení těkavých mastných kyselin [36].

3.7 Extrakce pevnou fází (Solid Phase Extraction – SPE)

Z hlediska fyzikální chemie je chápán proces extrakce jako přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Avšak v širším analytickém pohledu bývají jako extrakce pojmenovány i mnohé další metody, při nichž se převádí jedna složka směsi fázovým rozhraním jedné fáze (plynné, kapalné, pevné) do druhé fáze (kapalné, pevné), i když principiálně jde např. o adsorpci nebo absorpci.

Podstatou metody extrakce pevnou fází je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek (Obr. 3.7). Využívá se chemických vlastností částic, které v důsledku mezimolekulových interakcí (van der Waalovy síly, vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce, kation-aniontové interakce) na sorbentu ulpívají [18].

Další modifikací extrakce pevnou fází je mikroextrakce pevnou fází (Solid Phase MicroExtraction – SPME) [18]. SPME se rychle po svém uvedení zařadila mezi standardní metody přípravy vzorku pro plynovou chromatografii. Protože při odebrání vzorku není třeba žádný dodatek rozpouštědla, SPME šetří čas a náklady pro preparaci a často zvyšuje citlivost analýz. Většina analytů zkoumaných pomocí GC může být efektivně extrahována pomocí SPME [37].

Principem SPME je extrakce vzorků malým množstvím extrakční fáze (aktivní uhlí, silikonový olej, polyakrylátové fáze...) zakotvené na křemenném vlákne. Křemenné vlákno pokryté sorpční vrstvou je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté ocelové jehle, která vlákno chrání před mechanickým poškozením. Jehlou se nejprve propíchne septum nádoby se vzorkem a posunutím pístu se vlákno vysune. Po uplynutí zvolené extrakční doby (5–60 minut) se vlákno opět zasune do jehly a přemístí se do nástřikové komory plynového chromatografu. Zde se vlákno vysune do zahřívaného prostoru, vlivem vysoké teploty (250–300°C) jsou zachycené analyty desorbovány a proudem nosného plynu vneseny na kolonu [38].



Obr. 3.7: Extrakce tuhým sorbentem [27]

3.7.1 Instrumentace SPE

Základem v SPE je upotřebení nepříliš drahých extrakčních kolonek na jedno použití o nejrozmanitějších velikostech a náplních sorbentů. V principu pracuje SPE takto:

- Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonku a sloučeniny se ze vzorku zachytí materiálem sorbetu v koloně.
- Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky selektivně odstraněny promytím vhodnými rozpouštědly.
- Nakonec se žádoucí analyty z kolonky získají znovu elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého eluátu.

Alternativně může být extrakční kolonka vybrána k tomu, aby zadržovala příměsi ze vzorku, ale analytům dovolila projít.

Sorbenty založené nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu kladou odpor protékající kapalině [18].

3.7.2 Využití SPE

SPE a její modifikace se využívají zejména k přípravě vzorků na formu vhodnou pro analýzu. Často je nutné koncentrovat analyt. V monitorování životního prostředí nebo při sledování drog a léků v humánních vzorcích je mnohdy požadováno stanovit sloučeniny tak nízkých koncentrací, že bez zakoncentrování by se nedosáhlo detekčních limitů [18]. Dále tato metoda našla intenzivní použití ve farmacii, klinické chemii, toxikologii, potravinářství, enviromentální analýze stopových nečistot v ovzduší, vodě i půdě.

Mezi výhody SPE patří rychlost, selektivita, citlivost, dobrá opakovatelnost, možnost automatizace, snadné spojení s řadou analytických metod a finanční dostupnost [19].

3.7.3 Analýza těkavých mastných kyselin pomocí SPME

V ovčím sýru byly analyzovány volné těkavé mastné kyseliny, které značně přispívají k jeho výrazné chuti. SPME byla v kombinaci s GC-MS použita pro identifikaci a kvantifikaci kyselin butanové, hexanové, oktanové a dekanové. V průběhu zrání sýrů bylo

pozorováno výrazné zvýšení koncentrace volných mastných kyselin, která se pohybovala v rozmezí 0,35–9,33 mg na 100 g pro kyselinu butanovou; 0,363–4,34 mg na 100 g pro kyselinu hexanovou; 0,343–2,0 mg na 100 g pro kyselinu oktanovou a 1,291–3,85 mg na 100 g pro kyselinu dekanovou. Meze stanovitelnosti byly registrovány na úrovni ppm [39].

