

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

DERIVATIZACE V PLYNOVÉ CHROMATOGRFII

Diplomová práce

Autor práce:	Petra Nováková
Studijní obor:	Analytická chemie
Studijní program:	Chemie N1407
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí diplomové práce:	Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2011

ABSTRAKT

Studie je zaměřena na netradiční derivatizační postupy v plynové chromatografii. Vybrané analyty (karbonylové sloučeniny, aminokyseliny, kyselina pyrohroznová a sotolon) byly derivatizovány ve víně a připravené deriváty byly separovány, identifikovány a kvantifikovány metodou GC-MS.

Karbonylové sloučeniny byly použitím činidla cysteaminu převedeny na thiazolidinové deriváty, přičemž bylo zjištěno, že pH reakční směsi významně ovlivňuje výtěžnost derivatizace. V případě kyseliny pyrohroznové bylo využito dvoukrokové derivatizace činidly o-fenyldiaminem a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidem (BSTFA). Metoda byla aplikována pro kvantifikaci některých karbonylových sloučenin a kyseliny pyrohroznové v červených vínech použitých při studiu přeměn anthokyaninových barviv. Pro derivatizaci sotolonu byla zvolena silylace pomocí BSTFA a postup byl aplikován na vzorky vína s vysokým obsahem zbytkového cukru. Zjištěný limit detekce a kvantifikace byl 3,985 µg/l a 5,905 µg/l. Jako alternativní metoda pro stanovení sotolonu byla zvolena derivatizace činidlem t-butyldimethylsilylchloridem. Za účelem sledování přirozeného zastoupení aminokyselin ve víně, byly aminokyseliny pomocí ethylchloroformiátu převedeny na příslušné N-ethoxykarbonylethylestery. Na závěr byla studie doplněna o vstupní experiment vztahující se k analýze akrylamidu v potravinách.

SUMMARY

This study is focused on unconventional derivatization processes in gas chromatography. Selected analytes (carbonyl compounds, amino acids, pyruvic acid and sotolon) were derivatized in wine and prepared derivatives were separated, identified and quantified by GC-MS.

Carbonyl compounds were converted using cysteamine agents to thiazolidine derivatives and strong influence of pH on derivatization recovery was found out. In the case of pyruvic acid two-steps derivatization using o-phenylenediamine and N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) agents was used. The method was applied for quantification of some carbonyl compounds and pyruvic acid in red wines used in the study of anthocyanine dyes transformation. Silylation with BSTFA was chosen for derivatization of sotolon and procedure was applied on wine samples with high-level of residual sugar. Limits of detection and quantification were estimated to 3,985 $\mu\text{g/l}$ and/or 5,905 $\mu\text{g/l}$ respectively. Derivatization using t-butyldimethylsilylchloride was chosen as an alternative method for sotolon determination. The amino acids were converted using ethylchloroformate on respective N-ethoxycarbonylethylesters for the purpose of monitoring of natural appearance of amino acids in wine. Finally, a pilot experiment related to analysis of acrylamide in foods was included in the study.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne:

.....

Vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Petru Bartákovi za trpělivost, mnoho podnětných rad a věcných připomínek, které mi poskytl během vypracování této práce a v neposlední řadě také za ochotu při řešení problémů. Také děkuji Bc. Romanu Papouškovi za spolupráci při realizaci experimentů vztahujících se ke stanovení akrylamidu v potravinách.

Děkuji své rodině a blízkým za jejich podporu a vytvoření ideálních podmínek ke studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Derivatizace z pohledu reakcí.....	10
2.1.1	Silylace	10
2.1.2	Alkylace / esterifikace	11
2.1.3	Acylace	13
2.1.4	Tvorba cyklických derivátů	14
2.1.5	Bromace.....	17
2.2	Derivatizace z pohledu činidel.....	19
2.3	Derivatizace z pohledu analytů	26
2.3.1	Karbonylové sloučeniny	26
2.3.2	Kyselina pyrohroznová.....	33
2.3.3	Sotolon.....	37
2.3.4	Aminokyseliny	39
2.3.5	Akrylamid.....	42
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
3.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	45
3.2	Chemikálie.....	45
3.2.1	Derivatizační činidla.....	45
3.2.2	Standardy	46
3.2.3	Rozpouštědla	46
3.2.4	Analyzované vzorky	46
3.2.5	Ostatní chemikálie	47
3.3	Pracovní postupy	47
3.3.1	Karbonylové sloučeniny	47
3.3.2	Kyselina pyrohroznová.....	48
3.3.3	Sotolon.....	49
3.3.4	Aminokyseliny	49

3.3.5	Akrylamid.....	50
3.4	Experimentální podmínky	50
3.4.1	Analýza derivátů.....	50
3.4.2	Analýza s využitím mikroextrakce na tuhé fázi	51
3.5	Vyhodnocení	51
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	53
4.1	Karbonylové sloučeniny	53
4.1.1	Stanovení teplot varu derivátů.....	54
4.1.2	Vliv pH prostředí na tvorbu derivátů.....	58
4.1.3	Stanovení výtěžnosti derivatizace a extrakce	60
4.1.4	Linearita.....	60
4.1.5	Stanovení karbonylových sloučenin ve víně	61
4.2	Kyselina pyrohroznová	69
4.3	Sotolon	74
4.3.1	Návratnost extrakce	76
4.3.2	Analýza sotolonu ve víně	77
4.4	Aminokyseliny	81
4.4.1	Analýza aminokyselin ve víně.....	81
4.5	Akrylamid	85
4.5.1	Analýza akrylamidu v brambůrkách.....	86
5	ZÁVĚR	88
6	LITERATURA	91
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	98
8	PŘÍLOHY	100
8.1	Hmotnostní spektra derivátů karbonylových sloučenin	100
8.2	Hmotnostní spektra derivátů aminokyselin	105

