

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na  
stanovení těkavých mastných kyselin ve vodných vzorcích  
metodou GC/MS**

Diplomová práce

**Bc. Jan Opekar**

Vedoucí práce: Ing. David Kahoun, Ph.D.

Školitel-specialista: Ing. Josef Vilímek

České Budějovice 2018

Opekar J., 2018: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení těkavých mastných kyselin ve vodných vzorcích metodou GC/MS [Development, optimization and validation of an analytical method for determination of volatile fatty acids in aqueous samples using GC/MS. Mgr. Thesis, in Czech] - 49 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

This thesis is focused on the development of an analytical method for the determination of volatile fatty acids in aqueous samples using GC-MS/MS. The theoretical section provides general information on a selected group of acids, their significance in the biogas plants, the means of their derivatization and the analytical techniques used. The practical part mainly deals with optimization of various parameters in the derivatization reaction to achieve optimal conditions. Finally, the analytical method was successfully validated and applied to the analysis of a real sample.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 10.12. 2018

Bc. Jan Opekar

## **Poděkování**

V této části bych chtěl poděkovat panu Ing. Josefu Vilímkovi za odborné vedení v průběhu provádění potřebných měření, dále pak vedoucímu práce Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky.

# OBSAH

1	CÍLE PRÁCE .....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	2
2.1	Těkavé mastné kyseliny .....	2
2.1.1	Kyselina mravenčí .....	4
2.1.2	Kyselina octová .....	4
2.1.3	Kyselina propionová .....	5
2.1.4	Kyselina mléčná .....	5
2.1.5	Kyselina máselná .....	6
2.1.6	Kyselina valerová .....	6
2.1.7	Kyselina kapronová .....	6
2.2	Význam těkavých mastných kyselin v bioplynových stanicích .....	7
2.2.1	Technologie bioplynových stanic .....	7
2.2.2	Bilance tvorby bioplynu .....	8
2.2.3	Problematika řízení a kontroly bioplynových stanic .....	9
2.2.4	Význam nižších mastných kyselin při řízení procesu .....	10
2.3	Volba analytické metody pro stanovení TMK .....	11
2.3.1	Stanovení pomocí izotachografie .....	11
2.3.2	Analýza těkavých mastných kyselin pomocí GC-MS .....	12
2.3.3	Derivatizace analytů .....	13
2.3.4	Mikroextrakce na tuhou fázi .....	13
2.3.5	Vzorkování metodou headspace .....	14
3	MATERIÁL A METODY .....	15
3.1	Použité chemikálie a činidla .....	15
3.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál .....	15
3.3	Příprava roztoků standardů .....	16
3.3.1	Příprava zásobních roztoků .....	16
3.3.2	Příprava pracovních roztoků .....	16
3.3.3	Příprava kalibračních roztoků .....	17
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	18
4.1	Optimalizace podmínek derivatizace .....	18
4.1.1	Výchozí reakční podmínky .....	18
4.1.2	Testovací analýza .....	19
4.1.3	Volba iontů .....	20
4.1.4	Optimalizace přídavku NaOH do reakce .....	21
4.1.5	Optimalizace přídavku ethanolu do reakce .....	22
4.1.6	Optimalizace přídavku pyridinu do reakce .....	23
4.1.7	Optimalizace přídavku ethylchloroformiátu do reakce .....	24
4.1.8	Optimalizace koncentrace NaHCO <sub>3</sub> .....	25

4.1.9	Optimalizace koncentrace NaCl .....	26
4.2	Optimalizace podmínek teploty .....	27
4.2.1	Teplota teploty.....	27
4.2.2	Doba teploty před nástřikem .....	29
4.3	Validace metody .....	30
4.3.1	Linearita.....	30
4.3.2	Správnost a přesnost .....	31
4.3.3	Rozsah .....	32
4.3.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	32
4.4	Porovnání s alternativními metodami.....	33
4.5	Testování metody na vzorku digestátu .....	34
4.5.1	Testování na obohaceném vzorku .....	34
4.5.2	Analýza reálného vzorku .....	35
5	ZÁVĚR.....	36
6	REFERENCE .....	37
7	PŘÍLOHY .....	41

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<b>AA</b>	kyselina octová
<b>AA-D4</b>	izotopicky značená kyselina octová
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>BA</b>	kyselina máselná
<b>CA</b>	kyselina kapronová
<b>CAS</b>	registrační číslo chemické látky přiřazené organizací Chemical Abstracts Service
<b>DVB</b>	divinylbenzen
<b>EA</b>	ethylacetát
<b>EB</b>	ethylbutyrát
<b>ECF</b>	ethylchloroformiát
<b>EF</b>	ethylformiát
<b>EIB</b>	ethylisobutyrylát
<b>EIV</b>	ethylisovalerát
<b>EK</b>	ethylkapronát
<b>EP</b>	ethylpropionát
<b>EV</b>	ethylvalerát
<b>FA</b>	kyselina mravenčí
<b>FS</b>	monitorování všech iontů v určitém intervalu m/z
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>GC-FID</b>	plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí
<b>GC-MS</b>	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
<b>HS-SPME</b>	kombinovaná technika headspace s mikroextrakcí na vlákno
<b>CHSK</b>	chemická spotřeba kyslíku
<b>iBA</b>	kyselina isomáselná
<b>IS</b>	vnitřní standard
<b>iVA</b>	kyselina isovalerová
<b>LA</b>	kyselina mléčná
<b>LOD</b>	mez detekce
<b>LOQ</b>	mez stanovitelnosti
<b>M<sub>r</sub></b>	relativní molekulová hmotnost

<b>m/z</b>	bezrozměrná veličina vypočtená podělením poměru hmotnosti iontu ku unifikované atomové hmotnostní jednotce počtem jeho nábojů (bez ohledu na znaménko)
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>N/A</b>	daný údaj není dostupný
<b>PA</b>	kyselina propionová
<b>PDMS</b>	polydimethylsiloxan
<b>pK<sub>a</sub></b>	disociační konstanta kyseliny
<b>PR</b>	pracovní roztok
<b>RSD</b>	relativní směrodatná odchylka
<b>SIM</b>	monitorování vybraných iontů
<b>S/N</b>	poměr signálu k šumu
<b>SPE</b>	extrakce na tuhou fázi
<b>SPME</b>	mikroextrakce na tuhou fázi
<b>TMK</b>	těkavé mastné kyseliny
<b>VA</b>	kyselina valerová
<b>ZR</b>	zásobní roztok

# 1 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na uvedené téma
- Navržení analytické metody na stanovení uvedené skupiny těkavých mastných kyselin pomocí metody GC/MS , provedení základní optimalizace
- Provedení validace analytické metody
- Testování metody na reálných vzorcích



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Těkavé mastné kyseliny

Jako těkavé mastné kyseliny- TMK (v anglické literatuře VFA – volatile fatty acids nebo také SCFA – short chain fatty acids) jsou označovány nižší karboxylové kyseliny s řetězcem obsahujícím šest a méně uhlíkových jednotek. Běžně jsou tedy mezi ně řazeny kyselina mravenčí, octová, propionová, máselná, valerová, kapronová včetně jejich izomerů a dalších derivátů (1).

TMK jsou důležité intermediáty a metabolity v různých biologických procesech. Přítomnost těchto kyselin často indikuje bakteriální aktivitu, vznikají především anaerobním rozkladem organické hmoty. Vyskytují se tedy rozmanitých matricích, například v odpadní vodě, kalech a odpadních výlužích (2).

Ve vodách se TMK vyskytují v širokém rozmezí koncentrací. Běžně se nachází v rozsahu od 1 do 5000 mg/l, v extrémních případech jejich koncentrace dosahuje i mnohem vyšších hodnot. Na základě monitorování provedeného Polsku s odběry prováděnými měsíčně v roce 2004-2005 jsou v Tab. I uvedeny orientační koncentrační rozsahy TMK v různých typech zkoumané matrice (3).

Tab. I: koncentrační rozsahy VFA v různých matricích.

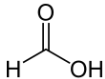

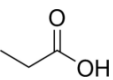
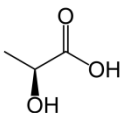
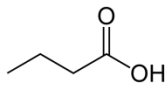
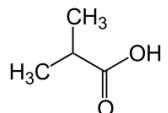
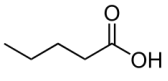
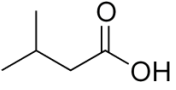
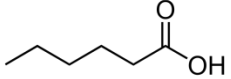
<b>Typ vzorku</b>	<b>Rozsah koncentrace TMK [mg/l]</b>
Komunální odpadní voda	50 – 150
Výluhy ze skládek odpadu	0 – 19000
Povrchová voda	0 – 3

Jejich stanovení může být uplatněno při monitoringu procesů jako například biologické odstranění fosforu z vody. V bioplynových stanicích může posloužit k informaci o stabilitě produkce bioplynu (4).

Byly popsány různé metody pro jejich stanovení. Mezi instrumentálně nenáročnými technikami patří potenciometrická titrace, spektrofotometrie, stanovení pomocí destilace, dále pak izotachografie a chromatografické metody. Nevýhodou přístupu s využitím destilace je relativně nízká výtěžnost, dále pak poměrně vysoký limit kvantifikace. Přímá potenciometrická titrace a spektrofotometrické stanovení poskytují přijatelnou přesnost i správnost, tyto metody ale nedosahují dostatečně nízkých detekčních limitů a především

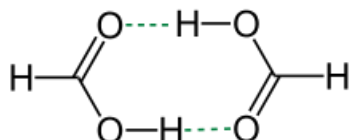
nejsou selektivní. Nabízí se tedy metoda plynové chromatografie, která navíc umožňuje stanovení těchto kyselin jednotlivě (5).

Tab. II: Přehled studovaných analytů.

Název analytu	Používaná zkratka	Strukturní vzorec	$M_r$ [g/mol]	Číslo CAS
Kyselina mravenčí	FA		46,02	64-18-6
Kyselina octová	AA		60,05	64-19-7
Kyselina propionová	PA		74,08	79-09-4
Kyselina mléčná	LA		90,08	50-21-5
Kyselina máselná	BA		88,10	107-92-6
Kyselina isomáselná	iBA		88,10	79-31-2
Kyselina valerová	VA		102,13	539-82-2
Kyselina isovalerová	iVA		102,13	503-74-2
Kyselina kapronová	CA		116,16	142-62-1

### 2.1.1 Kyselina mravenčí

Kyselina mravenčí, systematicky kyselina methanová, je nejjednodušší karboxylovou kyselinou. Při standardních podmínkách jde o bezbarvou kapalinu s pronikajícím ostrým zápachem, teplota varu je 100,8 °C. Je neomezeně mísitelná s vodou a s většinou polárních organických rozpouštěl, částečně mísitelná i s některými nepolárními rozpouštědly. V plynné fázi přechází do formy dimerů vázaných přes vodíkové vazby (6; 7).



Obr. 1: Dimer kyseliny mravenčí.

Kyselina mravenčí nachází využití jako konzervant a antibakteriální prostředek do krmiv pro hospodářská zvířata. Do siláže se dodává především pro podpoření fermentačního procesu, vzniku kyseliny mléčné a potlačení vzniku kyseliny máselné. Přídavek kyseliny mravenčí fermentační proces značně urychlí, i při nižších teplotách a zabraňuje ztrátě nutriční hodnoty, zamezuje procesu hnití (6). V chovu drůbeže někdy bývá kyselina mravenčí přidávána k hubení nežádoucích bakterií (8).

Kyselina mravenčí je nejsilnější kyselinou ze skupiny TMK s  $pK_a$  3,75. Sdílí většinu chemických vlastností s dalšími karboxylovými kyselinami. Díky vysoké kyselosti vznikají v roztoku s alkoholy odpovídající estery velmi snadno. Kyselina mravenčí má podobné redukční účinky jako aldehydy (6).

### 2.1.2 Kyselina octová

Kyselina octová, systematicky kyselina ethanová, je bezbarvá kapalina s charakteristickým zápachem s teplotou varu 118–119 °C. V čisté formě, nezředěná, bývá často označována jako ledová kyselina octová (vzhledem k relativně vysoké teplotě tání kolem 16–17 °C). Je kategorizována jako slabá kyselina, koncentrovaná však působí při kontaktu s pokožkou žíravě. Podobně jako kyselina mravenčí vytváří dimery (9).

Kyselina octová je hydrofilní (polární) protické rozpouštědlo. Rozpouští nejenom polární sloučeniny jako například anorganické soli, ale i některé nepolární látky. Je mísitelná s polárními i nepolárními organickými rozpouštědly, například methanolem, chloroformem, hexanem. S vyššími alkany (s osmi a více uhlíkovými jednotkami) není neomezeně mísitelná

a rozpustnost klesá s rostoucím řetězcem (10). Patří mezi významná průmyslová rozpouštědla.

V přírodních podmínkách kyselina octová vzniká aktivitou anaerobních bakterií, především rodu *Clostridium* nebo *Acetobacter* konverzí organického materiálu, zejména sacharidů. Bakterie rodu *Clostridium* jsou schopné metabolizovat cukry přímo, což by naznačovalo, že budou v produkci kyseliny octové efektivnější než bakterie, které ji vytváří oxidací ethanolu (*Acetobacter*). Bakterie rodu *Clostridium* jsou však významně méně tolerantní ke kyselému prostředí. Rezistentní druhy jsou schopné přežít v prostředí pouze několika jednotek procent obsahu kyseliny octové, zatímco bakterie *Acetobacter* jsou schopné přežít v prostředí s obsahem až 20 %. Z tohoto důvodu je pro biotechnologickou výrobu kyseliny octové vhodnější použít bakterie *Acetobacter* (11).

### 2.1.3 Kyselina propionová

Kyselina propionová, systematicky propanová, je bezbarvá kapalina s charakteristickým dráždivým zápachem s teplotou varu 141 °C. Podobně jako kyselina mravenčí a octová vytváří dimery vázané vodíkovou vazbou, jak v plynné tak i kapalně fázi. Průmyslově se kyselina propionová vyrábí především katalyzovanou hydrokarboxylací ethylenu (12).

V bioplynových stanicích je kyselina propionová běžným produktem, kde vzniká kvasnými procesy, které vyžadují mikrobiální aktivitu (13). Biologicky je kyselina propionová produkována jako její koenzym-A ester, propionyl-CoA, metabolickým rozkladem mastných kyselin obsahující lichý počet uhlíkových atomů, dále pak vzniká i rozkladem některých aminokyselin. Bakterie rodu *Propionbacterium* vytváří kyselinu propionovou jako koncový produkt jejich anaerobního metabolismu. Tento druh bakterií se nachází například v žaludku přežvýkavců. Je také produkována v tlustém střevě rozkladem vlákniny (14).

### 2.1.4 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná (kyselina 2-hydroxypropanová) je bílá, ve vodě rozpustná látka s teplotou varu 122 °C. V kapalném skupenství je bezbarvá. Ve formě její konjugované báze, laktátu, se podílí na různých biochemických procesech. Kyselina mléčná má v molekule centrum chiralidy, je tedy opticky aktivní a vytváří zrcadlově souměrné isomery. Kyselina mléčná je hygroskopická, její racemická směs je neomezeně mísitelná s vodou a ethanolem.

Průmyslově se kyselina mléčná převážně vyrábí bakteriální fermentací sacharidů případně chemickou syntézou z acetaldehydu (15).

Kyselina mléčná je přirozenou součástí kysaných mléčných produktů. Je používána také jako potravinové aditivum pod označením E270 kde slouží jako konzervant a jako regulátor chuti.

### **2.1.5 Kyselina máselná**

Kyselina máselná, systematickým názvem kyselina butanová, je bezbarvá olejovitá kapalina s velmi nepříjemným zápachem s teplotou varu 163,8 °C. Vzniká žluknutím tuků u mléčných produktů, je koncovým produktem fermentačního procesu anaerobních bakterií, nejčastěji rodu *Clostridium butyricum*. V živočišném tuku se vyskytuje ve formě triacylglyceridů, z nichž je kyselina máselná hydrolyticky uvolňována. Kyselina máselná má strukturální isomer, kyselinu 2-methylpropanovou (16).

### **2.1.6 Kyselina valerová**

Kyselina pentanová je, podobně jako ostatní nižší karboxylové kyseliny, bezbarvá kapalina s nepříjemným zápachem s teplotou varu 185 - 186 °C. Kyselina valerová tvoří několik izomerů, z nichž převažuje kyselina isovalerová (kyselina 3-methylbutanová). Je součástí esenciálních olejů

### **2.1.7 Kyselina kapronová**

Kyselina kapronová, systematicky kyselina hexanová, je bezbarvá olejovitá kapalina s bodem varu 205,8 °C. Má nízkou rozpustnost ve vodě (1,08 g/100 ml), je plně mísitelná s většinou nepolárních rozpouštědel. V přírodě se běžně vyskytuje jako součást živočišných tuků, rostlinných olejů. Kyselina kapronová se často využívá na výrobu jejích esterů v potravinářství (17).