Těkavé mastné kyseliny byly analyzovány pomocí SPME kombinované s GC-MS ve vzorcích odpadní vody. K produkci iontů bylo využito chemické ionizace. Detekční limity se pohybovaly v rozmezí 150 g·l⁻¹ pro kyselinu octovou a 2–6 g·l⁻¹ pro zbývající karboxylové kyseliny. Reprodukovatelnost této metody byla mezi 9 a 16 %. Nepřítomnost rušivých píků poskytovala přesnější stanovení kyselin octové, propionové, máselné a isovalerové [8].

V travní a kukuřičné siláži bylo stanoveno metodami SPME a GC-MS 21 těkavých látek. Jednalo se zejména o estery nižších mastných kyselin, fenolické látky a terpeny. Siláže patří vedle čerstvé píce a sena k značně používaným krmivům pro přežvýkavce ve všech vyspělých zemích. Silážování představuje velice složitý biologický a mikrobiální proces, při kterém jsou za anaerobních podmínek činností bakterií mléčného kvašení přeměňovány rostlinné cukry na konzervující kyseliny mléčnou a octovou a na oxid uhličitý, a to za současného poklesu pH konzervované hmoty. Jakost siláží se stanovuje hodnotou pH, titrační kyselostí vodného výluhu, obsahem kyselin vznikajících kvasnými procesy – mléčné, octové, propionové a nežádoucí kyseliny máselné. V silážích přítomné četné těkavé látky vytvářející typickou vůni kvalitních siláží ovlivňují chutnost, a tím do určité míry i příjem siláží zvířaty. Část těchto sloučenin může přecházet do siláže přímo z výchozí píce, některé však mohou vznikat až při fermentačním procesu nebo během dlouhodobého skladování siláže [40].

4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla charakterizace těkavých mastných kyselin na základě jejich struktury, výskytu, vlastností a možností identifikace.

Těkavé mastné kyseliny se z hlediska názvosloví řadí mezi karboxylové kyseliny, které se vyznačují polaritou a značnou reaktivností. Bývají užívány názvy systematické, triviální i latinské. Nižší mastné kyseliny jsou bezbarvé kapaliny těkající za atmosférického tlaku. S vodou jsou mísitelné nebo rozpustné. Při teplotě varu dochází k dimerizaci.

Nasyčené mastné kyseliny s kratším řetězcem jsou typické pro mléčný tuk nebo kokosové ořechy. Těkavé mastné kyseliny vznikající působením bifidogenní mikroflóry představují nejen zdroj energie, ale také stimulují střevní peristaltiku.

Rozvětvené karboxylové kyseliny a jejich estery se vyskytují v ovoci a sýrech. Přítomnost racemických směsí těchto sloučenin v potravinách může znamenat jejich užití jako umělých přídavných látek, což však není vždy povoleno.

Mezi instrumentální metody využívané ke stanovení karboxylových kyselin patří plynová chromatografie, plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, spektrofotometrie a izotachoforéza.

Izotachoforéza, začleňující se mezi elektromigrační separační metody, využívá různé pohyblivosti iontů. Nalezla uplatnění např. při stanovení alifatických a aromatických karboxylových sloučenin nebo také aniontů a kationů prvků.

Spektrofotometrie je založena na schopnosti molekul excitovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Neznámou sloučeninu lze detekovat na základě porovnání jejího spektra se spektry standardních látek změřených za stejných experimentálních podmínek. Této metody se využívá např. k analýze potravin, drog nebo tělních tekutin.

Plynová chromatografie je významná separační metoda používaná v mnoha vědních disciplínách, která vyžaduje, aby se všechny látky vstupující do dělicího systému nacházely v plynné fázi.

Spojení hmotnostního spektrometru s plynovou chromatografií významně zvyšuje selektivitu. GC-MS se využívá pro analýzu komplikovaných směsí látek, u nichž je identifikace komponent vzorku na základě porovnání retenčních časů nemožná.

Mezi výhody vysokoúčinné kapalinové chromatografie patří široká oblast použitelnosti a možnost ovlivnění separace složením mobilní fáze. K typickým aplikačním oblastem HPLC se řadí analýza životního prostředí a farmaceutická analýza.