1 ÚVOD

Chemická derivatizace je proces přeměny chemické struktury separované látky provedená za účelem zlepšení chromatografických vlastností a pro analýzu plynovou chromatografií je tvorba derivátů mnohdy nezbytným krokem. Velmi mnoho organických látek totiž nelze převést do plynné fáze, anebo se při pokusu o zplynění rozkládají. Hlavním důvodem pro využití derivatizace v plynové chromatografií je tedy zvýšení těkavosti, popřípadě tepelné stability analyzovaných látek v důsledku snížení polarit. Vysoký bod varu totiž mají nejen sloučeniny s vyšší relativní molekulovou hmotností, ale také sloučeniny, nesoucí ve své molekule polární funkční skupiny. Některé z nich (např. COOH) mohou podléhat dimeračním, hydratačním a disociačním reakcím. Tyto jevy se projeví nesymetrickým píkem v chromatografickém záznamu, a tedy ztrátou účinnosti a snížením rozlišovací schopnosti. U aminosloučenin, které vykazují bazický charakter a mohou disociovat, dochází rovněž k chvostování píků, ale navíc volné báze mohou interagovat s volnými hydroxylovými skupinami nosiče, což způsobuje zvyšování hodnot elučních časů. Přítomnost dvou a více polárních funkčních skupin v molekule (např. aminokyseliny) způsobuje jejich vzájemné interakce, při nichž se vytváří násobné vodíkové vazby, které přisuzují těmto látkám netěkavost. [1, 2]

Při derivatizaci dochází k záměně aktivního vodíku polární skupiny nejčastěji za alkylovou, silylovou či acylovou skupinu. Blokováním protonu se zamezí tvorbě vodíkového můstku, což vede ke zvýšení těkavosti derivátů ve srovnání s původními nederivatizovanými látkami. Na druhé straně jsou případy, kdy je nadměrná těkavost analytu nežádoucí, a chemická derivatizace pak může být užita k tvorbě derivátů s nižší těkavostí za účelem minimalizovat ztráty během manipulace. Derivatizace je také využíváno k zamezení nežádoucích sorpcí. Polární skupina totiž může vytvářet silné interakce se stěnou kolony nebo se stacionární fází, které se projeví nelinearitou v kalibrační závislosti. Tvorba derivátů může být využita pro zlepšení rozlišení. [2-4]

Chemická derivatizace také vede ke zvýšení citlivosti, selektivity a snížení meze detekce. Do molekuly separované látky se zavádějí takové elementy, které vykazují selektivitu při určitém způsobu detekce. Jsou to např. halogeny při použití detektoru elektronového záchytu (ECD). Odezva detektoru závisí jak na druhu halogenu, tak na jeho počtu. Jelikož elektronová afinita halogenů roste v pořadí $I < Br < Cl < F$, jsou velmi často využívány polyfluorované deriváty. Polyhalogenové deriváty lze stanovit ve stopovém

množství také pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí při užití negativní chemické ionizace (GC/MS-NCI). Nitroskupiny či jiné dusíkaté funkční skupiny v molekule derivátu umožňují citlivou detekci dusíko-fosforovým detektorem (NPD), který je selektivní na dusíkaté a organofosforečné sloučeniny. Chemická derivatizace je významná v MS, jelikož napomáhá při strukturní analýze organických sloučenin. Např. EI^+ hmotnostní spektrum silanizovaného derivátu se vyznačuje charakteristickým píkem, který odpovídá ztrátě methylové skupiny z molekulárního iontu ($m/z = M-15$). [1,2,5]

Také chirální separace, detekce a kvantifikace enantiomerů GC/MS vyžaduje derivatizaci. Přímá metoda v GC zahrnuje separaci enantiomerů na chirální stacionární fázi, jakou jsou cyklodextriny. Nepřímá metoda spočívá v konverzi racemické směsi enantiomerů na diastereomery užitím vhodného derivatizačního činidla. Diastereomery mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti a mohou být proto separovány na standardní fázi. [6]

V reakční plynové chromatografii, je separační systém doplněn o další prvek, reaktor, v němž dochází k reakci a tím i k přeměně původních látek. Derivatizační techniky využívají specifické reakce před chromatografickým procesem (pre-column) v jeho průběhu (on-column), nebo po jeho ukončení před vstupem do detektoru (post-column).

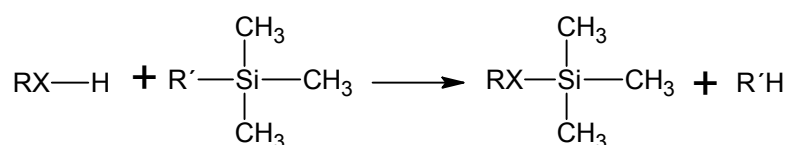
Vhodně zvolené činidlo a derivatizační postup by měli produkovat požadovanou chemickou modifikaci sloučeniny, která musí být reprodukovatelná a efektivní. Na reakční proces jsou kladeny požadavky, mezi které patří: jednoduchá příprava, rychlá konverze analytu, vysoké výtěžky produktů analytu, minimum vedlejších produktů a snadno odstranitelný nadbytek činidla. Obecně při výběru derivatizačního postupu platí pravidlo Occamovy břitvy: „Nejjednodušší varianta z mnoha nabízených řešení je obvykle ta správná“ (William z Occamu, 14 století). [7, 8]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Derivatizace z pohledu reakcí

2.1.1 Silylace

Silylace je častá derivatizační reakce využívaná v plynové chromatografii k přípravě vysoce těkavých a tepelně stabilních derivátů. Principem reakce je působení silylačního činidla na sloučeniny obsahující polární skupinu s aktivním vodíkem (OH, COOH, NH, SH). Nejčastější reakce jsou trimethylsilylační, kdy je aktivní vodík v polární skupině látky nahrazen trimethylsilylovou skupinou $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ tzv. TMS (Obr. 1).



R = alkyl, aryl apod.; R' = různé; X = O, COO, N, S

Obr. 1: Trimethylsilylační reakce

Schopnost různých funkčních skupin tvořit silylové deriváty je následující: alkoholy > fenoly > karboxylové kyseliny > aminy > amidy, přičemž reaktivita alkoholů klesá v pořadí: primární > sekundární > terciální, a u aminů: primární > sekundární.

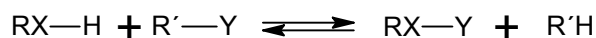
Silylační reakce se odehrávají v přítomnosti aprotického rozpouštědla, obvykle v pyridinu, dimethylformamidu (DMF), dimethylsulfoxidu (DMSO), tetrahydrofuranu (THF) a acetonitrilu (ACN). Pyridin je nejpoužívanější. Plní funkci rozpouštědla a katalyzátoru (HCl akceptor v reakcích zahrnující organochlorsilany). Aby byla derivatizace účinná, je třeba reakční směs zahřát. Pro specifické analyty a silylační činidla jsou doporučeny různé reakční teploty (25 - 170 °C) a doba zahřívání (minuty - desítky hodin). [9-12]