## 2.2 Význam těkavých mastných kyselin v bioplynových stanicích

Anaerobní digesce, tedy rozklad za nepřístupu vzduchu, je jedním z nejefektivnějších způsobů zpracování biodegradovatelného organického odpadu. To zahrnuje především zbytky potravin, zemědělské odpady a fekální materiál. Tímto způsobem je odpad rozložen a zároveň je produkován bioplyn.

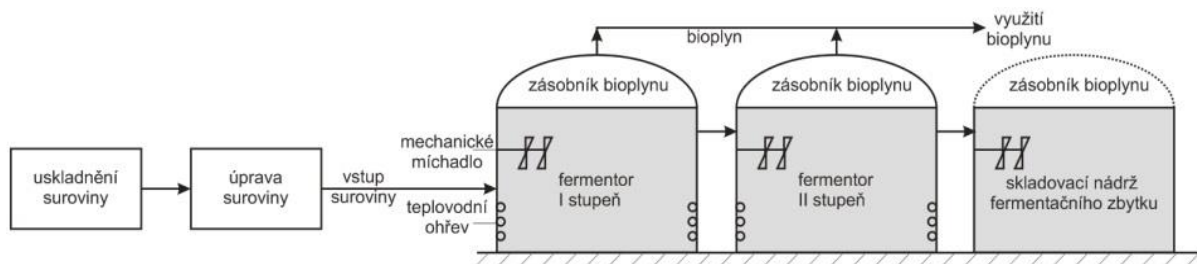
### 2.2.1 Technologie bioplynových stanic

Bioplynová stanice je zařízení, kde je využito procesu anaerobní digesce ke zpracování bioodpadu, případně jiného biologicky rozložitelného materiálu. Jedním z produktů anaerobní digesce je bioplyn, který lze využít jako alternativní zdroj energie.

Bioplynová stanice, respektive fermentor bioplynové stanice, může být provozována v závislosti na dávkování vstupního materiálu, buď jako kontinuální nebo jako diskontinuální (18). Způsob provozování je závislý na použitém vstupním materiálu. U kontinuálně provozovaných systémů je čerstvý materiál nepřetržitě dávkován do fermentoru, tím je dosaženo kontinuálního dávkování vstupního materiálu a nepřetržité produkce bioplynu v optimálním množství a kvalitě. Tento způsob je využíván u bioplynových stanic pracujících s nízkým obsahem sušiny (do 15 %) ve fermentoru. V tomto případě je možné materiál dávkovat v pravidelných intervalech, v nižších dávkách a v průběhu celého dne. Naopak u diskontinuálně provozovaných bioplynových stanic je veškerý materiál dávkován najednou a zůstává ve fermentoru po celou dobu trvání procesu fermentace. Další materiál není možno v průběhu procesu dávkovat ani odstranit. Produkce bioplynu je obecně nejvyšší na začátku procesu a poté pozvolně klesá. Po skončení je fermentor vyprázdněn a znovu naskladněn čerstvým materiálem. Tento způsob je praktikován u bioplynových stanic pracujících s vyšší sušinou (nad 30 %) ve fermentoru. V České republice je většina bioplynových stanic provozována v kontinuálním režimu, výjimku tvoří některé bioplynové stanice zpracovávající zemědělské odpady s vysokým obsahem sušiny a biologicky rozložitelný komunální odpad (19).

Technicky nejjednodušší bioplynové stanice používají k produkci bioplynu pouze jeden fermentor pro celý proces anaerobní fermentace, jde o jednostupňovou fermentaci (18). U tohoto typu konstrukce bioplynové stanice dochází ke všem mikrobiálním procesům, hydrolýze, acidogenezi, acetogenezi a metanogenezi najednou. Tohoto způsobu fermentace bývá využíváno pro zpracování kalů, potravinářských odpadů a zemědělských odpadů. Nejčastěji se v praxi setkáváme s dvoustupňovým procesem zpracování materiálu. Při dvoustupňové fermentaci probíhá odděleně v jedné nádrži hydrolýza a acidogeneze a ve

druhé nádrži acetogeneze a metanogeneze. U dvoustupňové fermentace jsou použity běžné typy fermentorů, ve kterých je zpracováváný materiál míchán. Tento typ procesu může být výhodný, pokud vstupní substrát obsahuje snadno rozložitelné látky (energetické plodiny, rostlinné zbytky) (18; 20).



Obr. 2: Schéma dvoustupňové bioplynové stanice (20).

### 2.2.2 Bilance tvorby bioplynu

Rozklad čistých organických látek za nepřístupu vzduchu je z hlediska převodu hmoty a energie ze substrátu do produktů dobře popsán, v praxi se však vzácně setkáváme se substrátem s přesně určeným složením. Většinou je nutné anaerobně zpracovávat složitý substrát, navíc s proměnlivým počtem i poměrem jeho složek. Při provádění bilance anaerobního mikrobiálního systému s daným substrátem je třeba postihnout nejen stechiometrické, ale i energetické vztahy mezi substrátem a produkty.

Pro popsání kvality substrátu z hlediska jeho energetického obsahu je používáno několik kritérií. K tomuto účelu může posloužit ekvivalent dostupných elektronů obsažených v substrátu (19). Dostupnými elektrony jsou označeny ty, které mohou být přeneseny na kyslík při spálení látky. Na základě biochemických reakcí tvorby ATP je založen výpočet jeho množství v molech syntetizovaných při rozkladu jednoho molu substrátu (21). Další možnost zjištění energetické účinnosti procesu je porovnání spalných tepel substrátu a produktů (22; 23).

Pro celkovou hmotově energetickou bilanci anaerobního procesu se často využívá (24) elementárního složení substrátu. Stejně jako u dříve uvedených kritérií není tento údaj vždy snadno dostupný.

### 2.2.3 Problematika řízení a kontroly bioplynových stanic

Anaerobní rozklad organického materiálu je souborem mnoha procesů, které jsou v dynamické rovnováze. Každá změna některého z dílčích procesů může zapříčinit celkovou nestabilitu procesu metanizace. Mezi hlavní faktory způsobující nestabilitu procesu metanizace lze uvést: změny teploty procesu, změny v zatížení organickými látkami, změny ve složení a vlastnostech zpracovávaného materiálu a v neposlední řadě expozice toxickými látkami.

O stavu a průběhu procesu vypovídá řada veličin, které je možné analyticky nebo biologickými metodami sledovat. Takto získané proměnné veličiny slouží ke kontrole a řízení procesu. Podle toho k jakým účelům jsou tyto proměnné použity, lze je rozdělit do dvou hlavních skupin: proměnné pro řízení procesu a indikátory stavu procesu (18; 20).

Regulací proměnných veličin je možné ovlivňovat průběh procesu. Mezi tyto veličiny lze zařadit např. teplotu reaktoru. Jde o proměnnou, která je nejlépe technicky zvládnutelná jak v oblasti měření, tak i regulace a zpravidla nezpůsobuje problémy při řízení procesu. Další důležitou proměnnou je zatížení reaktoru, tedy dávkování substrátu do reaktoru a jeho regulace. Třetí proměnnou je dávkování chemikálií, které jsou využívány například k úpravě neutralizační kapacity reakční směsi (18).

Indikátory stavu procesu slouží k popsání průběhu dílčích procesů nebo celkového průběhu anaerobního rozkladu. Těmito veličinami je možné charakterizovat plynnou, kapalnou nebo pevnou fázi reakční směsi (20).

V plynné fázi je především sledováno celkové množství produkovaného bioplynu a jeho složení. V kapalně fázi je nejčastěji sledováno pH směsi, koncentrace TMK, neutralizační kapacita, CHSK, celkový organický uhlík, rozpuštěné látky celkové, organické i anorganické (solnost), koncentrace živin a jiných specifických látek a oxidačně-redukční potenciál. V tuhé fázi je sledována koncentrace suspendovaných látek a jejich organická frakce, koncentrace organického dusíku, sedimentační a filtrační vlastnosti suspendovaných látek (25).

Vzhledem ke komplexnosti anaerobních rozkladných procesů musí být sledován celý komplex proměnných. Jednou proměnnou nelze samostatně charakterizovat průběh procesu. Nelze jednoznačně předepsat, které z uvedených proměnných musíme sledovat a jaká má být četnost sledování. To záleží na konkrétních podmínkách provozu, zejména na druhu zpracovávaného znečištění, typu reaktoru, jeho zatížení a způsobu provozu a na stabilitě funkce reaktoru.



#### 2.2.4 Význam nižších mastných kyselin při řízení procesu

Koncentraci nižších mastných kyselin v substrátu lze zařadit mezi jeden z nejcitlivějších indikátorů stability procesu. Vyšší vypovídací hodnotu má sledování koncentrace jednotlivých mastných kyselin než celkové sumy mastných kyselin. Mezi nejdůležitější patří koncentrace kyseliny octové, kyseliny propionové a kyseliny máselné. Tyto proměnné značí metabolickou aktivitu dvou nejcitlivějších skupin mikroorganismů, a to vodík produkujících acetogenů a acetotrofních metanogenů (21).

Akumulace TMK v systému značí nerovnováhu mezi aktivitou mikroorganismů produkujících a rozkládajících kyseliny, což je typickým znamením stresové situace v anaerobním reaktoru. Z povahy procesu však není možné obecně definovat limitní koncentrace kyselin indikující stabilitu nebo nestabilitu procesu. Maximální koncentrace TMK, při které je možné anaerobní proces udržet v ustáleném stavu, je závislý na řadě faktorů zahrnující složení substrátu, podmínky vlastní fermentace (zatížení, doba zdržení, teplota, neutralizační kapacita, adaptace biomasy, pH) a technologické uspořádání (jednostupňová nebo vícestupňová fermentace, biomasa ve formě suspenze, granulí nebo biofilmu, hydraulické uspořádání reaktorů). Náhlé změny technologických podmínek, především teploty a zatížení, způsobují následné zvýšení koncentrace všech mastných kyselin. Nebezpečí tohoto zvýšení závisí na jeho velikosti a na „volné výkonnostní“ kapacitě systému. Je-li systém na hranici své výkonnosti, pak i po malém zvýšení koncentrace mastných kyselin může dojít až ke kolapsu systému (18; 20).

Maximální koncentrace TMK v reaktoru, která ještě nezpůsobí zhroucení metanizačního procesu závisí na velikosti neutralizační kapacity, respektive na koncentraci hydrogenuhličitanů v reakční směsi (26).

Koncentrace těkavých mastných kyselin v digestátu tedy odráží celkovou stabilitu zplyňování organického materiálu. Zastoupení methanu a oxidu uhličitého, vznikajícího v průběhu tohoto procesu, zůstává neměnné, pokud je systém stabilní. Pokud dochází k nárůstu v obsahu  $\text{CO}_2$  na úkor methanu, tedy dochází k inhibici methanogeneze, je to způsobeno příliš vysokou koncentrací těkavých mastných kyselin v digestátu. Z tohoto důvodu je třeba monitorovat jejich koncentraci pro volbu dalšího technologického postupu (27).

## 2.3 Volba analytické metody pro stanovení TMK

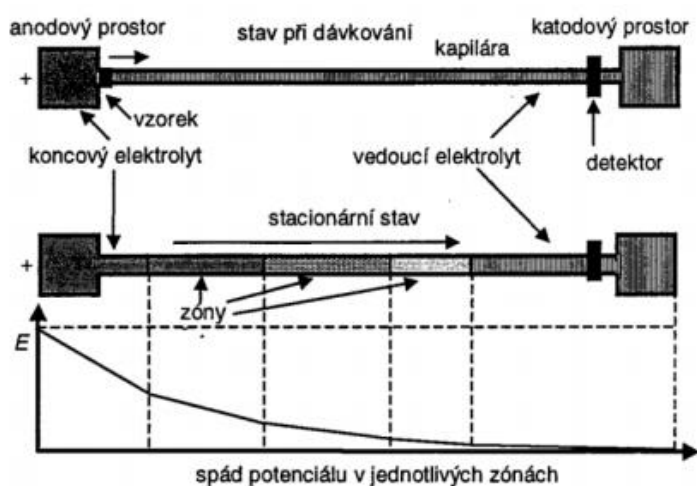
Při volbě vhodné analytické metody je třeba zvážit mnoho faktorů, záleží především na charakteru analyzovaných látek a požadavkům na meze stanovitelnosti.

Pro stanovení TMK byla popsána řada metod. Mezi tradiční způsob lze uvést metodu, kdy jsou těkavé kyseliny oddestilovány s vodní parou a poté stanoveny alkalimetry titrací odměrným roztokem hydroxidu na indikátor fenolftalein. Tato metoda však není selektivní a výsledky stanovení jsou uváděny jako koncentrace kyseliny octové. Mezi instrumentální metody, které je možné využít ke stanovení karboxylových kyselin, patří izotachografie, potenciometrie, spektrofotometrie, kapalinová chromatografie a především metoda plynové chromatografie (3).

### 2.3.1 Stanovení pomocí izotachografie

Izotachografii lze zařadit mezi elektromigrační separační metody. Vzorek je vnesen mezi dva elektrolyty s různou iontovou pohyblivostí. Odděleny jsou buď pouze kationty, nebo anionty. Když jsou separovány kationty (analogicky lze popsat separaci aniontů), vzorek je vnesen mezi vedoucí elektrolyt, jehož kationty mají větší pohyblivost, a koncový elektrolyt, jehož kationty mají nižší pohyblivost než jakýkoliv kation vzorku. Vedoucí elektrolyt se na počátku izotachografie nachází v katodovém prostoru a v koloně, koncový elektrolyt v anodovém prostoru. Kromě separovaných iontů jsou vždy obsaženy i opačně nabití protiionty, díky nimž je zachována v zónách elektroneutralita (28).

Při vložení napětí dochází k dělení vzorku podle pohyblivosti jednotlivých složek. Rychlejší kationty se dostávají dopředu a pomalejší se opoždějí. Po určité době dochází k ustanovení stacionárního stavu, ve kterém tvoří jednotlivé zóny kationtů seřazené za sebou podle klesající pohyblivosti. Ve stacionárním stavu se zóny pohybují stálou a konstantní rychlostí. Koncentrace iontu uvnitř zóny je stálá. 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 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 (28; 29).



Obr. 3: Schéma izotachoforézy a průběh potenciálu v jednotlivých zónách (28).

Izotachoforézu je možné využít pro analýzu vod, půd, hnojiva a vzorků 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. Tato metoda nejvhodnější alternativou ke stanovení TMK pomocí GC/MS především tam, kde technika plynové chromatografie není dostupná. Ve většině případů je však čím dál tím více využíváno techniky plynové chromatografie (28).

### 2.3.2 Analýza těkavých mastných kyselin pomocí GC-MS

Analytická metoda, která je 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. Základním požadavkem kvalitativní analýzy je separace všech složek. 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 (30).

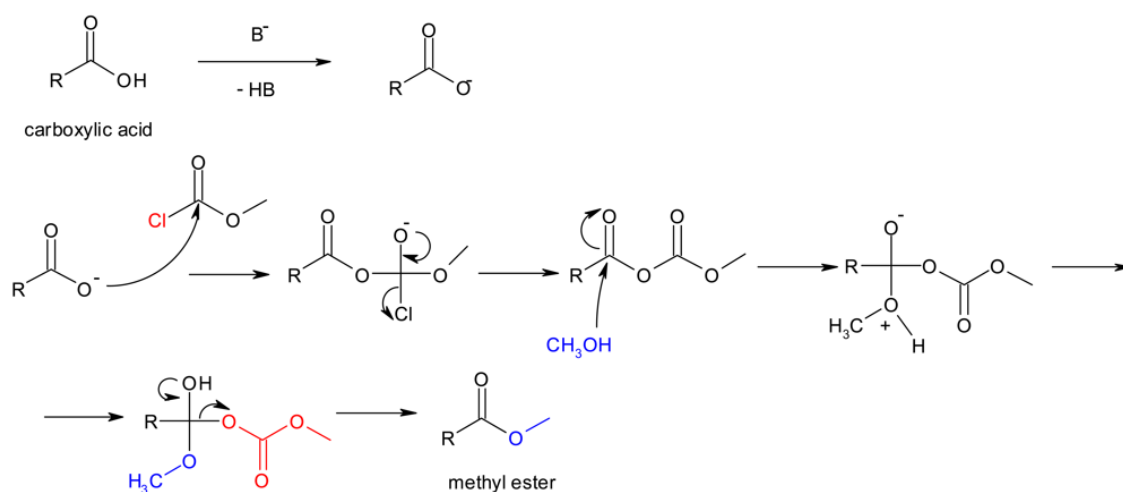
Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty dělí na základě hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Hmotnostní spektrometrie se řadí mezi metody destrukční, spotřeba látky k identifikaci je však malá (28).