Pro izolaci mastných kyselin z matrice vzorku lze kromě klasických metod použít také SPE a SPME. Extrakce pevnou fází využívá zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Tato metoda nalezla využití např. ve farmacii, klinické chemii nebo potravinářství. Principem mikroextrakce pevnou fází je extrakce vzorků malým množstvím extrakční fáze zakotvené na křemenném vlákně.

Tato bakalářská práce bude použita jako teoretický podklad pro navazující diplomovou práci, zabývající se problematikou stanovení těkavých mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KLOUDA, P. *Základy biochemie*. 1. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 200. 155 s. ISBN 80-86369-00-5.
- [2] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie 2*. 1. vyd. Praha: Academia, 1992. 136 s. ISBN 80-200-0441-6.
- [3] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 344 s. ISBN 80-86659-00-3.
- [4] KOLEKTIV AUTORŮ. *Biochemie: Základní kurz*. Sofrová, D. 3. vyd. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2005. 240 s. ISBN 80-7184-936-7.
- [5] PEČOVÁ, D. *Organická chemie*. 2. vyd. [s.l.]: Olomouc, 2002. 127 s. ISBN 80-7182-142-X.
- [6] MACHÁČEK, V., PANCHARTEK, J., PYTELA, O. *Organická chemie: 2.část*. 2. opravené vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1998. 571 s. ISBN 80-7194-124-7.
- [7] JOVER, E., ABALOS, M., ORTIZ, L., BAYONA, J.M. Volatile fatty acids as malodorous compounds in wool scouring water and lanolin. Origin and characterisation. *Enviromental Technology* [online]. 2003, vol. 24, is. 12, pp. 1465-1470.
- [8] ABALOS, M., BAYONA, J. M. Application of gas chromatography coupled to chemical ionisation mass spectrometry following headspace solid-phase microextraction for the determination of free volatile fatty acids in aqueous samples. *Journal Of Chromatography A*[online]. 2000, vol. 891, is. 2, pp. 287-294.
- [9] Tuky [online]. 1996 [cit. 2009-02-28]. Dostupné z: <<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/346464-tuky>>.
- [10] VOTOČEK, E., LUKEŠ, R. *Chemie organická*. Praha: Československá společnost chemická, 1949. 763 s.
- [11] DOSTÁL, J. *Medical Chemistry II: Bioorganic chemistry*. Brno: Masaryk University, Faculty of medicine, 2006. 164 s. ISBN 80-210-4128-5.
- [12] MOUREK, J. a kol. *Mastné kyseliny OMEGA 3: Zdraví a vývoj*. 1. vyd. Praha: Triton, 2007. 174 s. ISBN 978-80-7254-917-7.
- [13] PÁNEK, J., POKORNÝ, J., DOSTÁLOVÁ, J. *Základy výživy a výživová politika*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 219 s. ISBN 80-7080-468-8.
- [14] RUDOLFOVÁ, J., ČURDA, L. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy* [online]. 2005, č. 99, s. 168-174.

- [15] SRKALOVÁ, S., KALÍKOVÁ, K., TESAŘOVÁ, E. Výskyt a význam enantiomerů v potravinách. *Chemické listy* [online]. 2008, č. 102, s. 480-486.
- [16] HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEGLOVÁ, J. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2001. 101 s. ISBN 80-86494-02-0.
- [17] HRSTKA M., VESPALCOVÁ, M. *Praktikum z analytické chemie potravin*. Brno: Vysoké Učení Technické v Brně, Fakulta Chemická, 2006. 58 s.
- [18] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upr. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [19] ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2005. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [20] SOMMER, L. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [21] SINICA, A. Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra [online]. 1996 [cit. 2009-04-17]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf>.
- [22] SÝKORA, D., FÄHNRIK, J. Kapalinová chromatografie a absorpční spektrofotometrie [online]. 2009 [cit. 2009-04-17]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf>.
- [23] PURNELL, H. *Plynová chromatografie*. Grubner, O., Joklík, J., Komrs, R. 1. vyd. [s.l.]: [s.n.], 1966. 464 s.
- [24] MOLKOVÁ, E., PACÁKOVÁ, V., FELTL L. *Plynová chromatografie – III.: Kvalitativní a kvantitativní analýza*. 1. vyd. [s.l.]: Univerzita Karlova v Praze, 1976. 123 s.
- [25] KOLEKTIV AUTORŮ. *Analýza organických látek: Sborník přednášek*. Churáček, J. 1. vyd. Český Těšín: 2-THETA, 1999. 349 s. ISBN 80-902432-9-0.
- [26] VOLKA, K. a kol. *Analytická chemie II*. Praha: Vysoká Škola Chemicko-Technologická v Praze, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [27] OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHNOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2003. 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [28] SMOLKOVÁ, E., PACÁKOVÁ, V., FELTL, L. *Plynová chromatografie – II.: Instrumentální část*. [s.l.]: Univerzita Karlova v Praze, 1976. 109 s.
- [29] KLÍMA, J., GRAFNETTEROVÁ, J. *Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii*. Marie Bicková. 1. vyd. [s.l.]: Avicenum, 1987. 256 s.
- [30] AUTORSKÝ KOLEKTIV. *Hmotnostní spektrometrie*. Vřešťál, J. Brno: Masarykova Univerzita, Fakulta přírodovědecká, 2000. 114 s. ISBN 80-210-2283-3.