TMS deriváty se snadno připravují a vykazují výborné chromatografické vlastnosti. Existuje široká škála silylačních činidel lišící se reaktivitou, selektivitou a charakterem vedlejších reakcí. Nejpoužívanější činidla a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti shrnuje Tab. II. TMS činidla i deriváty jsou náchylné k vlhkosti a jejich hydrolyzou běžně vzniká hexamethyldisiloxan $[\text{CH}_3)_3\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_3]$. Pokud je v analyzovaném vzorku přítomna voda a nelze ji před analýzou odstranit, je nutné přidat mnohonásobné množství silylačního činidla, které působením vody zhydrolyzuje a tím ji odstraní. Další molekuly silylačního činidla pak mohou s analyzovanými látkami přítomnými ve vzorku zreagovat. K dosažení vyšší hydroly-

tické stability derivátů se do látky místo TMS skupiny zavádí skupina t-butyl-dimethylsilylová (TBDMS). Rovněž tepelná stabilita TBDMS derivátů je lepší než u TMS derivátů. Příprava TBDMS derivátů nachází uplatnění v oblasti analýzy sloučenin s relativně vysokou molekulovou hmotností (např. dlouhé řetězce nasycených kyselin), které vyžadují vyšší teplotu v GC injektoru nebo v chromatografické koloně. K derivatizaci výšemolekulárních derivátů se také využívají dimethylsilylační činidla. Jistou nevýhodou silylderivátů je zanášení elektrod a celého prostoru plamenově fotometrického detektoru (FID). Proto je nezbytné věnovat větší péči údržbě (čištění) detektoru a průběžnému sledování jeho citlivosti, zvláště v souvislosti s kvantitativními analýzami. V tomto směru je velmi výhodné používat činidla, která ve své struktuře obsahují atom fluoru, jenž potlačuje depozice SiO₂ během FID detekce. Silylační činidla i deriváty mohou rovněž reagovat s aktivními vodíky obsaženými ve stacionární fázi kolony, což může vést k jejímu poškození. Mezi materiály, které nejsou pro tyto účely vhodné, patří polyethylenglykoly (např. CARBOWAX) a volné nasycené kyselá fáze (FFAP). Naopak jako stacionární fáze je velmi vhodné použít silikony, které jsou charakteristické inertním chováním, stabilitou a vynikajícími separačními vlastnostmi pro tyto typy derivátů. [4,9-12]

2.1.2 Alkylace / esterifikace

Alkylací se rozumí výměna aktivního vodíku za alifatickou nebo alifaticko-aromatickou skupinu (např. benzyl). Výměna může být uskutečněna u organických látek obsahující funkční skupinu OH, COOH, NH, SH a SO₃H (Obr. 2). Některé reakce mohou být provedeny ve vodném prostředí.



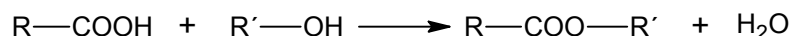
R = alkyl, aryl apod.; R' = různé; Y = alkyl; X = O, COO, S, SO₃, NH

Obr. 2: Alkylační reakce

Produkty alkylace jsou ve srovnání s původní látkou méně polární. Deriváty jsou také velmi stabilní a mohou být uchovávány po delší dobu. Alkylhalogeny, zejména alkylbromidy nebo alkyljodidy jsou častá alkylační činidla. Reakce obvykle vyžadují přítomnost katalyzátoru, (typicky Ag₂O, BaO, NaH atd.) a mnohdy i užití specifického rozpouštědla

(DMF, DMSO). Dalším známým činidlem je N, N-dimethylformamid dimethylacetal. [10, 13]

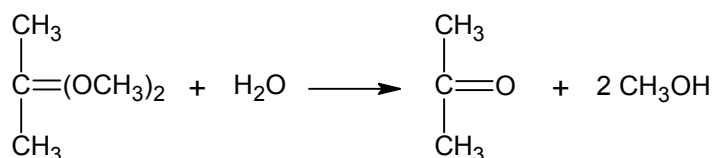
K přípravě alkylesterů karboxylových kyselin se využívá esterifikace. Esterifikace představuje kondenzační reakci karboxylové skupiny kyseliny s hydroxylovou skupinou alkoholu nebo fenolu za vzniku esteru a vody (Obr. 3).



R, R' = alkyl, aryl apod.

Obr. 3: Esterifikační reakce

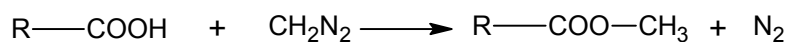
Nederivatizované kyseliny jsou reaktivní a vysoce polární sloučeniny, které v důsledku adsorpčních a nespecifických interakcí v koloně poskytují chvostující píky. Na druhé straně estery patří mezi látky s dobrými chromatografickými vlastnostmi. Jsou podstatně těkavější a méně polární než jim odpovídající kyseliny, a proto bývá esterifikace, především v plynové chromatografii, první volbou pro derivatizaci karboxylových kyselin. Aby měla esterifikace kvantitativní průběh, je třeba reakci kyselce katalyzovat. Mezi oblíbené katalyzátory patří chlorovodík nebo thionylchlorid, které mohou být posléze rychle odstraněny spolu s nadbytkem alkoholu. Kyselina sírová bývá také využívána jako katalyzátor, ale není již tak oblíbená, jelikož se vyznačuje řadou stinných stránek (dehydratace, obtížné odstranění apod.). Dobře řízená esterifikace rovněž vyžaduje odstranění vytvořené vody užitím chemických činidel nebo azeotropní destilací. Mezi materiály, které odstraňují vodu patří molekulová síta, bezvodý síran nebo látky, které s vodou reagují, např. 2,2-dimethoxypropan reaguje s vodou za vzniku acetonu a methanolu (Obr. 4). [10,14]



Obr. 4: Reakce 2,2-dimethoxypropanu s vodou

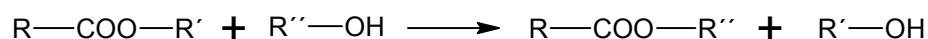
Z esterů mají největší význam methylestery, které se oproti vyšším esterům vyznačují řadou výhod: největší těkavostí ze všech esterů, velkou reakční rychlostí a vysokými výtěžky. Methylestery se připravují reakcí kyseliny s methanolem za katalytického působení Lewisovými kyselinami (BF₃ nebo BCl₃) nebo v přítomnosti koncentrované kyseliny

chlorovodíkové a kyseliny sírové. Nejčastěji se methylestery připravují reakcí karboxylové kyseliny s diazomethanem v etherickém roztoku (Obr. 5). Tento způsob přípravy methylesterů je nejvhodnější, protože se vyznačuje řadou výhod: příprava derivátu je rychlá a proces probíhá za mírných podmínek s vysokým výtěžkem, obvykle bez tvorby vedlejších produktů. Naopak nevýhody spočívají v jeho karcinogenních účincích a nestabilitě. Reakce diazomethanu s kyselinou probíhá za eliminace plynného dusíku.