Stanovení nižších mastných kyselin pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií patří mezi nejvyužívanější metody stanovení, především vzhledem k její vzrůstající popularitě.

### 2.3.3 Derivatizace analytů

Vzhledem k relativně vysokým bodům varu TMK (zejména kyseliny valerové a kapronové) je vhodné využít derivatizační reakce k pozměnění struktury analytů pro zvýšení těkavosti, aby byl podpořen přechod do plynné fáze. Tato práce je zaměřena na derivatizaci s využitím ethylchloroformiátu, při níž vznikají odpovídající ethylestery (32).

Chloroformiáty s jednoduchými alkyly (methyl, ethyl nebo isobutyl) jsou známá činidla využívána zejména k derivatizaci aminoskupin, což vede k využití při plynové chromatografii. V katalyzované reakci pomocí pyridinu v bazickém prostředí za přítomnosti alkoholu jsou použitelné jako esterifikační činidla. Tato reakce probíhá z kinetického hlediska velmi rychle, v řádech sekund, a to následujícím mechanismem (9). V reakci vzniká jako vedlejší produkt diethylkarbonát.



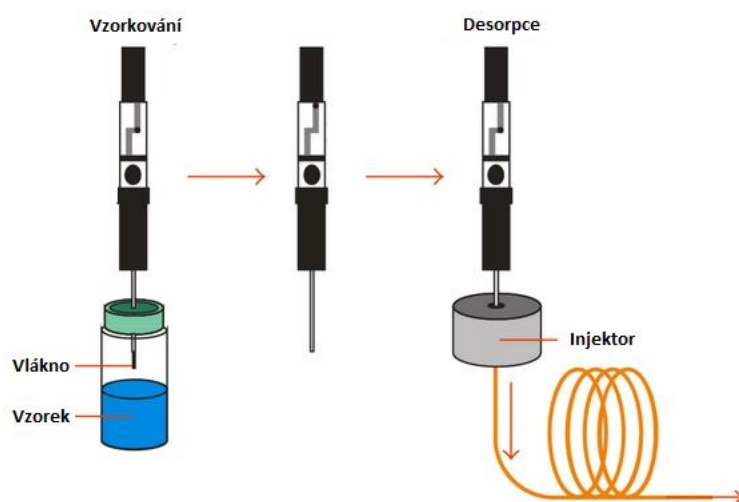
Obr. 4: Mechanismus derivatizační reakce (9).

Těkavé mastné kyseliny lze takto rychle převést na ethyl estery s využitím ethylchloroformiátu v ethanolickém prostředí, a to s výtěžky vyššími než 98 % (32).

### 2.3.4 Mikroextrakce na tuhou fázi

Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) je technika, která využívá sorbentu naneseného na vlákno k extrakci a zakoncentrování analytů ze vzorku. Tímto sorbentem může být kapalný polymer nebo pevná látka. Přechod analytů na vlákno je možný jak z kapalné, tak plynné fáze. Po dosažení rovnováhy je množství látek, které jsou adsorbovány na sorbent, úměrné koncentraci analytů ve vzorku. Po provedení extrakce je vlákno přeneseno do

injektoru plynového chromatografu, kde jsou analyty vlivem vysoké teploty desorbovány. Metoda SPME je oproti jiným extrakčním technikám rychlejší a eliminuje nutnost využití rozpouštědel (33).



Obr. 5: Schéma techniky SPME.

### 2.3.5 Vzorkování metodou headspace

Headspace je technika, která je spojena výhradně s plynovou chromatografií. Vzorkuje se takzvaný hlavový prostor (z anglického headspace), z něhož je k analýze odebrána plynná fáze, která je v uzavřené nádobě v rovnováze s analyzovaným vzorkem v kapalně fázi. Používají se skleněné tlakové nádoby uzavřené pružným septem, které slouží k plynotěsnému odběru plynu po průniku jehly odběrové stříkačky nebo jehly autosampleru (33).

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Použité chemikálie a činidla

- Standardy TMK: FA - čist. 98,0 % (Fluka); AA - čist. 99,8 % (Fluka); PA - čist. > 99,0 % (Riedel-de Haën); mléčnan sodný - čist. > 99,0 % (Sigma-Aldrich); BA - čist. > 99,5 % (Fluka); iBA - čist. > 99,0 % (Merck); VA - čist. > 99,0 % (Sigma-Aldrich), iVA - čist. 99,0 % (Sigma-Aldrich); CA - čist. 99,5 % (Sigma-Aldrich)
- Standardy esterů TMK: EF, EA, EP, EiB, EB, EV, EiV, EC čist. > 99% (Sigma-Aldrich)
- Vnitřní standardy: kyselina octová- D4; kyselina diethyloctová a kyselina 2-hydroxymáselná
- Ethylchloroformiát- čist. > 98% (Fluka)
- Ethanol - čist. > 99,8 % (Sigma-Aldrich)
- Pyridin - čist. > 99 % (Sigma Aldrich)
- Hydroxid sodný - čist. p.a. (Penta)
- NaCl - čist. p.a. (Penta)
- NaHCO<sub>3</sub> - čist. p.a. (Lachema)
- Helium - čist. 99,999 % obj. (Linde)

### 3.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Plynový chromatograf: Trace 1310 (Thermo)
- Chromatografická kolona: Rxi-624 Sil MS, fáze: silarylenphase (podobná kombinaci 6% kyanopropylfenyl / 94% dimethylpolysiloxan), délka: 30 m; vnitřní průměr: 0,25 mm; tloušťka filmu: 1,4 μm (Restek)
- Hmotnostní detektor: TSQ 8000 Evo Triple Quadrupole (Thermo)
- Headspace autosampler: Combi PAL (CTC Analytics / Leap Technologies)
- SPME vlákna: Carboxen/PDMS; PDMS/DVB; DVB/Carboxen/PDMS (Supelco)
- Analytické váhy: BBI-31 (Boeco)
- Termoblok MR Hi-Tec (Heidolph)
- Ultrazvuková lázeň: Powersonic 603 (HST Technology)
- Odměrné sklo třídy přesnosti A.
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemech 25, 50, 100, 250 a 500 μl (Hamilton)
- Automatické nastavitelné pipety BioPette 0,1 – 1 ml, 0,5 – 5,0 ml (Labnet)

### 3.3 Příprava roztoků standardů

#### 3.3.1 Příprava zásobních roztoků

Z každé standardní látky TMK byl zvlášť připraven zásobní roztok (ZR-zkratka jednotlivých TMK) o koncentraci 10 mg/ml navážením přesně asi 100 mg látky do 10 ml odměrné baňky, rozpuštěním a doplněním destilovanou vodou po rysku.

Ze standardů esterů TMK byly připraveny zásobní roztoky (ZR-zkratka jednotlivých esterů TMK) navážením přesně asi 100 mg jednotlivých látek do 10 ml odměrných baněk a doplněním ethanolem po rysku.

#### 3.3.2 Příprava pracovních roztoků

Směsný pracovní roztok (TMK-1) byl připraven pipetováním 5 ml ze zásobních roztoků TMK do 50 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Dále byl připraven 10x zředěný, pracovní roztok (TMK-2) pipetováním 1ml TMK-1 do 10 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Obdobně byl připraven ještě 100x zředěný pracovní roztok (TMK-3).

Ze zásobních roztoků esterů TMK byl dále připraven směsný pracovní roztok o koncentraci 1 mg/ml pipetováním 5 ml roztoků do 50 ml odměrné baňky a doplněním ethanolem po rysku.

Pracovní roztok vnitřních standardů o koncentraci 60 µg/ml byl připraven ze zásobních roztoků o koncentraci 5 mg/ml pipetováním 300 µl do 25 ml odměrné baňky a doplněním etanolem po rysku.

Pracovní roztoky byly uchovávány v chladničce při 5 °C po dobu nejdéle 15 měsíců. Výsledné koncentrace analytů v pracovních roztocích jsou uvedeny v Tab. III.

Tab. III: Výsledné koncentrace analytů v pracovních roztocích.

Označení roztoku	Koncentrace analytů [µg/ml]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
TMK-1	952	1003	985	956	970	944	978	968	963
TMK-2	95,2	100,3	98,5	95,6	97,0	94,4	97,8	96,8	96,3
TMK-3	9,52	10,03	9,85	9,56	9,70	9,44	9,78	9,68	9,63

### 3.3.3 Příprava kalibračních roztoků

Bylo připraveno celkem 10 kalibračních úrovní, každá ve třech opakováních. Kalibrační roztoky byly připraveny dle Tab. IV do vialek o objemu 20 ml vialek určených k headspace analýze, v nichž následně byla provedena derivatizační reakce.

Tab. IV: Přehled kalibračních roztoků.

Označení roztoku	Koncentrace analytu [µg/ml]	Objem TMK-1 [µl]	Objem TMK-2 [µl]	Objem TMK-3 [µl]	Objem H <sub>2</sub> O [µl]	Objem 5M NaOH [µl]
VFA-400	400	200	0	0	250	50
VFA-200	200	100	0	0	350	
VFA-100	100	50	0	0	400	
VFA-50	50	25	0	0	425	
VFA-20	20	10	0	0	440	
VFA-10	10	0	50	0	400	
VFA-5	5	0	25	0	425	
VFA-2	2	0	10	0	440	
VFA-1	1	0	0	50	400	
VFA-0,5	0,5	0	0	25	425	
BLANK	0	0	0	0	450	



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace podmínek derivatizace

#### 4.1.1 Výchozí reakční podmínky

Esterifikace standardů byla prováděna v headspace vialkách o objemu 20 ml. Optimalizace jednotlivých parametrů byla prováděna na základě podmínek přejatých z publikace (35). Do vialek bylo postupně nadávkováno (tučným písmem jsou označené přísady, které byly předmětem optimalizace reakčních podmínek):

- 410  $\mu$ l Destilované vody
- 40  $\mu$ l PR-TMK-1
- **50  $\mu$ l 5M roztoku NaOH**

Po alkalizaci následovaly přísady:

- 100  $\mu$ l PR-IS
- **300  $\mu$ l EtOH**
- **85  $\mu$ l Pyridinu**
- **100  $\mu$ l ECF**

Po přidavku ethylchloroformiátu do reakce byla vialka uzavřena a reakční směs se nechala reagovat 10 minut. Průběh reakce provází změna barvy reakční směsi do žlutého zabarvení a poté dochází k postupnému odbarvování. Následoval přísadek roztoku  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{NaCl}$ .

- **800  $\mu$ l 0,05M  $\text{NaHCO}_3$**
- **8 ml 10% roztoku NaCl**

Po provedení derivatizace a následném vysolení, byly vzorky analyzovány metodou GC/MS s využitím automatického dávkovače vzorků Combi PAL.

Na čtyřech typech různých vláken SPME byla testována extrakce (Carboxen/PDMS; Polyakrylát; PDMS/DVB; DVB/Carboxen/PDMS) z headspace prostoru. Touto metodou však nebylo možné dosáhnout přijatelné opakovatelnosti, například u kyseliny kapronové a mléčné přesahovala RSD 30 % mezi jednotlivými analýzami. Výsledky nevyhovovaly kritériím přijatelnosti přejatým z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements (36). Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto pro stanovení TMK využít metodu headspace. Jedná o přímý způsob odběru plynů k analýze, u kterého byl předpoklad získání stabilnějších výsledků měření.

## 4.1.2 Testovací analýza

Podmínky chromatografické separace jsou shrnuty v následujícím přehledu.

- Objem nástřiku: 500  $\mu$ l
- Teplota injektoru: 200 °C
- Režim injektoru: split (1:10)
- Průtok plynu: 1,0 ml/min (konstantní)
- Hmotnostní detekce: FS v rozsahu 24 – 400 m/z; elektronová ionizace při 70 eV
- Teplotní gradient je popsán v Tab. V

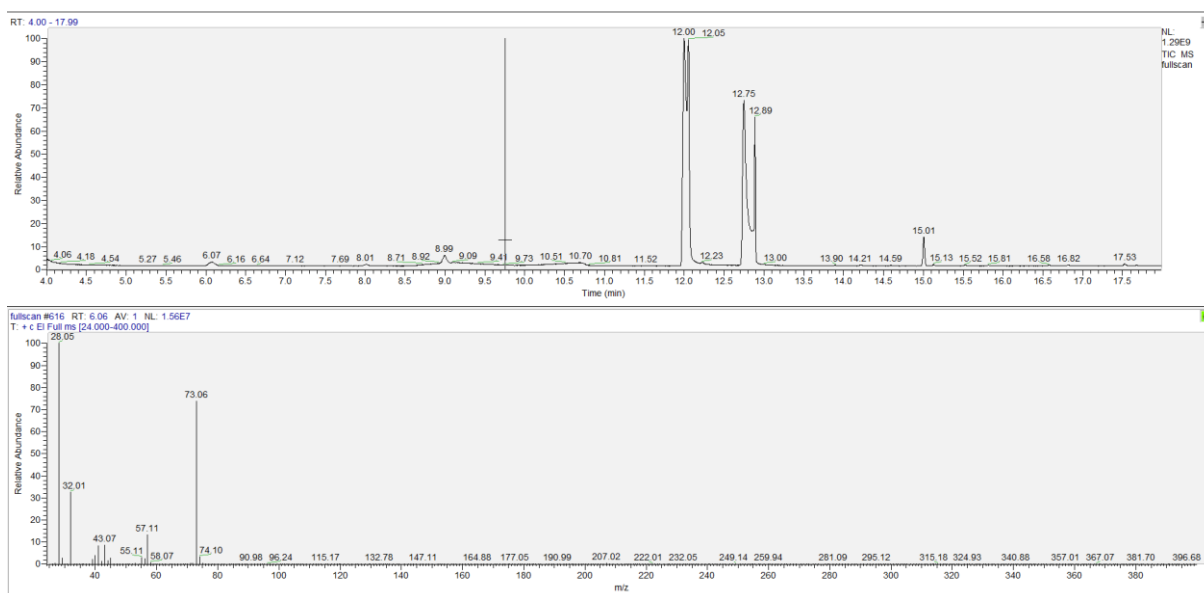
Tab. V: Teplotní gradient.

Fáze	Nárůst [° C/min]	Teplota [° C]	Doba trvání [min]
počátek	0	30	5
1	10	100	0
2	20	250	3

Nastavení headspace autosampleru před odběrem k plynu k nástřiku:

- Teplota temperace vialky: 50 °C
- Doba temperace: 30 minut

Oba dva dominantní píky získané v režimu měření fullscan představují přebytek pyridinu a diethylkarbonátu, který v reakci vzniká jako vedlejší produkt. Pro získání adekvátní odezvy jednotlivých esterů TMK bylo k detekci třeba zvolit specifické hmoty odpovídající jednotlivým analytům.



Obr. 6: Chromatogram- testovací analýza v režimu fullscan.