- [31] THIERRY, A., MAILLARD M. B., RICHOUX, R., KERJEAN, J. R., LORTAL, S. Propionibacterium freudenreichii strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese. *LAIT* [online]. 2005, vol. 85, is. 1-2, pp. 57-74.
- [32] OLIVEIRA, J. M., OLIVEIRA, P., BAUMES, R. L., MAIA, M. O. Volatile and Glycosidically Bound Composition of Loureiro and Alvarinho Wines. *Food Science And Technology International* [online]. 2008, vol 14, is. 4, pp. 341-353.
- [33] TUOMALA, T., KALLIO, H. Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using on line supercritical fluid extraction - Gas chromatography. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* [online]. 1996, vol. 203, is. 3, pp. 236-240.
- [34] POVEDA, J. M., SANCHEZ-PALOMO, E., PEREZ-COELLO, M. S., CABEZAS, L. Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. *Dairy science & Technology* [online]. 2008, vol. 88, is. 3, pp. 355-367.
- [35] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1985. 188 s.
- [36] HEUER, V., ELVERT, M., TILLE, S., KRUMMEN, M., MOLLAR, X. P., HMELO, L. R., HINRICHS K. U. Online delta C-13 analysis of volatile fatty acids in sediment/porewater systems by liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Limnology And Oceanography-Methods* [online]. 2006, vol. 4, pp. 346-357.
- [37] *Nový vstříkový ventil kombinující Solid Phase Microextraction (SPME) s HPLC*. [online]. 2007 [cit. 2009-03-28]. Dostupné z: <<http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin272/fusek.html>>.
- [38] *Identifikace vonných látek metodou HS-SPME-GC-MS* [online]. 2007 [cit. 2009-03-28]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/ulohy/GC_10.pdf>.
- [39] PINHO, O., FERREIRA, I., FERREIRA, M. A. Solid-phase microextraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese. *Analytical chemistry* [online]. 2002, vol. 64, is. 20, pp. 5199-5204.
- [40] CHMELOVÁ, Š., TŘÍSKA, J., RŮŽIČKOVÁ, K., KALAČ, P. Stanovení těkavých látek v travních a kukuřičných silážích mikroextrakcí na pevné fázi a plynovou chromatografií s hmotnostně-spektrometrickou detekcí. *Chemické listy* [online]. 2008, č. 102, s. 1138-1144.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

GC.....	Plynová chromatografie
GSC.....	Plynová adsorpční chromatografie
GLC.....	Plynová rozdělovací chromatografie
WCOT.....	Kapilární kolona s potaženými stěnami
SCOT.....	Kapilární kolona s tenkou vrstvou nosiče
SPOT.....	Kapilární kolona s fází vázanou na adsorbentu nebo porézním polymeru
TCD.....	Tepelně-vodivostní detektor
FID.....	Plamenový ionizační detektor
PID.....	Fotoionizační detektor
ECD.....	Detektor elektronového záchytu
MS.....	Hmotnostní spektrometrie
GC-MS.....	Plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
HPLC.....	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
SPE.....	Extrakce pevnou fází
SPME.....	Mikroextrakce pevnou fází
ppm.....	parts per million