Obr. 5: Reakce karboxylové kyseliny s diazomethanem

Nadbytek diazomethanu a rozpouštědla (diethyletheru) se odstraní odpařením. Diazomethan se připravuje rozkladem N-nitroso-N-methylmočoviny nebo N-methyl-N-nitroso-N-guanidinu. [4, 10] Vedle esterifikační reakce se v derivatizacích uplatňuje také reakce transesterifikační, při níž dochází působením alkoholu k přeměně příslušného esteru v ester jiný (Obr. 6).

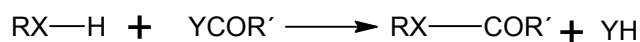


Obr. 6: Transesterifikační reakce

Nejpoužívanější alkylační a esterifikační činidla a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti shrnuje Tab. III.

2.1.3 Acylace

Při acylaci dochází k záměně aktivního vodíku polární skupiny za skupinu acylovou (Obr. 7). Acylace je alternativou k silylacím a uplatňuje se při přípravě derivátů alkoholů, fenolů, aminů, amidů a thiolů.



R = alkyl, aryl apod.; Y, R' = různé; X = O, NH, S

Obr. 7: Acylační reakce

Deriváty jsou charakteristické nižší polaritou, vysokou těkavostí a stabilitou. Ve srovnání se silylací, jsou acylace zaměřeny na vysoce polární, vícefunkční sloučeniny (např. sacharidy nebo aminokyseliny). Při přípravě derivátů se obvykle pracuje s několika-

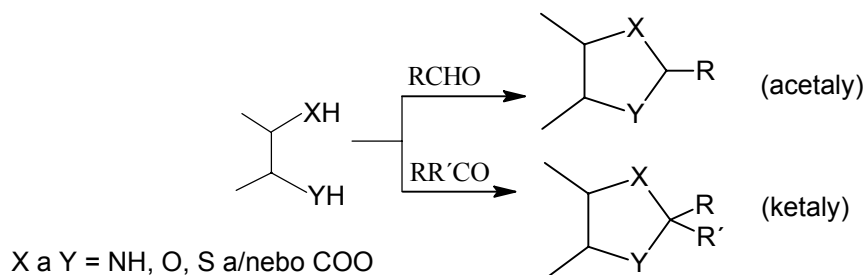
molárním nadbytkem acylačního činidla, acylhalogenidu či anhydridu, ve vhodném rozpouštědle, které je schopné vázat vznikající kyselinu a tím posouvat reakční rovnováhu ve směru tvorby produktu. Nejlépe se osvědčil pyridin a tetrahydrofuran. Další velkou skupinou činidel jsou acylimidazoly, které na rozdíl od acylhalogenidů a anhydridů netvoří kyselé vedlejší produkty. Nejpoužívanější acylační činidla a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v Tab. IV. Reakční doba (minuty – desítky hodin) závisí na použitém činidle, rozpouštědle, analytu a teplotě. Teplota se volí podle reaktivity činidla v rozmezí laboratorní teploty až po bod varu rozpouštědla. Oproti silylačním činidlům jsou acylační činidla hydrolyticky stabilnější. Velmi významné je zavádění halogenů do molekuly derivátu, které vykazují selektivitu při ECD detekci. Jelikož odezva EC-detektoru závisí nejen na druhu halogenu, ale i na jejich počtu, jsou často využívány polyfluorované deriváty. Acyl deriváty se řídí jistými fragmentačními zákonitostmi, a proto poskytují užitečné informace o struktuře těchto látek v aplikacích hmotnostní spektrometrie. [4,12]

2.1.4 Tvorba cyklických derivátů

Cyklické deriváty mohou tvořit sloučeniny obsahující dvě a více funkčních skupin OH, NH, nebo SH, které se v alkylovém řetězci nacházejí v pozicích 1,2-, 1,3-, 1,4-, nebo se vyskytují v ortho-poloze aromatického kruhu. Tyto sloučeniny reagují s vhodným činidlem za vzniku pěti, šesti nebo sedmi členných cyklů, které mají stabilní konfiguraci. Reakce, při kterých dochází ke spojení dvou molekul za eliminace vody, se nazývají kondenzační. Cyklické deriváty jsou charakteristické vyšší těkavostí a lepšími chromatografickými vlastnostmi. Vyšší stabilita cyklických derivátů s ohledem na fragmentace má za následek získání hmotnostních spekter s velkým množstvím iontů při vyšších hodnotách m/z. Reakce za vzniku cyklických derivátů jsou rychlé a obvykle probíhají za mírných podmínek s vysokými výtěžky. Nevýhodou je, že funkční skupiny, které nejsou zapojeny do cyklizace, mohou tvořit vedlejší produkty. [5, 14] Vybraná činidla používaná pro tvorbu cyklických derivátů a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti shrnuje Tab. V.

Acetaly a ketal

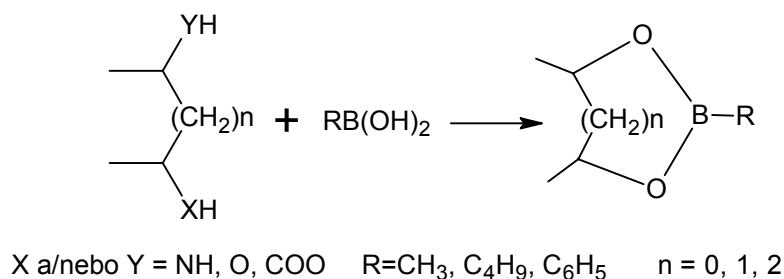
Cyklické acetaly a ketal jsou tvořeny reakcí příslušných aldehydů nebo ketonů s dioly, polyoly, sacharidy, aminoalkoholy, aminokyselinami, hydroxykyselinami atd. (Obr. 8). Reakce je obvykle uskutečněna za kyselé katalýzy a laboratorní teploty. [5]