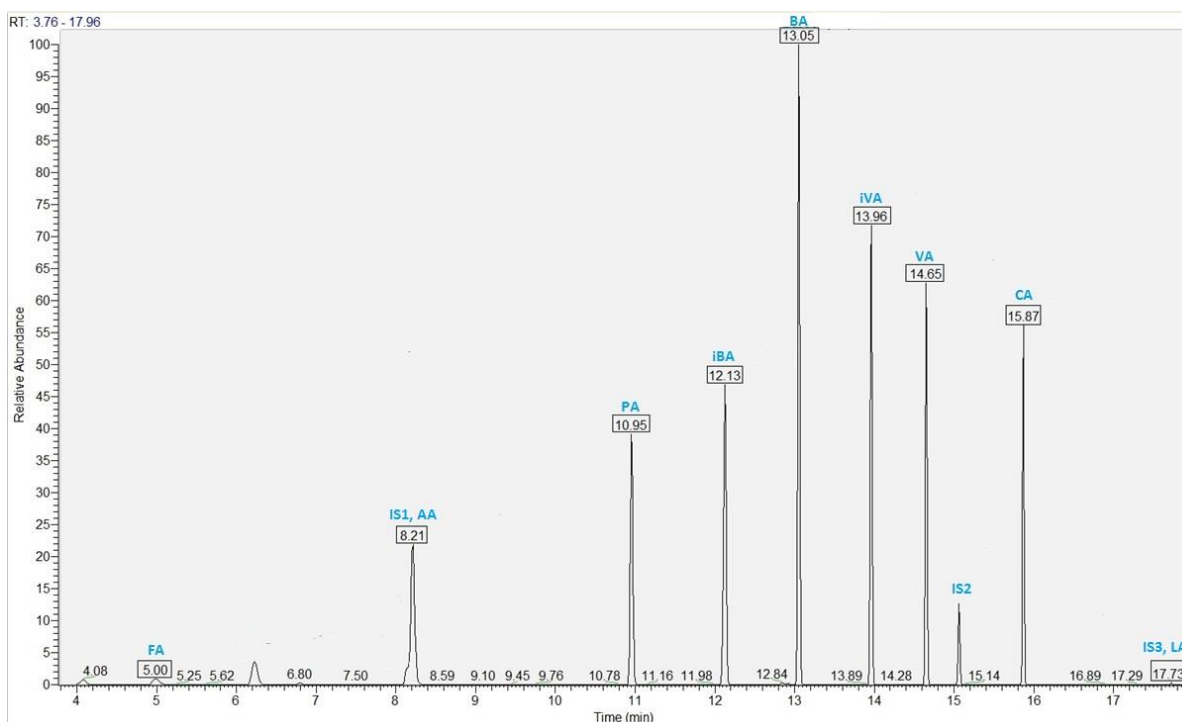
### 4.1.3 Volba iontů

Po identifikaci jednotlivých analytů v chromatogramu byly v odpovídajících retenčních časech vybrány na základě publikace (35) vhodné ionty k detekci, které jsou uvedeny v Tab. VI. IS1 představuje deuterovanou kyselinu octovou (IS pro FA, AA, PA); IS2 kyselinu diethyloctovou (IS pro BA, iBA, VA, iVA, CA) a IS3 kyselinu 2-hydroxymáselnou (IS pro LA)

Tab. VI: Vybrané ionty k detekci.

Analyt	FA	IS1	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	IS2	CA	LA	IS3
Retenční čas [min]	5,00	8,13	8,21	10,95	12,13	13,05	13,96	14,65	15,05	15,87	17,72	17,73
Iont(y) pro ověření [m/z]	56	73	43	75	71, 88	71, 116	71, 116	101, 131	71, 101	88	145	159
Iont pro kvantifikaci [m/z]	74	46	70	57	116	88	88	85	116	99	45	131

Vzhledem k tomu, že došlo k úplnému rozdělení všech analytů (kromě dvojice IS1, AA a LA, IS3- mají rozdílné specifické hmoty), nebylo nutné provádět úpravy podmínek separace. Výsledný chromatogram v režimu měření SIM je uveden na Obr. 7.



Obr. 7: Chromatogram- testovací analýza v režimu SIM.

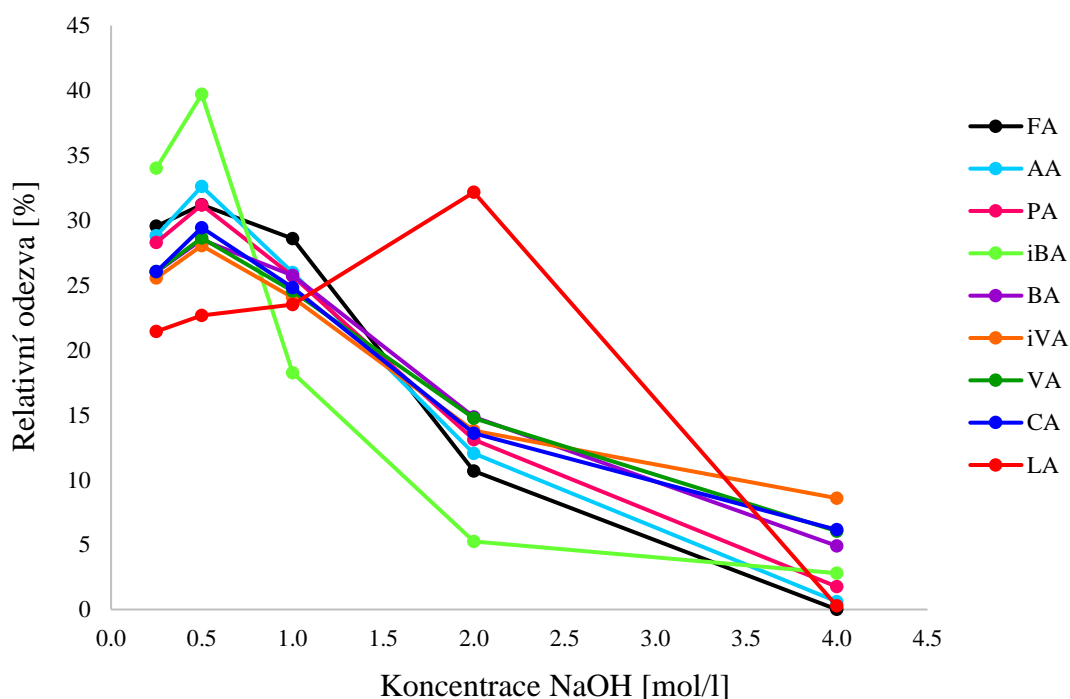
#### 4.1.4 Optimalizace přídavku NaOH do reakce

Předpokladem pro řádný průběh derivatizační reakce je převedení jednotlivých TMK do odpovídající iontové podoby, čehož bylo dosaženo přídavkem hydroxidu sodného. Testováním různých koncentrací bylo zamýšleno nalezení optimální úrovně pro výtěžek derivatizace u sledovaných analytů.

Vliv koncentrace NaOH v reakční směsi byl testován v rozsahu 0,25 – 4 mol/l. Porovnávána byla relativní odezva detektoru pro jednotlivé koncentrace k sumě odezev detektoru všech koncentrací vždy pro každý analyt zvlášť. Každá koncentrační úroveň byla analyzována v pěti opakováních.

Tab. VII: Závislost odezvy jednotlivých analytů na přídavku NaOH.

Koncentrace NaOH ve vzorku [mol/l]	Relativní odezva [%]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
0,25	29,55	28,79	28,29	34,02	26,02	25,55	26,04	26,03	21,42
0,50	31,19	32,60	31,18	39,70	28,50	28,05	28,63	29,43	22,65
1,00	28,59	25,97	25,69	18,24	25,73	24,05	24,55	24,81	23,49
2,00	10,67	12,02	13,08	5,25	14,85	13,77	14,74	13,59	32,15
4,00	0,01	0,61	1,76	2,80	4,90	8,58	6,04	6,14	0,28



Obr. 8: Závislost odezvy jednotlivých analytů na přídavku NaOH.

S výjimkou LA poskytovaly všechny analyty nejvyšší odezvu při koncentraci 0,5 mol/l NaOH ve vzorku. Pro další analýzy byl tedy zvolen přídavek 50  $\mu$ l 5M roztoku NaOH k alkalizaci vzorků.

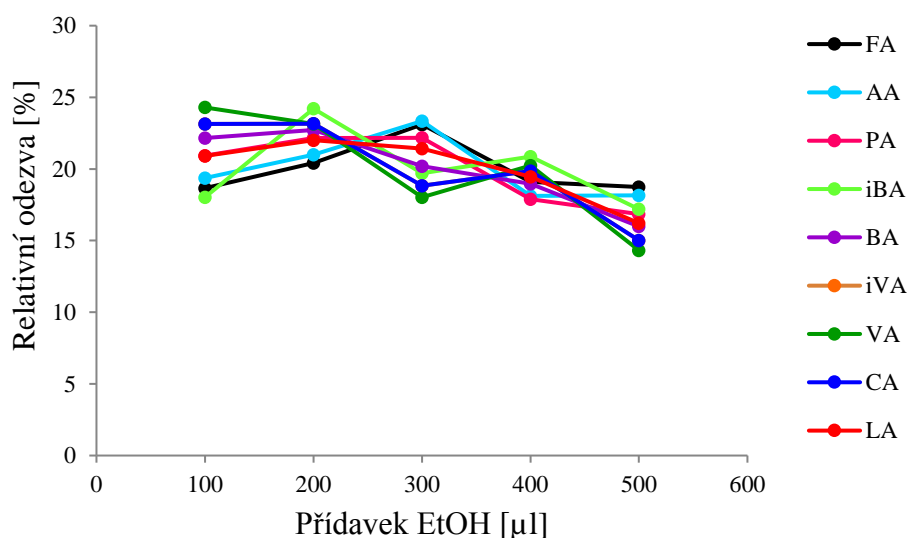
#### 4.1.5 Optimalizace přídavku ethanolu do reakce

Dále byly testovány různé přídavky ethanolu do reakce, v rozsahu 100 – 500  $\mu$ l. Přítomnost ethanolu je základním předpokladem pro průběh reakce, kde plní funkci nukleofilního činidla a bylo tedy předpokládáno, že jeho množství bude mít přímý vliv na výtěžek.

Porovnávána byla relativní odezva detektoru pro jednotlivé přídavky k sumě odezev detektoru všech přídavků vždy pro každý analyt zvlášť. Každá koncentrační úroveň byla analyzována v pěti opakováních.

Tab. VIII: Závislost odezvy jednotlivých analytů na přídavku ethanolu.

Přídavek ethanolu do reakce [ $\mu$ l]	Relativní odezva [%]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
100	18,66	19,37	20,93	18,03	22,15	23,15	24,29	23,15	20,90
200	20,41	21,00	22,15	24,21	22,72	23,16	23,13	23,16	22,01
300	23,11	23,34	22,17	19,71	20,19	18,82	18,03	18,82	21,42
400	19,09	18,12	17,90	20,87	18,95	19,86	20,23	19,86	19,46
500	18,73	18,16	16,85	17,19	15,99	15,02	14,32	15,02	16,22



Obr. 9: Závislost odezvy jednotlivých analytů na přídavku ethanolu.

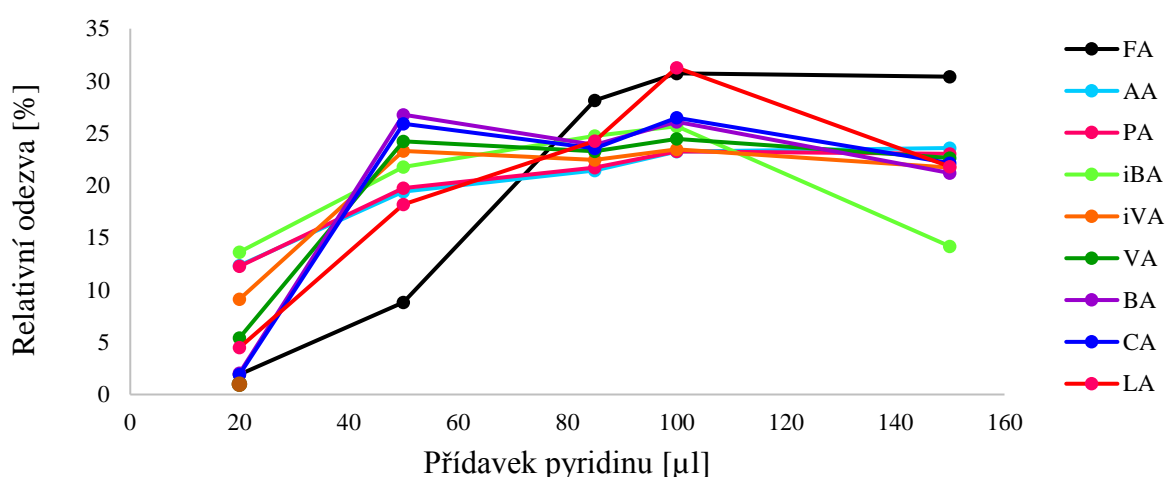
Testováním bylo prokázáno, že v testovaném rozmezí nemělo množství ethanolu v reakci významný vliv na odezvu. Ethanol byl již na dolní hranici zkoumaného rozsahu v dostatečném přebytku. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto ponechat výchozí podmínky (300  $\mu$ l EtOH).

#### 4.1.6 Optimalizace přídavku pyridinu do reakce

Pyridin v reakci představuje roli katalyzátoru, jeho množství by tedy mělo přímo ovlivnit výtěžek reakce. Vliv množství pyridinu v reakční směsi byl testován v rozsahu od 20 do 150  $\mu$ l. Porovnávána byla relativní odezva detektoru pro jednotlivé přídavky k sumě odezev detektoru všech přídavků vždy pro každý analyt zvlášť. Každá koncentrační úroveň byla analyzována v pěti opakováních.

Tab. IX: Závislost odezvy jednotlivých analytů na přídavku pyridinu.

Přídavek pyridinu do reakce [ $\mu$ l]	Relativní odezva [%]								
	FA	AA	PA	iBA	iVA	VA	BA	CA	LA
20	1,92	12,35	12,26	13,64	9,12	5,43	2,06	1,92	4,49
50	8,82	19,41	19,75	21,77	23,29	24,22	26,77	25,92	18,19
85	28,13	21,42	21,71	24,76	22,43	23,26	23,87	23,54	24,25
100	30,73	23,58	23,26	25,67	23,46	24,45	26,10	26,47	31,27
150	30,40	23,23	23,02	14,17	21,70	22,64	21,20	22,15	21,80



Obr. 10: Závislost odezvy jednotlivých analytů na přídavku pyridinu.

Bylo prokázáno, že přidavek 100  $\mu\text{l}$  pyridinu v reakci představuje optimální množství pro všechny zkoumané analyty s výjimkou kyseliny máselné, kde však byl rozdíl v odezvě mezi 50 a 100  $\mu\text{l}$  zanedbatelný. Pro další testování bylo tedy zvoleno množství 100  $\mu\text{l}$ .

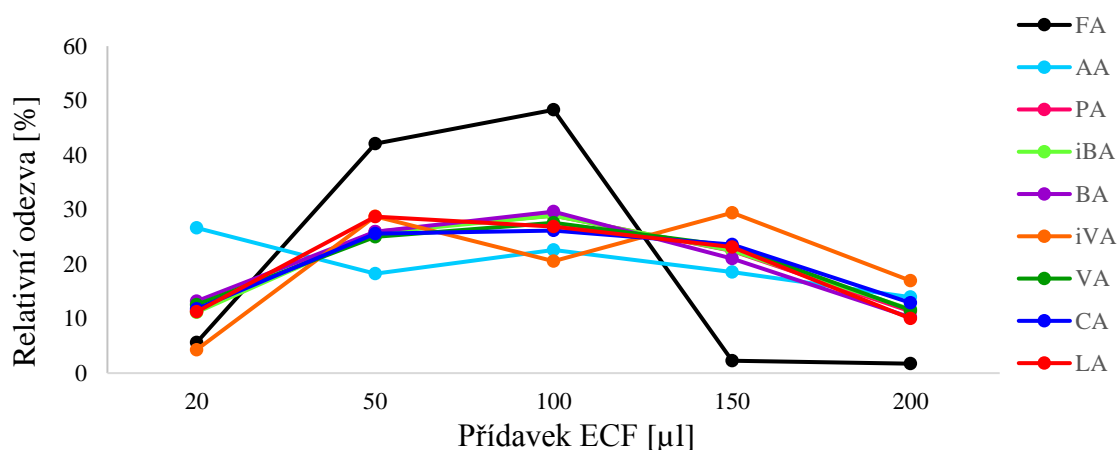
#### 4.1.7 Optimalizace přidavku ethylchloroformiátu do reakce

Jako další parametr k optimalizaci byl zvolen přidavek ECF do reakce. Ethylchloroformiát funguje jako esterifikační činidlo, optimalizace jeho množství je tedy nezbytným předpokladem pro řádný průběh reakce.

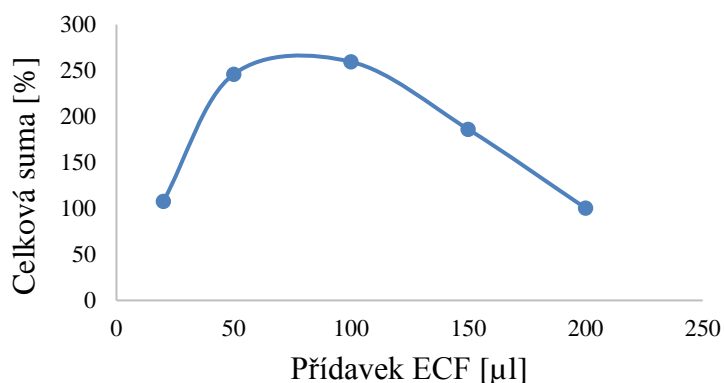
Množství přidavku bylo testováno v rozsahu od 20 do 200  $\mu\text{l}$ . Porovnávána byla relativní odezva detektoru pro jednotlivé přidavky k sumě odezev detektoru všech přidavků vždy pro každý analyt zvlášť. Každá koncentrační úroveň byla analyzována ve třech opakováních.

Tab. X: Závislost odezvy jednotlivých analytů na přidavku ECF.

Přidavek ECF [ $\mu\text{l}$ ]	Relativní odezva [%]									
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA	Celková suma
20	5,63	26,64	11,39	11,14	13,21	4,29	12,54	11,77	11,26	107,87
50	42,07	18,24	25,95	25,73	25,94	28,78	25,00	25,59	28,71	246,01
100	48,31	22,62	28,91	28,88	29,63	20,55	27,58	26,16	26,91	259,55
150	2,26	18,56	22,42	22,49	20,99	29,43	23,31	23,57	23,10	186,13
200	1,73	13,94	11,32	11,76	10,24	16,95	11,57	12,92	10,02	100,44



Obr. 11: Závislost odezvy jednotlivých analytů na přidavku ECF.



Obr. 12: Závislost celkové sumy odezvy všech analytů na přídavku ECF.

Jako optimální množství ethylchloroformiátu v reakci bylo zvoleno 100 μl. Tato proměnná měla vliv zejména na odezvu v případě kyseliny mravenčí (respektive u ethyl formiátu), kde došlo k významnému poklesu odezvy při vyšším přídavku.

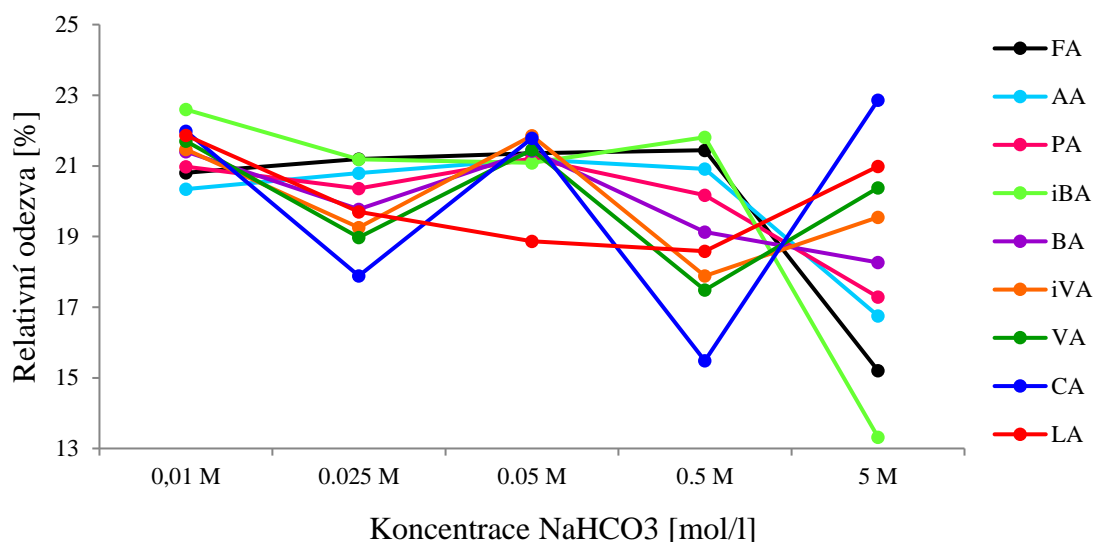
#### 4.1.8 Optimalizace koncentrace NaHCO<sub>3</sub>

Po provedení derivatizační reakce byl do reakční směsi přidán roztok NaHCO<sub>3</sub> z důvodu eliminace případného přebytku ECF v reakci. V rámci optimalizace byly testovány koncentrační úrovně od 0,01 do 5,0 mol/l. Porovnávána byla relativní odezva detektoru pro jednotlivé koncentrace k sumě odezev detektoru všech koncentrací vždy pro každý analyt zvlášť. Každá koncentrační úroveň byla analyzována v pěti opakováních.

Tab. XI: Závislost odezvy jednotlivých analytů na koncentraci NaHCO<sub>3</sub>.

Koncentrace NaHCO <sub>3</sub> [mol/l]	Relativní odezva [%]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
0,01	20,80	20,35	20,98	22,60	21,41	21,46	21,70	21,99	21,86
0,025	21,19	20,80	20,36	21,18	19,78	19,26	18,98	17,89	19,70
0,05	21,35	21,19	21,21	21,09	21,42	21,85	21,46	21,78	18,87
0,5	21,44	20,92	20,17	21,81	19,13	17,88	17,48	15,48	18,59
5,0	15,20	16,75	17,28	13,32	18,27	19,54	20,38	22,86	20,98





Obr. 13: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na koncentraci NaHCO<sub>3</sub>.

Bylo zjištěno, že změnou koncentrace NaHCO<sub>3</sub> nedochází k významnému zvýšení (respektive snížení) výtěžku. V případě přechodu z koncentrace 0,5 mol/l na 5 mol/l však u některých analytů došlo k poklesu odezvy (zejména FA, AA, PA, iBA). Rozhodnutí tedy bylo ponechat koncentraci při výchozích podmínkách, tedy 0,05 mol/l.

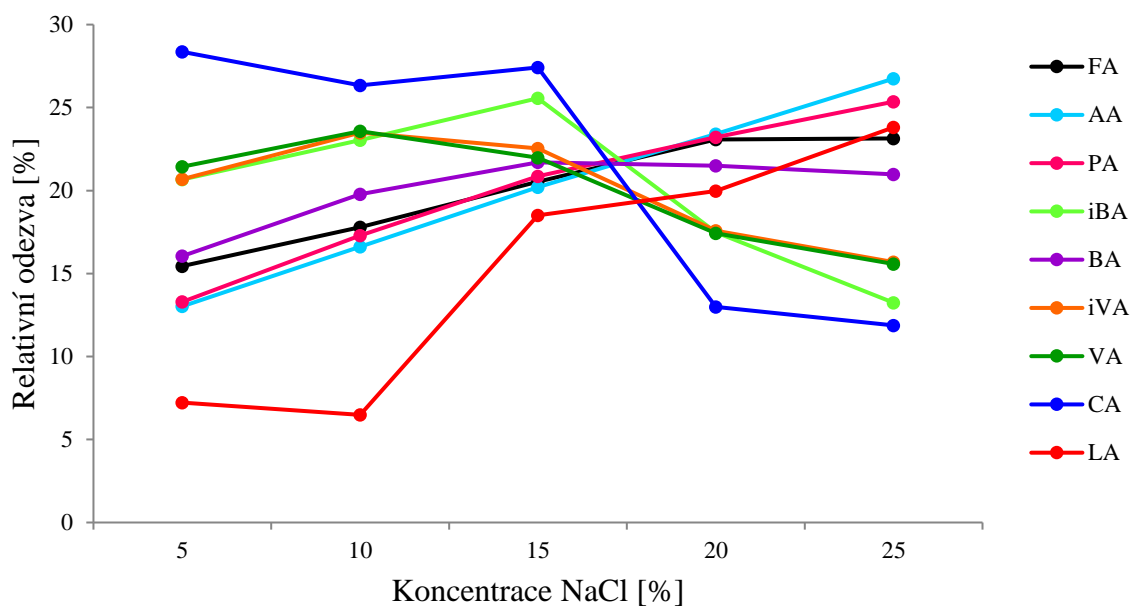
#### 4.1.9 Optimalizace koncentrace NaCl

Po provedení reakce byl v poslední řadě do směsi přidán roztok NaCl, jehož koncentrace byla testována v rozsahu 5 – 25 % hmot. (nasycený roztok). Se zvyšující se koncentrací NaCl byl očekáván snazší přechod jednotlivých analytů do plynné fáze z důvodu snížení jejich rozpustnosti v kapalně fázi.

Porovnávána byla relativní odezva detektoru pro jednotlivé koncentrace k sumě odezev detektoru všech koncentrací vždy pro každý analyt zvlášť. Každá koncentrační úroveň byla analyzována v pěti opakováních.

Tab. XII: Závislost odezvy jednotlivých analytů na koncentraci NaCl.

Koncentrace NaCl [%]	Relativní odezva [%]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
5	15,45	13,03	13,29	20,68	16,05	20,69	21,44	28,36	7,22
10	17,80	16,61	17,29	23,04	19,77	23,49	23,58	26,34	6,49
15	20,53	20,21	20,85	25,56	21,70	22,55	21,98	27,42	18,51
20	23,08	23,41	23,21	17,48	21,50	17,58	17,43	13,00	19,97
25	23,14	26,74	25,36	13,24	20,97	15,69	15,58	11,88	23,81



Obr. 14: Graf závislosti odezvy jednotlivých analytů na koncentraci NaCl.

U některých analytů byl zaznamenán v odezvě mírně stoupající trend, například u FA, AA, PA. U dalších však došlo naopak k poklesu odezvy (VA, CA, LA). Jako nejvýhodnější byla zvolena koncentrace 15 %, která představovala optimum pro zbytek analytů.

## 4.2 Optimalizace podmínek teploty

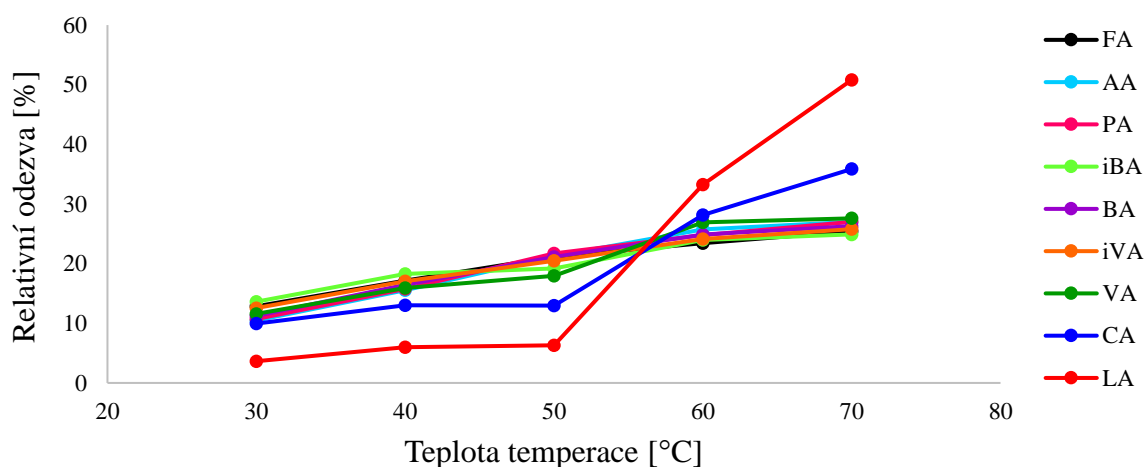
Před odběrem plynu k analýze byla vialka umístěna do temperovaného bloku autosampleru, kde dochází k ohřátí vzorku na požadovanou teplotu. Je nutné, aby došlo k řádnému ustavení rovnováhy mezi kapalnou a plynnou fází ve vialce, protože část objemu plynné fáze je odebírána k analýze. Předmětem optimalizace byla teplota a doba teploty vialky před nástřikem.

### 4.2.1 Teplota teploty

Teplota teploty byla testována v rozsahu 30 – 70 °C. Předpokladem byl snadnější přechod esterů TMK do plynné fáze se zvyšující se teplotou. Byla porovnávána relativní odezva jednotlivých analytů vzhledem k celkové sumě ploch píků. Každá teplotní úroveň byla analyzována ve třech opakováních.

Tab. XIII: Závislost odezvy jednotlivých analytů na teplotě temperace.

Teplota temperace [°C]	Relativní odezva [%]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
30	12,85	10,47	10,71	13,62	11,24	12,55	11,59	9,95	3,64
40	17,13	15,54	15,76	18,27	16,45	17,04	15,94	13,02	5,98
50	21,15	21,24	21,72	19,22	21,14	20,46	17,94	12,99	6,33
60	23,44	25,75	24,80	23,98	24,88	24,15	26,93	28,17	33,24
70	25,43	27,00	27,01	24,91	26,29	25,79	27,60	35,87	50,80



Obr. 15: Závislost odezvy jednotlivých analytů na teplotě temperace.

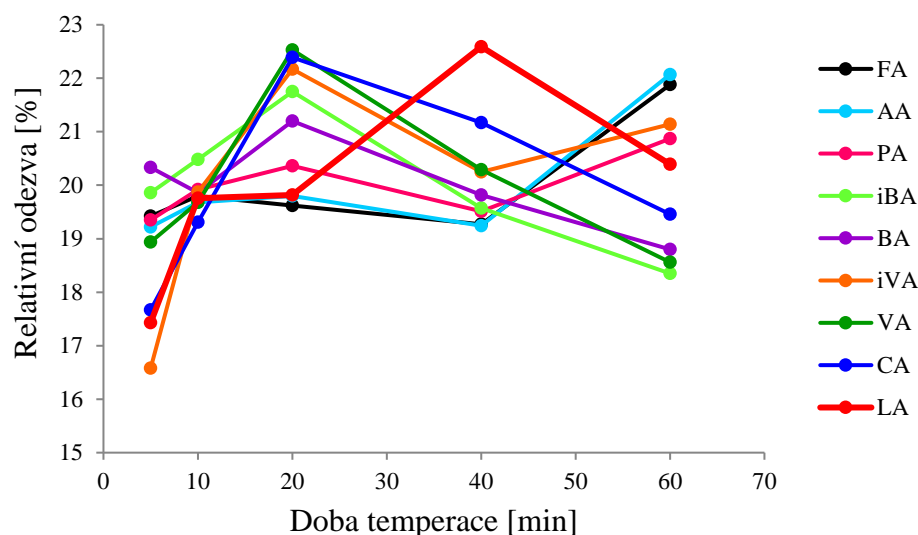
Se zvýšenou teplotou temperace došlo, podle předpokladu, k výraznému zlepšení odezvy u všech zkoumaných látek. U analytů s nižší teplotou varu, respektive s vyšší tenzí par docházelo k pozvolnějšímú nárůstu. Naopak u výše vroucích analytů - LA, CA došlo k významnému nárůstu až při vyšších teplotách. Vyšší teplota nebyla zvolena především vzhledem k obtížnému udržení stabilní teploty po vyjmutí vialky z termobloku těsně před nástřikem, což je kritický předpoklad pro zajištění přijatelné opakovatelnosti měření. Byla tedy zvolena teplota 70 °C.

#### 4.2.2 Doba temperace před nástřikem

Doba temperace byla testována v rozsahu od 5 do 60 minut. Cílem bylo zjištění doby, kdy je již rovnováha ustanovena pro odběr plynu k analýze. Porovnávána byla relativní odezva jednotlivých analytů vzhledem k celkové sumě ploch píků.

Tab. XIV: Závislost odezvy jednotlivých analytů na době temperace.

Doba temperace [min]	Relativní odezva [%]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
5	19,42	19,22	19,35	19,86	20,33	16,58	18,94	17,67	17,43
10	19,80	19,68	19,92	20,48	19,86	19,87	19,68	19,31	19,76
20	19,62	19,80	20,36	21,75	21,20	22,17	22,53	22,39	19,82
40	19,27	19,24	19,51	19,57	19,82	20,25	20,29	21,17	22,59
60	21,88	22,07	20,87	18,35	18,80	21,14	18,56	19,46	20,39



Obr. 16: Závislost odezvy jednotlivých analytů na době temperace.

Bylo zjištěno, že odezva u většiny analytů vykazuje stoupající tendenci do dvaceti minut od zahájení temperace vialky. Se zvyšující se dobou sice došlo ke zlepšení odezvy u některých analytů, zvýšila se však odchylka mezi jednotlivými analýzami. Například u kyseliny mléčné překročila RSD mezi jednotlivými analýzami při delší době temperace 15 %. Bylo proto rozhodnuto ukončit temperaci již po 20 minutách.

## 4.3 Validace metody

Po provedení optimalizace podmínek derivatizace, extrakčního postupu a metody nástřiku byla provedena validace analytické metody, kterou bylo prokázáno, že je možné ji použít ke kvantitativní analýze. Mezi hodnocené validační parametry patří linearita, přesnost, správnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti.