Obr. 8: Tvorba acetalů a ketalů

Cyklické boronáty

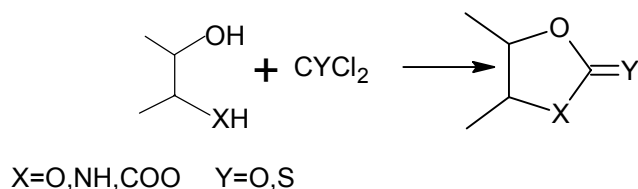
Cyklické boronáty jsou obvykle tvořeny ze sloučenin obsahujících funkční skupinu OH, NH a/nebo COOH skupinu za vzniku pěti, šesti nebo sedmi členného kruhu (Obr. 9). Šestičlenný kruh je nejstabilnější. Příprava boronátů je jednoduchá, rychlá (několik minut) a reakce je uskutečněna při laboratorní teplotě s použitím pyridinu jako rozpouštědla. Deriváty vykazují dobré chromatografické vlastnosti a jsou využívány v GC-MS analýze. Největší uplatnění v praxi nacházejí methyl-, butyl- a fenyloboronáty. [5, 10, 14]



Obr. 9: Tvorba cyklických boronátů

Cyklické karbonáty

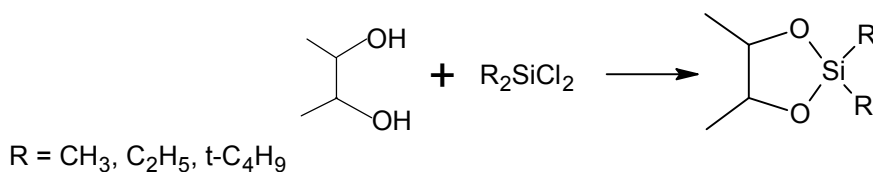
Cyklické karbonáty jsou tvořeny reakcí 1,2-diolů (polyolů), aminoalkoholů a hydroxykyselin s fosgenem (COCl₂) nebo thiofosgenem (CSCl₂), (Obr. 10). Roztok analytů v chloroformu nebo dichlormethanu je derivatizován roztokem činidla COCl₂ v toluenu nebo dioxanu (1-3 hod., 25 °C). [5]



Obr. 10: Tvorba cyklických karbonátů

Cyklické silikonidy

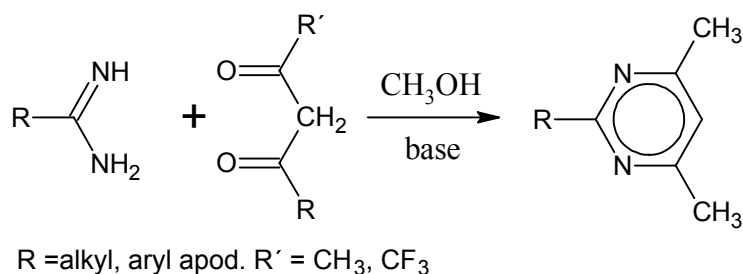
Cyklické silikonidy mohou být připraveny z diolů reakcí s dichlordimethylsilanem nebo diethyldichlorsilanem v pyridinu (40 °C, 2 hod), (Obr. 11). K získání dialkylsilikonidů může být využit také dimethyldiacetoxysilan v triethylaminu. Di-t-butyldisilikonidy jsou s oblibou využívány v GC-MS. Mohou být připraveny z diolů, hydroxykyselin a aminokyselin po jejich rozpuštění (acetonitril nebo N-methylmorfolin) a derivatizaci di-t-butyldimethylsilanem (80 °C, 15 hod.). [5]



Obr. 11: Tvorba cyklických silikonidů

Pyrimidiny

Pyrimidiny jsou tvořeny působením acetylacetonu nebo hexafluoracetylacetonu na guanidinovou skupinu (Obr. 12). Reakce probíhá v přítomnosti methanolu po dobu 1-2 hodin a obvykle vyžaduje zahřátí na teplotu 100 °C. Jako činidlo pro tvorbu pyrimidinů se používá také malonaldehyd. [9]



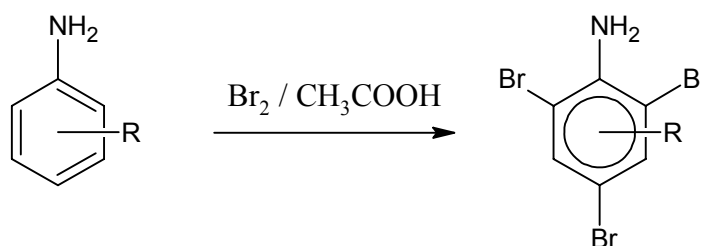
Obr. 12: Tvorba pyrimidinů

Mezi ostatní cyklické derivatizace může být zařazena tvorba chinoxalinů reakcí α -ketokyseliny nebo α -dikarboxylové sloučeniny s o-fenylendiaminem. Dále vznik thiazolidinových derivátů reakcí karboxylových sloučenin s cysteaminem. Neméně významná je také tvorba oxazolidinonů kondenzací aminokyselin s 1,3-dichlortetrafluoracetonem. Některé z těchto reakcí jsou dále popisovány v kapitole 2.3 „Derivatizace z pohledu analytů“.

2.1.5 Bromace

Méně běžnou derivatizační reakcí je bromace, která může mít charakter jak elektrofilní adice, tak elektrofilní substituce. Jelikož vytvořený derivát obsahuje ve své struktuře brom, je možné provést citlivou analýzu GC-ECD nebo GC-MS/NCI.

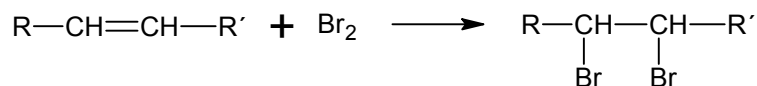
Bromace byla využita při derivatizaci aromatických aminů. Elektrofilní substituce v tomto případě probíhá ve třech pozicích, které jsou označovány jako pozice orto a para vzhledem k aminoskupině (Obr. 13).



Obr. 13: Elektrofilní substituce bromu na jádro aromatických aminů

Aromatické aminy byly analyzovány v odpadní vodě. [15, 16] Pro úpravu vzorku vody byla zvolena extrakce tuhou fází. Přečištěný a nakoncentrovaný analyt byl eluován směsí methanol : acetonitril (1 : 1). Extrakt byl smíchán s ledovou kyselinou octovou a dále derivatizován. Činidlo tvořila kyselina octová sycená bromem. Po 15 minutách byl nadbytek bromu odstraněn nasyceným roztokem siřičitanu sodného. Roztok byl zředěn vodou a zalkalizován hydroxidem sodným. Po dalších 15 minutách byl alkalický roztok extrahován pentanem a analyzován GC-ECD nebo GC-MS. Obdobně byly aromatické aminy analyzovány také v textilním oblečení. [17]. Jiný postup byl zvolen při stanovení difenylaminu v ovoci. [18] Pro derivatizaci byl použit roztok tetrachlormethanu nasycený krystalky jódu a obsahující kapalný brom (5% v/v). Reakční směs byla za míchání zahřívána ve vodní lázni (40-45 °C, 10 minut). Poté byl roztok odpařen do sucha, odparek byl rozpuštěn v hexanu a analyzován GC.