### 4.3.1 Linearita

Linearita byla hodnocena na koncentračních úrovních od 0,5 do 400 µg/ml. Jelikož nebyla u všech analytů splněna kritéria přijatelnosti v celém rozsahu, bylo nutné tento rozsah omezit tak, aby těchto kritérií přijatelnosti bylo dosaženo. Tabulka č. XIII shrnuje základní validační charakteristiky týkající se linearity, rovnice kalibrační přímky je ve tvaru  $y=k \cdot x+q$ , kde  $k$  je směrnice přímky,  $q$  úsek na ose  $y$ ,  $y$  představuje poměr plochy píku standardu ku ploše píku vnitřního standardu a  $x$  je koncentrace standardu v µg/ml. Pro hodnocení linearity byl zvolen korelační koeficient a QC koeficient. Korelační koeficient musí být vyšší nebo roven 0,9900 ( $R \geq 0,9900$ ) a hodnota QC koeficientu nižší nebo rovna 5% ( $QC \leq 5,00 \%$ ).

Tab. XV: Přehled parametrů kalibračních přímek jednotlivých analytů.

Parametr	Hodnota parametru pro daný analyt								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
Koncentrace [µg/ml]	47,6	2,0	0,5	1,9	1,0	0,5	0,5	1,0	4,8
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	380,8	394,2	400,0	191,2	97,0	94,4	97,8	193,6	385,2
Směrnice [ml/ µg]	0,0070	0,0695	0,1131	0,0185	0,0532	0,1012	0,0682	0,0296	0,0182
Úsek na ose y [1]	0,0067	0,2586	0,4683	0,0686	0,0655	0,1583	0,1274	0,0159	0,2278
Korelační koeficient [1]	0,9996	0,9997	0,9986	0,9968	0,9968	0,9961	0,9931	0,9994	0,9986
QC koeficient [%]	2,24	1,90	3,85	3,98	4,12	4,03	4,57	3,86	4,32

### 4.3.2 Správnost a přesnost

V Tab. XVI jsou uvedeny hodnoty přesnosti vyjádřené jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky vypočtené pro dané koncentrační úrovně. Každá koncentrační úroveň byla připravena ve třech opakováních.

Tabulka XVI: Přesnost výsledků v kalibrační řadě.

Koncentrační úroveň [µg/ml]	Kriterium přijatelnosti: RSD [%]	Přesnost [%]								
		FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
400	≤ 5,3	3,9	4,8	3,0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	5,1
200		2,7	4,0	1,9	2,3	N/A	N/A	N/A	3,5	4,4
100		3,1	2,4	3,7	4,4	3,5	4,2	3,9	2,4	3,8
50	≤ 7,3	3,8	1,9	2,3	3,2	5,2	5,6	3,2	2,8	6,0
20		0,8	0,6	0,4	1,4	2,5	2,8	2,4	1,7	4,9
10		4,1	1,8	2,7	6,9	6,1	2,5	1,7	1,9	4,3
5	≤ 11	6,6	8,4	9,6	8,0	5,9	9,1	4,2	9,5	8,3
2		N/A	4,2	5,3	6,8	8,7	9,4	7,9	8,6	N/A
1		N/A	N/A	0,6	N/A	8,9	10,4	10,3	4,0	N/A
0,5	≤ 15	N/A	N/A	7,0	N/A	N/A	7,7	10,7	N/A	N/A

V Tab. XVII jsou uvedeny hodnoty správnosti vyjádřené jako výtěžnost pro dané koncentrační úrovně. Ta byla získána porovnáním experimentálně zjištěné koncentrace s teoretickou koncentrací kalibračních standardů připravenými přímo z odpovídajících ethylesterů, jejichž koncentrace představovala výtěžnost 100 %. U LA nebylo možné zjistit výtěžnost z důvodu nedostupnosti standardu derivatizované kyseliny mléčné, u které jsou reakcí modifikovány obě funkční skupiny. Každá koncentrační úroveň byla připravena ve třech opakováních.

Tabulka XVII: Správnost výsledků v kalibrační řadě.

Koncentrační úroveň [µg/ml]	Kriterium přijatelnosti: Výtěžnost [%]	Správnost [%]							
		FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA
400	90-107	98,8	99,2	98,0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
200		99,3	98,9	99,2	98,5	N/A	N/A	N/A	97,5
100		98,4	99,7	99,4	97,9	98,9	99,4	99,0	98,5
50	80-110	97,6	96,9	97,3	97,8	98,6	98,5	98,7	98,1
20		99,1	99,5	99,8	98,1	99,2	99,1	98,9	99,3
10		98,5	98,9	99,0	98,2	99,5	99,5	99,5	98,8
5		98,8	99,4	99,5	98,9	98,7	98,9	99,4	98,5
2		N/A	97,7	98,4	97,3	97,6	98,5	98,3	98,4
1		N/A	N/A	99,3	N/A	98,0	98,2	99,1	98,6
0,5		N/A	N/A	96,3	N/A	N/A	97,9	98,2	N/A

Ve všech případech byla splněna kritéria přijatelnosti, která byla přejatá z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements (36). Tím bylo prokázáno, že tato metoda poskytuje výsledky s přijatelnou přesností a správností.

#### 4.3.3 Rozsah

Metodu je možné použít ke stanovení analytů v koncentračních rozsazích uvedených v Tab. XVIII. Rozsah pro každý analyt byl zvolen tak, aby v uvedeném rozmezí bylo dosaženo požadovaných kritérií přijatelnosti pro validační parametry linearita, přesnost a správnost.

Tab. XVIII: Koncentrační rozsahy pro stanovení vybraných TMK.

Rozsah	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
Min.	47,6	2,0	0,5	1,9	1,0	0,5	0,5	1,0	4,8
Max.	380,8	394,2	400,0	191,2	97,0	94,4	97,8	193,6	385,2

#### 4.3.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce metody byla vyhodnocena jako koncentrace, pro kterou výška píků jednotlivých analytů byla trojnásobná oproti výšce šumu základní linie. Mez stanovitelnosti byla vyhodnocena jako koncentrace, pro kterou výška píku odpovídajícího analytu byla desetinásobná oproti výšce šumu základní linie. Byly využity hodnoty S/N z vyhodnocovacího programu Xcalibur. V Tab. XIX jsou uvedené limity detekce a kvantifikace, označené jako LOD a LOQ.

Tabulka XIX: LOD a LOQ získané z kalibračních roztoků.

Parametr	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
LOD	15,3	0,7	0,1	0,6	0,3	0,2	0,2	0,3	1,6
LOQ	47,6	2,0	0,5	1,9	1,0	0,5	0,5	1,0	4,8

## 4.4 Porovnání s alternativními metodami

Pro porovnání metody bylo vybráno několik dalších prací, kde byly uvedené jiné metody stanovení TMK. V těchto pracích byly použity následující techniky: SPME extrakce v kombinaci s GC-FID; SPME v kombinaci s GC-MS. Jednotlivé validační parametry jsou shrnuty v následující tabulce. Uvedené práce byly zaměřeny pouze na analyty uvedené v Tab. XX, nezahrnují tedy FA, iBA, LA.

Tabulka XX: Validační parametry souvisejících prací.

Parametr	AA	PA	BA	VA	iVA	CA	Ref.
Lineární rozsah [µg/ml]	1,5-40,0	0,07-45	0,01-35	0,055-6,0	0,015-6,0	0,015-5,5	(37)
	1,1-45,4	0,06-46,5	0,005-36	0,07-10,7	N/A	0,010-9,7	(38)
Korelační koeficient (R <sup>2</sup> )	0,9826	0,9908	0,9937	0,9973	0,9974	0,9997	(37)
	0,9867	0,9876	0,9894	0,9920	0,9896	0,9910	(39)
	0,9960	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	(40)
LOD [µg/ml]	0,467	0,062	0,019	0,012	0,003	0,003	(37)
	0,760	0,280	0,122	0,003	N/A	0,0005	(41)
	0,675	0,054	0,006	0,046	N/A	0,019	(38)
LOQ [µg/ml]	1,245	0,165	0,051	0,032	0,008	0,008	(37)
	6,340	0,224	0,055	0,153	N/A	0,064	(38)
Přesnost [%]	9,8	4,9	6,2	6,6	6,5	8,9	(37)
	5,0	4,0	3,1	2,9	N/A	3,0	(41)
	11,2	5,6	11,5	8,2	N/A	10,4	(38)
	3,3	2,4	5,0	12,7	9,8	N/A	(39)
	15,6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	(40)
Správnost [%]	100-115	96-112	104-117	97-108	94-102	85-89	(37)
	79-114	77-111	86-122	86-120	86-120	N/A	(42)
	82-98	93-102	82,108	96-107	77-93	86-100	(39)

V práci (37) bylo využito techniky GC-FID a extrakční metody HS-SPME pro analýzu vzorků z kořenových čistíren odpadních vod. Byla stanovována kyselina mravenčí, octová, propionová, máselná, valerová, isovalerová a hexanová. V porovnání s metodou vyvinutou v rámci této práce nebylo u kyseliny octové a propionové dosaženo významně nižší meze stanovitelnosti ani detekce, u kyseliny máselné a valerové byly však získány téměř desetkrát nižší limity a u kyseliny isovalerové a kapronové dokonce o dva řády lepší výsledky. Lineární rozsah metody nebyl u kyseliny octové a propionové na spodní mezi významně nižší, u ostatních analytů však bylo v práci (37) dosaženo desetkrát až stokrát



nižších limitů. V mé metodě bylo však možné na horním limitu zahrnout vyšší koncentrace a co se týče hodnocení přesnosti, byly s porovnávanou prací prokázány celkově více opakovatelné výsledky.

V porovnání s prací (38) lze u kyseliny octové a propionové hodnotit rozsah metody, LOD a LOQ obdobně jako v předchozím případě. Bylo zde využito stejné techniky a extrakční metody jako v publikaci (37). Metoda byla zamýšlena pro analýzu vzorků odpadní vody. U kyseliny máselné bylo dosaženo významně nízké meze stanovitelnosti, nejnižší ze všech porovnávaných prací, u kyseliny valerové a kapronové byly získány pětkrát, respektive desetkrát nižší limity než v metodě vyvinuté v rámci této práce, kde byly však opět v rámci hodnocení přesnosti dosaženy celkově lepší výsledky.

V porovnání s uvedenými pracemi, kde bylo využito techniky SPME v kombinaci s GC-FID nebylo dosaženo lepších detekčních ani kvantifikačních limitů navzdory vyšší přesnosti a správnosti stanovení. Do pracovního rozsahu však bylo v případě této práce možné zahrnout i vyšší koncentrace.

## 4.5 Testování metody na vzorku digestátu

### 4.5.1 Testování na obohaceném vzorku

Pro ověření metody z hlediska správnosti a přesnosti stanovení obsahu analytů v reálné matici byl analyzován vzorek digestátu z bioplynové stanice obohacený přídavkem roztoku analytů na koncentrační úroveň 100 µg/ml. Správnost byla hodnocena jako výtěžnost a přesnost byla vyjádřena jako opakovatelnost. Analýza byla provedena v pěti opakováních. Výsledky jsou uvedeny v Tab. XXI.

Tabulka XXI: Výtěžnost jednotlivých analytů u obohaceného vzorku.

Analyt	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
<b>Správnost [%]</b>	40,5	97,6	43,9	15,3	23,9	29,4	27,4	22,0	20,8
<b>Přesnost [%]</b>	19,6	9,3	14,4	21,5	14,6	15,6	14,2	15,6	15,2

Nízké hodnoty správnosti a vysoké hodnoty přesnosti byly patrně způsobeny komplikovanou maticí vzorku, jejímž vlivem mohlo dojít k sorpci přidaných analytů na pevné částice přítomné ve vzorku.

#### 4.5.2 Analýza reálného vzorku

Analyzován byl vzorek digestátu z bioplynové stanice. K analýze bylo odebráno 450 µl vzorku, který byl zpracován optimalizovaným postupem v pěti opakováních. Byla detekována stopová množství kyseliny mravenčí, propionové, valerové a kapronové. S přijatelnou přesností a správností bylo ve vzorku možné stanovit pouze kyselinu octovou, jejíž koncentrace činila  $260 \pm 20$  µg/ml.

Tabulka XXII: Analýza vzorku digestátu z bioplynové stanice.

<b>Analyt</b>	<b>FA</b>	<b>AA</b>	<b>PA</b>	<b>iBA</b>	<b>BA</b>	<b>iVA</b>	<b>VA</b>	<b>CA</b>	<b>LA</b>
<b>Koncentrace [µg/ml]</b>	<LOQ	260	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD
<b>RSD [%]</b>	12,2	7,4	6,4	N/A	N/A	N/A	17,5	16,3	N/A

## 5 ZÁVĚR

V rámci teoretické části byly shrnuty teoretické poznatky týkající se obecných vlastností těkavých mastných kyselin a technologie týkající se bioplynových stanic, zejména ve vztahu k TMK. Dále pak byly probrány různé techniky možnosti jejich stanovení se zaměřením na kapilární izotachofórezu a plynovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií.

Praktická část byla zaměřena především na volbu vhodných podmínek derivatizační reakce a podmínek teploty. Bylo zjištěno, že optimálních podmínek derivatizace je dosaženo při alkalizaci vzorku 50  $\mu\text{l}$  5M roztoku NaOH s přidavkem 300  $\mu\text{l}$  ethanolu, 85  $\mu\text{l}$  pyridinu a 100  $\mu\text{l}$  ECF. Po provedení reakce byl zvolen přidavek 800  $\mu\text{l}$  0,05M NaHCO<sub>3</sub> s následným vysolením 8 ml 15% roztoku NaCl. Teplota teploty byla zvolena na 70 °C po dobu 20 minut.

Byla provedena základní validace metody, která prokázala možnost stanovení ve vodných vzorcích v rozsahu 0,5 – 400  $\mu\text{g/ml}$  u kyseliny propionové, u dalších analytů bylo nutné tento rozsah omezit. Meze detekce byly určeny v rozsahu 0,2 – 5,3  $\mu\text{g/ml}$ .

Obohacením vzorku digestátu z bioplynové stanice simulovaném na koncentrační úroveň 100  $\mu\text{g/ml}$  bylo zjištěno, že odezva neodpovídá vypracované metodě pro vodné vzorky s přijatelnou správností s výjimkou kyseliny octové. To bylo patrně způsobeno komplikovaným charakterem matrice vzorku, tedy vlivem jednoho nebo více matričních vlivů (například sorpce analytů na pevné částice), v níž byly analyty stanovovány.

Vyhodnocením reálného vzorku bylo možné stanovit pouze obsah kyseliny octové (260  $\pm$  20  $\mu\text{g/ml}$ ), dále byla detekována stopová množství kyseliny mravenčí, propionové, valerové a kapronové.

## 6 REFERENCE

1. **Rechkemmer, G., Rönnau, K. a Engelhardt, W. V.** Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1988, Sv. 90, 4, stránky 563-568. doi:10.1016/0300-9629(88)90668-8.
2. **Lie, E. a Welander, T.** A method of determination of the readily fermentable organic fraction in municipal wastewater. *Water Research*. 1997, Sv. 31, 6, stránky 1269–1274. doi:10.1016/s0043-1354(96)00092-9.
3. **Siedlecka, E. M., a další.** Determination of Volatile Fatty Acids in Environmental Aqueous Samples. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2008, Sv. 17, 3, stránky 351-356.
4. **Randall, A. A., a další.** The effect of volatile fatty acids on enhanced biological phosphorus removal and population structure in anaerobic/aerobic sequencing batch reactors. *Water Science and Technology*. 1997, Sv. 35, 1, stránky 3-160. doi:10.1016/s0273-1223(96)00891-8.
5. **Yang, M. H. a Choong, Y. M.** A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain volatile organic acids in food. *Food Chemistry*. 2001, Sv. 75, 1, stránky 101–108. doi:10.1016/s0308-8146(01)00211-4.
6. **Reutemann, W. a Kieczka, H.** Formic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, stránky 1-22. doi:10.1002/14356007.a12\_013.
7. **Balabin, R. M.** Polar (Acyclic) Isomer of Formic Acid Dimer: Gas-Phase Raman Spectroscopy Study and Thermodynamic Parameters. *The Journal of Physical Chemistry*. 2009, Sv. 113, 17, stránky 4910–4918. doi:10.1021/jp9002643.
8. **Griggs, J. P a Jacob, J. P.** Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry Production. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2005, Sv. 14, 4, stránky 750–756. doi:10.1093/japr/14.4.750.
9. **McMurry, J.** *Organic Chemistry (5 ed.)*. 5. vydání. Pacific Grove : Brooks Cole, 2000. ISBN: 0-534-37366-6.
10. **Zieborak, K. a Olszewski, K.** Acetic Acid. *Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences-Serie des Sciences Chimiques Geologiques et Geographiques*. 1958, Sv. 6, 2, stránky 3315–3322.
11. **Sim, J. H., a další.** Clostridium aceticum—A potential organism in catalyzing carbon monoxide to acetic acid: Application of response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, Sv. 40, 5, stránky 1234–1243. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.09.017.
12. **Bertleff, W., Roeper, M. a Sava, X.** Carbonylation. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2007, Sv. 7, stránky 74–98. doi:10.1002/14356007.a05\_217.pub2.

13. **Ahlert, S., a další.** Analysis of propionate-degrading consortia from agricultural biogas plants. *MicrobiologyOpen*. 2016, Sv. 5, 6, stránky 1027–1037. doi:10.1002/mbo3.386.
14. **Den Besten, G., a další.** The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2013, Sv. 54, 9, stránky 2325–2340. doi: 10.1194/jlr.R036012.
15. **Endres, Hans-Josef.** *Technische Biopolymere*. München : Hanser-Verlag, 2009. ISBN: 978-3-446-41683-3.
16. **Inchem.** Inchem.org. *ICSC 1334 – BUTYRIC ACID*. [Online] [Citace: 15. 8 2018.] Dostupné z: <http://www.inchem.org/>.
17. **Merck.** *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 11. 1989. ISBN: 091191028X.
18. **Trávníček, P.** *Technologie zpracování biomasy za účelem energetického využití*. 1. vydání. Brno : Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN: 9788075092069.
19. **Mayberry, W. R., Précházka, G. J. a Payne, W. J.** Growth yields of bacteria on selected organic compounds. *Journal of Applied Microbiology*. 1967, Sv. 15, 6, stránky 1332-1338.
20. **CZBA.** Česká bioplynová asociace. [Online] [Citace: 3. 9 2018.] dostupné z: <http://www.czba.cz/>.
21. **Bauchop, T. a Elsdén, S. R.** The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *Journal of General Microbiology*. 1960, Sv. 23, 3, stránky 457–469. doi:10.1099/00221287-23-3-457.
22. **Nagai, S.** Mass and energy balances for microbial growth kinetics. *Advances in Biochemistry and Biotechnology*. 1979, Sv. 11, 1, stránky 49–83. doi:10.1007/3-540-08990-x\_22.
23. **Minkevič, I. G. a Jerošin, V. K.** Productivity and heat generation of fermentation under oxygen limitation. *Folia Microbiologica*. 1973, Sv. 18, 5, stránky 376–385.
24. **Sobotka, M.** The mass-energy balance of anaerobic methane production. *Folia Microbiologica*. 1983, Sv. 28, 3, stránky 195–204. doi:10.1007/bf02884083.
25. **Dohányos, M.** *teoretické základy anaerobní fermentace*. [Online] 2008. <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/>.
26. **Cui, F., Seungho, Lee a Moonil, Kim.** Removal of organics and nutrients from food wastewater using combined thermophilic two-phase anaerobic digestion and shortcut biological nitrogen removal. *Water Research*. 2011, Sv. 45, 16, stránky 5279–5286. doi:10.1016/j.watres.2011.07.
27. **Mata-Alvarez, J.** *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. London : IWA Publishing, 2015. doi:10.2166/9781780402994. ISBN: 1 900222 14 0.

28. **Klouda, P.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda - Pavko, 2003. 80-86369-07-2.
29. **Štulík, K.** *Analytické separační metody*. Praha : Univerzita Karlova v Praze, 2005. ISBN: 80-246-0852-9.
30. **Churáček, J.** *Analyza organických látek: Sborník přednášek. Český Těšín : 2-THETA, 1999. ISBN: 80-902432-9-0.*
31. **Filípek, J. a Dvořák, R.** Determination of the Volatile Fatty Acid Content in the Rumen Liquid: Comparison of Gas Chromatography and Capillary Isotachopheresis. *Acta Veterinaria Brno*. 2009, Sv. 78, 4, stránky 627–633. doi:10.2754/avb200978040627.
32. **Hušek, Petr.** Chloroformates in gas chromatography as general purpose. *Journal of Chromatography*. 1998, Sv. 717, 1-2, stránky 57–91. doi:10.1016/s0378-4347(98)00136-4.
33. **Vas, G. a Vékey, K.** Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004, Sv. 39, 3, stránky 233–254. doi:10.1002/jms.606.
34. **Poustka, J.** Head space method. [Online] <https://web.vscht.cz/~poustkaj/>.
35. **Villas-Bôas, Silas Granato, a další.** Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2003, Sv. 322, 1, stránky 134–138. doi: 10.1016/j.ab.2003.07.018.
36. **Communities, Association of Analytical.** Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Appendix F, p. 9*. [Online] 2012. [Citace: 20. 9 2018.] Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for Standard Method. dostupné z: [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf).
37. **Feng, L., Huang, Y. a Wang, H.** Solid-Phase Microextraction in Combination with GC–FID for quantification of the volatile free fatty acids in wastewater from constructed wetlands. *Journal of Chromatographic Science*. 2008, Sv. 46, 7, stránky 577–584. doi: 10.1093/chromsci/46.7.577.
38. **Abalos, M., Bayona, J.M. a Pawliszyn, J.** Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters. *Journal of Chromatography A*. 2000, Sv. 873, 1, stránky 107–115. doi:10.1016/s0021-9673(99).
39. **Mills, G. A., Walker, V. a Mughal, H.** Headspace solid–phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane in-fibre derivatisation for analysis of faecal short-chain fatty acids. *Journal of Chromatography B*. 1999, Sv. 730, 1, stránky 113–122. doi:10.1016/s0378-4347(99)00211-x.
40. **Wittmann, G., Langenhove, H. Van a Dewulf, J.** Determination of acetic acid in aqueous samples, by water-phase derivatisation, solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000. doi:10.1016/S0021-9673(00)00114-X.

41. **Pan, L., Adams, M. a Pawliszyn, J.** Determination of fatty acids using solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. 1995, Sv. 67, 23, stránky 4396–4403. doi:10.1021/ac00119a031.
42. **Yo, S. P.** Analysis of volatile fatty acids in wastewater collected from a pig farm by a solid phase microextraction method. *Chemosphere*. 1999, Sv. 38, 4, stránky 823–834. doi:10.1016/s0045-6535(98)00223-9.
43. **Churáček, J.** *Analytická separace látek*. 1. vydání. Praha : Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN: 80-03-60569-8.
44. **Siegert, I. a Banks, C.** The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochemistry*. 2005, Sv. 40, 11, stránky 3412–3418. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.025.
45. **Smart, K. F., a další.** analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Nature Protocols*. 2010, Sv. 5, 10, stránky 1709-1729. doi:10.1038/nprot.2010.108.
46. **Smolková, E. a Feltl, L.** *Analýza látek v plynném stavu*. Praha : SNTL, 1991. ISBN: 80-03-00604-X.
47. **Association of Official Analytical Chemists.** Guidelines for Standard Method Performance Requirements - Appendix F. *Appendix F, p. 9*. [Online] [Citace: 3. 10 2018.] [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf).
48. **Tangerman, A. a Nagengast, F. M.** A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. *Analytical Biochemistry*. 1996, Sv. 236, 1, stránky 1–8. Tangerman, A., & Nagengast, F. M. (1996). A Gas Chromatographic Analysis of Fecal Short-Chain Fatty Acids, Using the Direct Injection Method. , (1), . doi:10.1006/abio.1996.0123.

## 7 PŘÍLOHY

Tab. XXIII: Výchozí data k optimalizaci koncentrace NaOH ve vzorku.

C <sub>NaOH</sub> [mol/l]	Plocha píku [counts·min]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
<b>0,25</b>	6312950	55906727	13667307	116647631	152644299	41349571	131189852	306428669	219683107
	6302366	56624263	14620277	124771735	167330804	41041051	131610062	300434869	210114452
	5780010	51654325	13734873	116502897	154992299	38072718	114313617	267280869	187480964
	6024198	53449500	14096267	119122819	158187369	40322944	129740951	304817766	217761972
	6511307	57619279	15377385	128695080	167770152	40278755	131822687	306421112	217008449
<b>Průměr</b>	6186166	55050819	14299222	121148032	160184985	40213008	127735434	297076657	210409789

<b>0,50</b>	6361489	57857683	16227630	126775336	166438891	49401026	133535962	318021413	233535731
	6357165	57203870	15860118	123761359	166136870	52794311	145983088	347895975	257908260
	5885932	53238169	14647860	114941208	149704566	48467111	130521097	312406672	223464141
	6106341	55531673	15704708	122998534	164991269	47975763	134354392	317867523	228436691
	6298669	56824389	16229980	125271718	169047673	49536230	133840658	318031340	232555517
<b>Průměr</b>	6201919	56131157	15734059	122749631	163263854	49634888	135647040	322844585	235180068

<b>1,00</b>	6489014	59887225	16825453	125483736	164961910	35831949	125510302	279583799	195066213
	6224442	57980439	15690285	120798374	158263242	34405205	120008608	276402535	197960193
	6110979	57351034	15763669	122431330	157257094	34080463	120393554	273034714	190541351
	6197417	57718804	15695278	122935784	159905586	33078191	124214732	287898590	199957648
	6346510	58759056	16071435	125088286	158660531	33600987	117491797	264306535	185961041
<b>Průměr</b>	6273672	58339311	16009224	123347502	159809673	34199359	121523799	276245235	193897289

<b>2,00</b>	3142383	55641014	9519060	72303377	86746775	4605461	59256993	120273558	81685576
	3003895	54541925	9609255	73512058	94396775	3570519	70781102	153400684	108976180
	2963171	55666024	9743607	74157950	94487591	3054056	67580378	141983451	99979595
	2889527	56170583	9776366	74082886	93332880	3088825	67340222	143689062	104495026
	2880149	57559073	9986864	76119253	93588487	3069033	67537223	142045951	104058771
<b>Průměr</b>	2975825	55915724	9727031	74035105	92510502	3477579	66499184	140278541	99839029

<b>5,00</b>	2199668	71936998	465229	4238459	14066403	4077129	30161600	135732250	56760113
	2102727	68089259	395416	3425117	11722075	4049459	24797729	113309991	44466172
	2074220	68250467	312200	3064170	10733198	4299258	23147498	104473940	35878593
	2022669	69827683	277959	2783422	9834912	3870103	21607985	100361096	35287036
	2016104	70465035	263747	2675984	9417906	4614438	20428174	95504223	32474382
<b>Průměr</b>	2083078	69713888	342910	3237430	11154899	4182077	24028597	109876300	40973259



Tab. XXIV: Výchozí data k optimalizaci přidavku ethanolu do reakční směsi.

Přidavek EtOH [μl]	Plocha píku [counts·min]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
<b>100</b>	7622996	150793797	209385987	36062238	167276614	404724470	313240723	199354809	1263345
	7550568	151704236	217642804	35708134	173128456	421750466	332326585	199450146	1228429
	7452072	149111174	211576433	37727947	167405059	411094933	319854146	191793136	1189434
	7247640	144089417	198853422	33887525	154315786	369820847	286578664	166990408	1507810
	7900906	157411665	225265837	33004707	169219775	401855808	312855490	180443404	1498477
<b>Průměr</b>	7554837	150622058	212544897	35278110	166269138	401849305	312971122	187606381	1337499

<b>200</b>	7720659	150543502	208435532	45086675	166337166	402135165	306145370	165959972	1206340
	8638646	171649305	239458721	49804720	178115833	412055518	298613822	152742001	810747
	8075655	161601183	226811342	47923293	173593333	415288677	310243483	172993150	1827253
	8188072	159850908	224899501	47291855	175449723	421747748	313203352	175591044	1991359
	8692484	172830640	225179159	46726009	159317212	358554778	261822409	131998839	1207975
<b>Průměr</b>	8263103	163295108	224956851	47366510	170562654	401956377	298005687	159857001	1408735

<b>300</b>	9607328	189527467	231468968	40440118	151889161	328222675	222944100	104774006	1129303
	9610640	183936339	230923077	40825752	158672960	355779033	256299620	132243987	1264826
	9340158	180681473	225963488	38498567	155018501	334876296	236005116	118996901	1285305
	9059075	174593334	217170935	37353162	148021395	312786734	224255677	111549153	1463637
	9159748	178765337	220063311	35675320	144041990	301683893	221588834	109720218	1710291
<b>Průměr</b>	9355390	181500790	225117956	38558584	151528802	326669726	232218670	115456853	1370673

<b>400</b>	7891288	144741845	187048422	41640671	144615210	345485478	255561975	137588125	672282
	7943053	147539617	191076380	42752216	148575073	358554431	271010902	165863472	770174
	7511639	137481147	182368103	40815133	144318235	348139411	264949075	156595566	1205091
	7617981	137398111	179682475	40259313	144369922	351604399	263422687	160103521	1923091
	7687885	137334773	168357301	38694426	129496403	319586997	247934203	148115527	1657782
<b>Průměr</b>	7730369	140899099	181706536	40832352	142274969	344674143	260575768	153653242	1245684

<b>500</b>	7600294	144691384	177280635	34233072	126172372	273360511	194299414	89415608	743162
	7450962	135321962	150034052	32452466	98780033	208797059	140805827	59428714	405504
	7530565	138447056	172228371	34173077	122465079	271325486	192975282	91361230	1099327
	7621505	144232113	180080042	34328509	129451797	286194901	205441621	95774978	1423327
	7715757	143454435	175693509	33017381	123256180	263712528	188770008	88990116	1518067
<b>Průměr</b>	7583816	141229390	171063322	33640901	120025092	260678097	184458430	84994129	1037877

Tab. XXV: Výchozí data k optimalizaci přídavku pyridinu do reakční směsi.

Přídavek pyridinu [μl]	Plocha píku [counts·min]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
<b>20</b>	1168906	35285493	9594900	65501331	79474509	16999117	60963189	19610224	1705022
	362076	37568391	9297485	66005300	79361311	17953820	68734819	21572973	1943699
	197448	36424186	8341909	59944793	73445090	17622946	78205995	32275647	3419151
	194497	40059554	8749546	62982617	79176908	20094485	104509929	47242528	5211168
	174134	35786207	7241581	52732718	66339643	17492515	95136089	43184472	4964430
<b>Průměr</b>	419412	37024766	8645084	61433352	75559492	18032577	81510004	32777169	3448694

<b>50</b>	3018712	49135323	13107002	86604430	108699381	25638122	167461363	112893524	21783617
	2310498	51794569	13645873	90383997	110296595	25236787	151404593	97477967	18609842
	1781079	55112377	14482936	96499888	123581197	29429396	229289850	170589075	33447801
	1453440	60727450	15888599	105838907	135698726	32393031	254557697	184973474	36162380
	1085285	60408662	15997701	103507087	130118589	31285607	237707532	164935545	31696046
<b>Průměr</b>	1929803	55435676	14624422	96566862	121678898	28796589	208084207	146173917	28339937

<b>85</b>	5919196	58841822	15348024	100438953	125285491	29672033	175034829	115193668	25239270
	6017984	59690775	16323185	105983027	133094108	32987459	203637408	142246790	31340707
	6008770	59398945	16267149	104026365	131263810	32790870	198609190	138887177	30185609
	6416897	62791175	17077658	109434139	136187837	32126756	186534747	129181775	28367968
	6396141	63197153	17166404	112954571	143036809	36116967	238256316	176452998	39431130
<b>Průměr</b>	6151797	60783974	16436484	106567411	133773611	32738817	200414498	140392482	30912937

<b>100</b>	5970337	61405044	15420720	101073941	127872809	32327855	186358924	123930796	28179202
	6773355	69354591	17562934	114215313	142992641	35812212	206892598	139437162	31196858
	7163911	73146656	18631417	121277163	149746849	36976640	218446304	162971260	38137355
	6521386	66531294	17393647	115036401	144036596	32531642	215205723	153153166	35157876
	7169502	72710759	18821144	126309688	152015615	32073177	220881898	158446501	37135648
<b>Průměr</b>	6719698	68629669	17565972	115582501	143332902	33944305	209557089	147587777	33961388

<b>150</b>	6531028	65816242	16694322	113254628	135601201	23137306	165352548	106004020	21014804
	6552702	66070551	16934515	114718380	139676194	19550298	179178844	118348239	23222037
	6370334	64241113	16519481	112833873	135050881	15059529	194398807	140517981	28286417
	6487201	65003689	17247763	118094855	148824143	12437899	233996997	171504586	34504535
	7303701	73829697	18664209	127665733	150176282	23485010	196298896	146822178	29884652
<b>Průměr</b>	6648993	66992258	17212058	117313494	141865740	18734009	193845219	136639401	27382489

Tab. XXVI: Výchozí data k optimalizaci přídatku ethylchloroformiátu do reakční směsi.