Bromaci, při níž dochází k adici bromu na dvojnou vazbu organické sloučeniny, vystihuje Obr. 14.



Obr. 14: Elektrofilní adice bromu na dvojnou vazbu

Velmi často je k přípravě bromu užitá reakce KBr s KBrO_3 v kyselém prostředí. Brom poté reaguje s nenasycenou sloučeninou. Po ukončení reakce je nadbytek bromu odstraněn thiosíranem sodným a roztok je extrahován dichlormethanem. Některé studie se také zabývají tzv. on-column bromací vybraných alkenů. [19, 20]

Bromačních reakcí je s oblibou využíváno také ve volumetrii, konkrétně při bromatometrických titracích, při kterých se jako odměrný roztok používá bromičnan draselný. Přímou titrací odměrným roztokem KBrO_3 v přítomnosti KBr v kyselém prostředí lze na základě substituční reakce stanovit anilín, fenoly, 8-chinolinol a řadu dalších organických látek. Velmi často se tyto sloučeniny stanovují zpětnou titrací. Do okyseleného roztoku vzorku se přidá bromid a známý nadbytek bromičnanu. Nezareagovaný brom se přidávkem jodidu draselného převede na jod a látkové množství jodu, které je stejné jako látkové množství bromu, se zjistí titrací odměrným roztokem thiosíranu za přítomnosti škrobového mazu. [21] Nepřímým stanovením lze také stanovit dvojně vazby v nenasycených organických sloučeninách, na které se brom uvolněný reakcí bromičnanu s bromidem aduje (Obr. 14). [22, 23]

Jelikož je KBrO_3 v kyselém prostředí schopný oxidovat organické i anorganické látky, používá se také pro oxidimetrické stanovení iontů As^{3+} , Sb^{3+} , Sn^{2+} , Cu^+ , Tl^+ a dále hydrazinu, který je oxidován na elementární dusík. [21]

2.2 Derivatizace z pohledu činidel

Derivatizační činidla, analyty a reakční podmínky, které byly vyžívány v experimentální části, shrnuje Tab. I. Fyzikálně-chemické vlastnosti těchto látek jsou vedle ostatních činidel zahrnuty v Tab. II-V.

Tab. I: Činidla použité pro derivatizaci vybraných analytů v experimentální části práce

Činidlo	Analyty	Typ reakce	Podmínky
cysteamin	karbonylové sloučeniny	kondenzace	pH=8, lab. teplota
o-fenylendiamin	kyselina pyrohroznová	kondenzace	pH < 4, 80 °C
N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid	sotolon, kyselina pyrohroznová - po reakci s o-fenylendiaminem	silylace	pyridin, 80 °C
t-butyldimethylsilylchlorid	sotolon	silylace	pyridin, 80 °C
ethylchloroformiát	aminokyseliny	acylace, esterifikace	alkohol/pyridin
bromační směs (bromid a bromičnan)	akrylamid	bromace	H ₂ SO ₄ (10%)

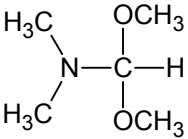
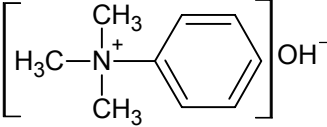
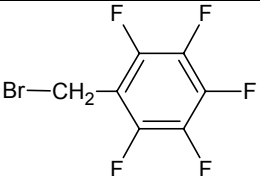
Tab. II: Souhrn nejpoužívanějších silylačních činidel a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti [(10-12, 24, 25)]

Silylační činidlo (zkratka)	Chemická struktura	M [g/mol]	T. v. [°C/mm Hg]	Poznámka
trimethylchlorsilan (TMCS)	$(\text{H}_3\text{C})_3\text{Si}-\text{Cl}$	108,64	57	Slabý donor. Má funkci katalyzátoru a obvykle je užívaný v kombinaci s činidly BSA, BSTFA, HMDS a MSTFA. Jako vedlejší produkt vzniká HCl.
hexamethyldisilazan (HMDS)	$(\text{H}_3\text{C})_3\text{Si}-\text{NH}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$	161,39	124-127	Slabý donor, derivatizuje alkoholy a fenoly. Obvykle užívaný v kombinaci s TMSC.
bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA)	$\begin{array}{c} \text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$	203,43	71-73/35	Vysoce reaktivní, univerzální činidlo. Produkty vznikají za mírnějších podmínek. Velmi těkavý. Vedlejší produkt, TMS-acetamid, může překrývat píky derivátu. BSA směsi oxidují na SiO_2 , který může znečistit FID.
trimethylsilylimidazol (TMSIM)	$\begin{array}{c} (\text{H}_3\text{C})_3\text{Si}-\text{N} \\ \\ \text{Imidazol} \end{array}$	140,26	93-94/14	Je selektivní, ochotně reaguje s hydroxylovými sloučeninami, ale nereaguje s aminy. TMSIM se již vzdušnou vlhkostí rychle rozkládá za vzniku imidazolu a hexamethydisiloxanu.
N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid (BSTFA) ^{a)}	$\begin{array}{c} \text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{F}_3\text{C}-\text{C}=\text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$	257,40	145-147	Vysoce reaktivní, univerzální činidlo. Reaguje rychleji než BSA a poskytuje těkavější vedlejší produkty. Má charakter rozpouštědla. Ve své struktuře obsahuje fluor, který potlačuje depozice SiO_2 během FID detekce. Ideální pro ECD a NCI-MS.

N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{F}_3\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{Si}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$	199,25	130-132	Má podobnou donorovou sílu jako BSA a BSTFA a může být užít k silylaci všech protických skupin. Nejtěžavější ze všech TMS acetamidů. Ideální pro ECD a NCI-MS.
N-methyl-N-t-butyl-dimethylsilyltrifluoroacetamid (MTBSTFA)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \quad \\ \text{F}_3\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{Si}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$	241,33	172-175	Při reakci s analytem dochází k záměně aktivního vodíku za skupinu TBDMS. Tyto deriváty se oproti TMS derivátům vyznačují vyšší hydrolytickou stabilitou. Často se používá kombinace MTBSTFA s 1% TBDMSCl. Vhodné pro derivatizaci aminokyselin. Ideální pro ECD a NCI-MS.
t-butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl) ^{a)}	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{Cl} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$	150,72	125	
N,N-diethyl-N-trimethylsilylamin (TMSDEA)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{C}_2\text{H}_5 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{N} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	145,32	125-126	Středně silný donor, pro derivatizaci karboxylových kyselin a aminokyselin. Jako katalyzátor se používá TMCS, trifluoroctová kyselina apod.
N-methyl-N-trimethylsilylacetamid (MSA)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{CH}_3 \end{array}$	145,27	159-161	Výborné činidlo pro derivatizaci kyselin, alkoholů, fenolů a aminů.
N,N-dimethyl-N-trimethylsilylamin (TMSDMA)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (\text{H}_3\text{C})_3\text{Si}-\text{N} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	117,26	84	Podobné donorové schopnosti a uplatnění jako TMSDEA.