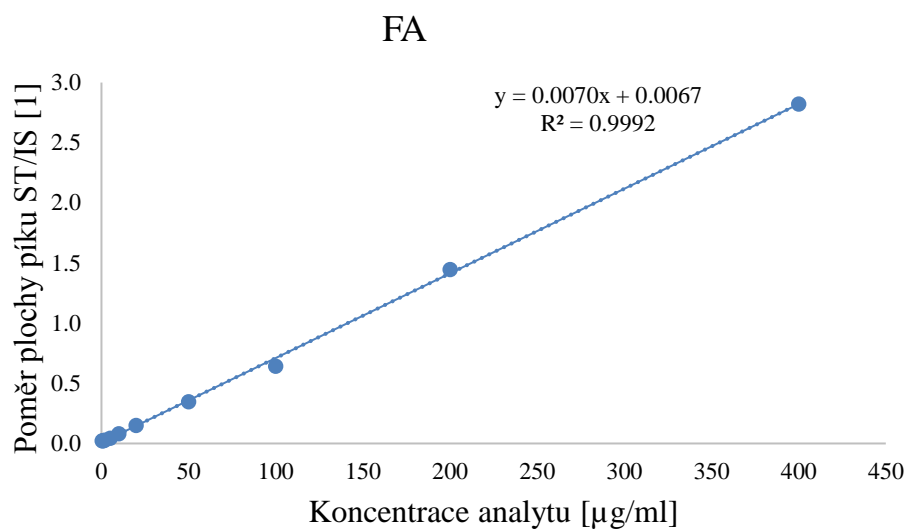
Přídavek ECF [μl]	Plocha píku [counts·min]								
	FA	AA	PA	iBA	BA	iVA	VA	CA	LA
<b>20</b>	1275083	38008190	55020124	8397066	42906919	90441194	50182814	21693038	81795
	749708	35943541	53795347	4866702	47887224	103773412	63467992	36953588	110000
	601498	35674024	51582021	6177766	46684977	98725108	56100425	29175644	106970
<b>Průměr</b>	875430	36541918	53465831	6480511	45826374	97646571	56583744	29274090	99588

<b>50</b>	7061113	87897684	115075736	30379495	96831117	212957291	131263541	90805397	497518
	7602039	95544760	119879686	32067412	99690839	214385742	132155353	92163150	519213
	7879129	100647557	124772044	30675345	105997863	223724238	142366603	112926561	424602
<b>Průměr</b>	7514094	94696667	119909155	31040751	100839940	217022424	135261833	98631703	480444

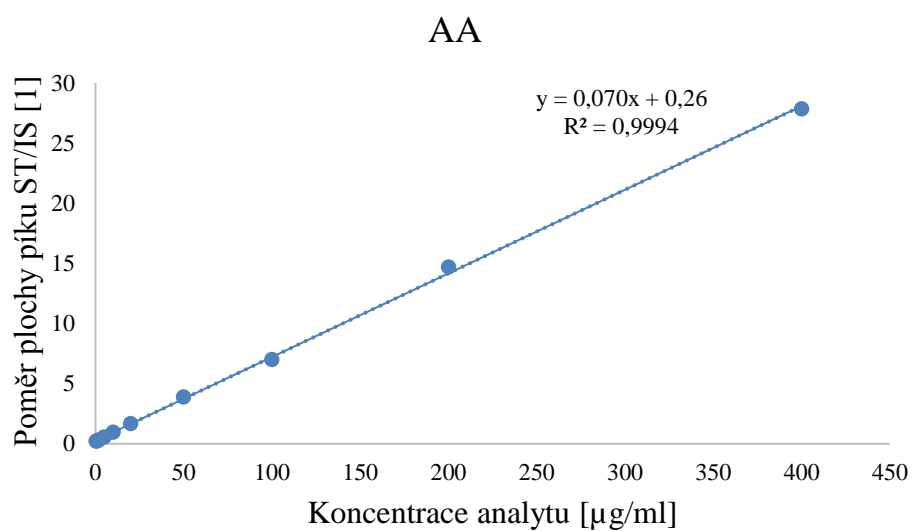
<b>100</b>	6605839	85277610	105886802	45449573	90834174	209704250	139106746	112161479	1451878
	6329042	80527278	100355231	41542953	88089481	203752189	137508832	108573275	1388501
	6698847	87273604	108681342	43413870	95247229	223413397	156389647	115396470	1473919
<b>Průměr</b>	6544576	84359497	104974458	43468799	91390295	212289945	144335075	112043742	1438099

<b>150</b>	357753	74664531	83065693	42048971	79452482	187470238	117144132	77820049	924564
	363384	76611052	89038747	46572933	90276873	204353786	118641408	73478601	1399502
	334426	69942634	82767004	44730687	85884905	194908109	112594908	68172856	1709264
<b>Průměr</b>	351854	73739405	84957148	44450864	85204753	195577378	116126816	73157169	1344443

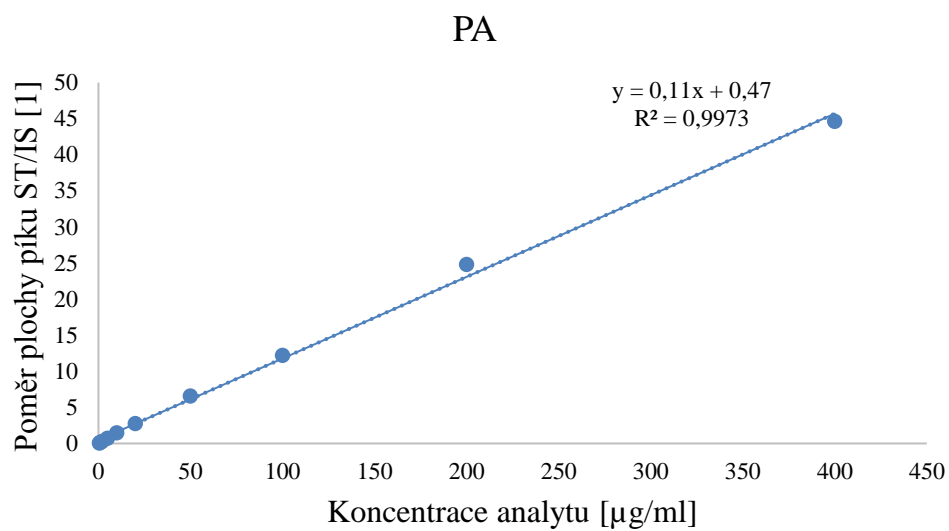
<b>200</b>	252465	41170076	43831060	25544566	40944502	97779122	45119372	21738729	189214
	262836	38743607	43550199	27807047	48601834	128391078	64317974	34951867	140981
	293225	35731659	36891645	23443456	37367075	95330221	41643788	21523031	59889
<b>Průměr</b>	269509	38548447	41424301	25598356	42304470	107166807	50360378	26071209	130028



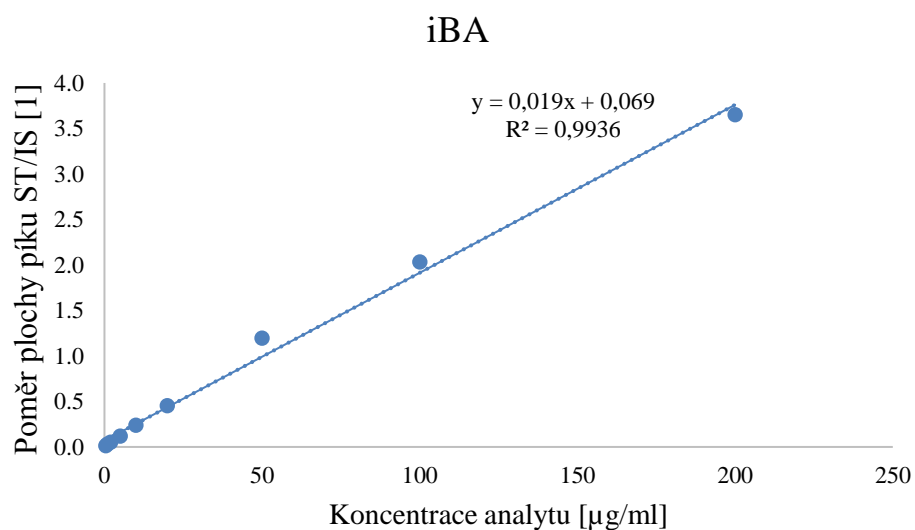
Obr. 17: Kalibrační křivka pro kyselinu mravenčí.



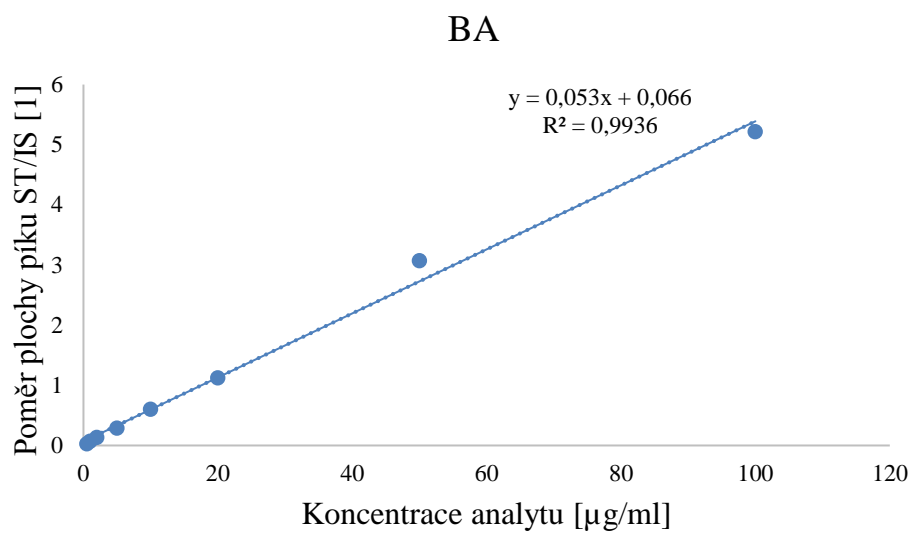
Obr. 18: Kalibrační křivka pro kyselinu octovou.



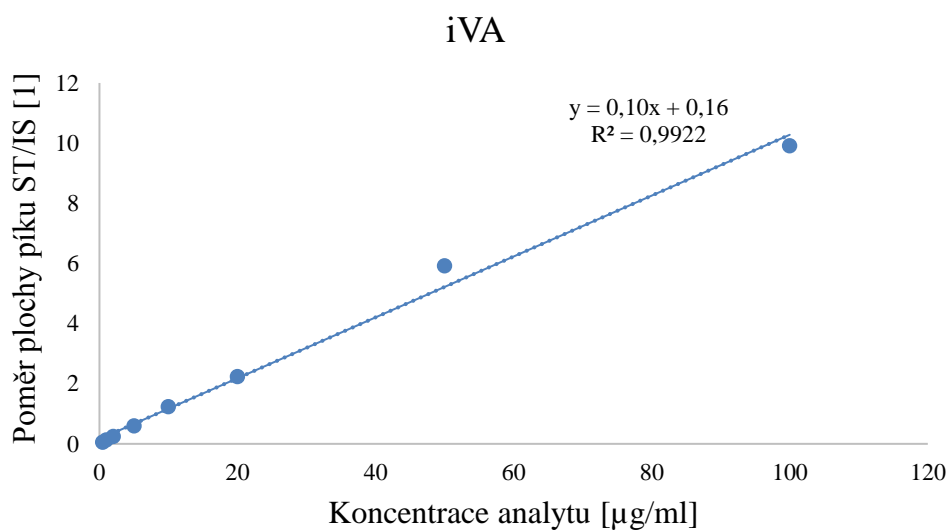
Obr. 19: Kalibrační křivka pro kyselinu propionovou.



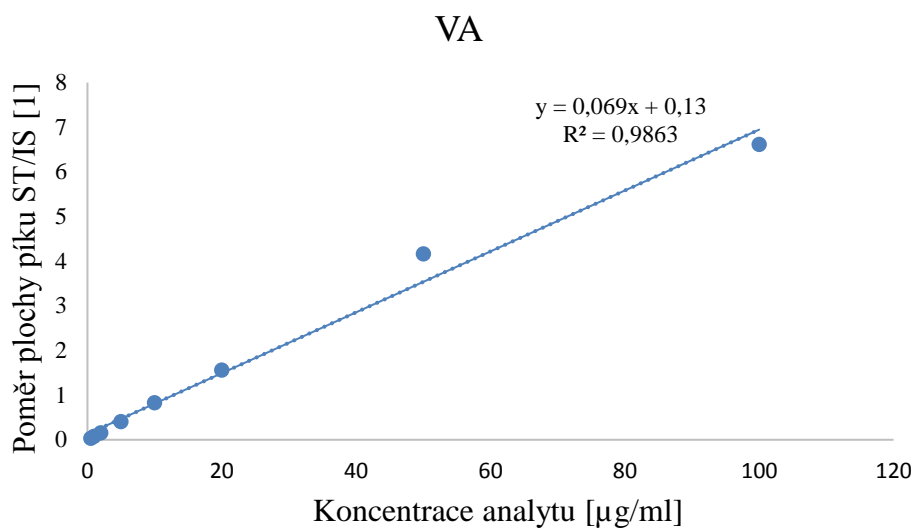
Obr. 20: Kalibrační křivka pro kyselinu isomáselnou.



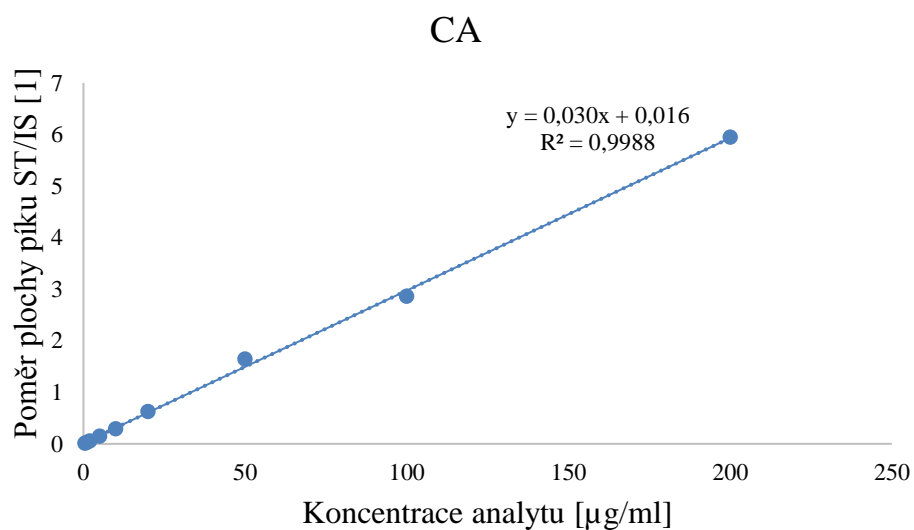
Obr. 21: Kalibrační křivka pro kyselinu máseľnou.



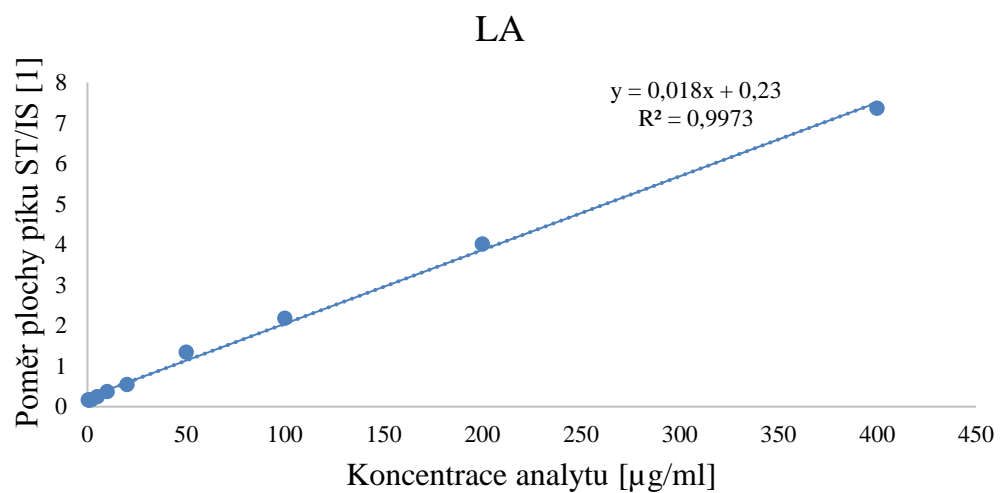
Obr. 22: Kalibrační křivka pro kyselinu isovalerovou.



Obr. 23: Kalibrační křivka pro kyselinu valerovou.



Obr. 24: Kalibrační křivka pro kyselinu kapronovou.



Obr. 25: Kalibrační křivka pro kyselinu mléčnou.