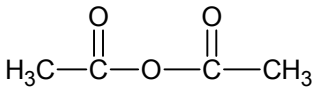
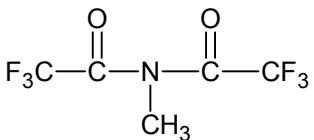
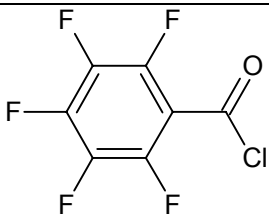
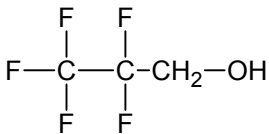
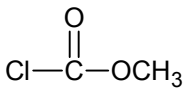
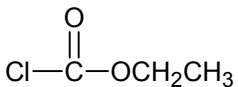
^{a)} činidlo použité v experimentální části

Tab. III: Souhrn nejpoužívanějších alkylačních a esterifikačních činidel a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti [10,11 , 24, 25]

Alkylační a esterifikační činidlo (zkratka)	Chemická struktura	M [g/mol]	T. v. [°C/mm Hg]	Poznámka
diazomethan	$\text{H}_2\text{C}=\text{N}^+=\text{N}^-$	42,04	-	Pro derivatizaci karboxylových kyselin, alkoholů, fenolů a aminů v prostředí nepolárního rozpouštědla. Rychlá reakce, probíhající za mírných podmínek s vysokým výtěžkem. Nejvhodnější činidlo pro přípravu methyl-esterů.
fluorid boritý / alkohol	$\text{BF}_3 / \text{R-OH}$ $\text{R} = \text{CH}_3, \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_4\text{H}_9$	67,81 (BF_3)	-	K přípravě esterů karboxylových kyselin. Pro methyl-estery se využívá také methanolký roztok HCl nebo H_2SO_4 .
N,N-dimethylformamid dimethylacetal (methyl-8-reagent)		119,16	102-103/ 720	Reaguje s karboxylovými kyselinami, fenoly, thioly a aminy. Citlivý vůči vlhkosti. Rozpouštědlo: pyridin, DMF, ACN, THF, alkoholy, benzen.
trimethylanilinium hydroxid (TMAH)		153,22	65/760	TMAH v 0,2-M methanolu je činidlo vhodné k přípravě methyesterů. Je preferovaným N-alkylačním činidlem pro derivatizaci barbiturátů a podobných sloučenin.
pentafluorbenzyl bromid (PFBBr)		260,99	174-175	Činidlo k derivatizaci karboxylových kyselin, fenolů a thiolů. Vhodné pro ECD.

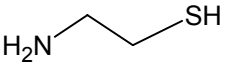
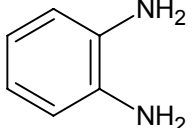
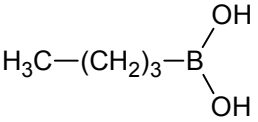
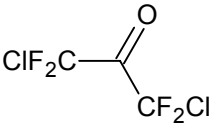
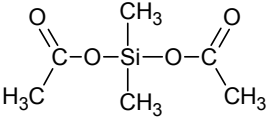
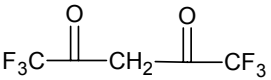
Tab. IV: Souhrn nejpoužívanějších acylačních činidel a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti [10-12, 24, 25].

Acylační činidlo (zkratka)	Chemická struktura	M [g/mol]	T. v. [°C/mm Hg]	Poznámka
anhydrid kyseliny trifluorooctové (TFAA)		210,03	39,5-40	Anhydridy reagují s alkoholy, fenoly a aminy za vzniku stabilních a vysoce těkavých derivátů. Reaktivita perfluoracyl anhydridů klesá v pořadí TFA > PFA > HBFA. HBFA deriváty jsou nejvíce citlivé při ECD detekci. Bazická látka (např. triethylamin, pyridin, pevný NaHCO ₃) je přidávána za účelem neutralizace kyselých vedlejších produktů vznikajících během derivatizace. Ideální pro ECD a NCI-MS.
anhydrid kyseliny pentafluorpropionové (PFPA)		310,05	69-70	
anhydrid kyseliny heptafluormásečné (HFBA)		410,06	108-110	
trifluoracetylimidazol (TFAI)		164,09	45-46/14	Tato skupina látek reaguje za mírných podmínek s alkoholy, fenoly, primárními nebo sekundárními aminy a thioly. Vedlejší produkt (imidazol) není kyselý. Lze acylovat i látky citlivé vůči kyselinám. Acylace s HFBI může probíhat bez přítomnosti rozpouštědla, činidlo a analyt je ale třeba zahřát na teplotu 80 °C po dobu 2-3 hod. Ideální pro ECD a NCI-MS.
pentafluorpropionylimidazol (PFPI)		214,09	-	
heptafluorbutyrylimidazol (HFBI)		264,10	158-163	

anhydrid kyseliny octové (AA)				Činidlo může být užito s bazickým katalyzátorem, např. pyridinem, který je akceptorem kyselých vedlejších produktů.
N-methyl-bis (trifluoroacetamid) (MBTFA)		223,07	121-122	Reaguje velmi ochotně s primárními a sekundárními aminy, méně ochotně s hydroxylovými sloučeninami a thioley. Acylace aminů se uskutečňuje za laboratorní teploty. Méně reaktivní skupiny látek již zahřátí vyžadují. Reakce probíhá za mírných nekyselých podmínek. Ideální pro ECD a NCI-MS.
pentafluorbenzoylchlorid (PFBCl)		230,52	158-159	Reaguje s alkoholy a sekundárními aminy. Reakci je třeba katalyzovat pyridinem nebo podobnou bází. Ideální pro ECD a NCI-MS.
pentafluoropropanol (PFPOH)		150,05	80/748	PFPOH je společně s PFPA využíván pro derivatizaci běžných funkčních skupin, zejména polyfunkčních bioorganických sloučenin. Ideální pro ECD a NCI-MS
methylchloroformiát		94,5	70-72	Chloroformiáty jsou využívány k derivatizaci aminů (zejména aminokyselin), alkoholů a fenolů. Derivatizace karboxylových kyselin probíhá za katalytického působení pyridinu. Ideální pro ECD a NCI-MS.
ethylchloroformiát ^{a)}		108,52	93	

^{a)} činidlo použité v experimentální části

Tab. V: Souhrn vybraných derivatizačních činidel tvořících cyklické deriváty a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.[5, 9, 10, 25]

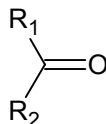
Činidla tvořící cyklické deriváty (zkratka)	Chemická struktura	M [g/mol]	T. v. [°C]	Poznámka
cysteamin ^{a)}		113,61	-	Reaguje s karbonylovými sloučeninami za tvorby stabilních thiazolidinových derivátů. Citlivá NPD detekce. Reakce obvykle vyžaduje pH nad 7.
o-fenylendiamin (OPDA) ^{a)}		108,14	256-258	Kondenzuje s α -ketokyselinami a α -dikarbonylovými sloučeninami za tvorby chinoxalinů.
t-butanboronová kyselina		101,94	-	Ze sloučenin, obsahující OH, NH a/nebo COOH tvoří cyklické boronáty. Reaguje v prostředí pyridinu.
1,3-dichlortetrafluoraceton (DCTFA)		198,93	-	Reakcí s aminokyselinami poskytuje oxazolidinony a reakcí s α -hydroxykyselinami tvoří dioxolanony. Ideální pro užití ECD.
dimethyldiacetoxysilan (DMDAS)		176,24	163	Reaguje v přítomnosti triethylaminu s dioly za tvorby cyklických silikonidů.
hexafluoracetylaceton		208,06	70-71	Reaguje v přítomnosti methanolu se sloučeninami obsahujícími guanidinovou skupinu za tvorby pyrimidinů.

^{a)} činidlo použité v experimentální část

2.3 Derivatizace z pohledu analytů

2.3.1 Karbonylové sloučeniny

Karbonylové sloučeniny jsou deriváty uhlovodíků, které ve své molekule obsahují velmi reaktivní karbonylovou skupinu (Obr. 15).



aldehydy: $R_1 = H$, $R_2 = \text{alkyl, aryl apod.}$; ketony: $R_1, R_2 = \text{alkyl, aryl apod.}$

Obr. 15: Chemická struktura karbonylové sloučeniny

Obecně mají aldehydy a ketony nižší bod varu než alkoholy se stejným počtem atomů uhlíku. Tato skutečnost je způsobena menší tendencí vytvářet větší nadmolekulární agregáty pomocí vodíkových vazeb jako je tomu u alkoholů. Na druhé straně, aldehydy a ketony mají výrazně vyšší body varu než ethery nebo dokonce uhlovodíky se stejnou molekulovou hmotností. Příčinou je přítomnost karbonylové skupiny, která je značně polarizována a způsobuje, že se na mezimolekulových soudržných silách podílejí také přitažlivé síly mezi dipóly. Za normálních podmínek jsou všechny základní aldehydy a ketony kapaliny. Výjimkou je formaldehyd, který je plyn. Vyšší deriváty jsou již tuhé látky. Nejjednodušší strukturní zástupci obou homologických řad jsou ve vodě neomezeně rozpustné (formaldehyd, acetaldehyd, aceton), vyšší homology jsou již omezeně rozpustné, popřípadě zcela nerozpustné (benzaldehyd). Zatímco základní aldehydy a ketony se vyznačují nepříjemným až štiplavým zápachem, mnoho vyšších derivátů má charakteristickou příjemnou vůni. Například cyklické ketony vykazují příjemnou vůni a nachází uplatnění při výrobě parfémů. [26, 27]

Karbonylové sloučeniny jsou běžně zastoupeny v přírodě a mnohé z nich se vyskytují jako vonné složky rostlinných silic nebo jako intermediáty četných biochemických pochodů. Hojně se vyskytují v různých potravinách. Některé aldehydy a ketony vznikají jako sekundární produkty oxidace tuků a olejů a způsobují jejich žluknutí. V alkoholických nápojích je v největší míře zastoupen acetaldehyd, který vzniká jako meziprodukt při kvašení cukerných roztoků. Přirozeným vstupem karbonylových sloučenin do přírody jsou mimo jiné i lesní požáry a sopečná činnost. [28]

Mnohé karbonylové sloučeniny mohou mít negativní dopad na životní prostředí. Značné množství těchto látek je produkováno lidskou činností. Zejména to jsou spalovací procesy. Významným zdrojem je rovněž cigaretový kouř a automobilový průmysl, kde jsou tyto látky emitovány hlavně vznětovými motory. Aldehydy a ketony jsou meziproducty fotochemického smogu a přispívají k jeho toxicitě. Nejen, že dráždí oči, kůži a dýchací cesty, ale některé jsou také podezřelé z karcinogenních a mutagenních účinků. Proto je třeba jejich množství v životním prostředí neustále sledovat. Velká pozornost je věnována zejména formaldehydu a acetaldehydu, které jsou v životním prostředí zastoupeny v největší míře. Aldehydy bývají monitorovány nejen v atmosféře, ale i ve vodě, kde vznikají jako vedlejší produkty při dezinfekci vody. [29]

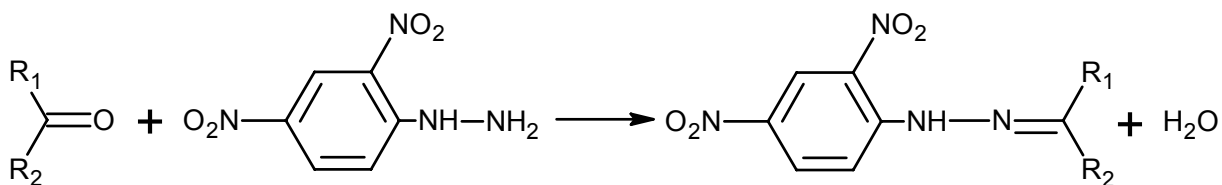
Derivatizace

▫ **Derivatizace vedoucí ke tvorbě hydrazonů**

Tvorby 2,4-dinitrofenylhydrazonových (DNPH) derivátů aldehydů a ketonů je v plynové chromatografii využíváno již mnoho let. DNPH reaguje v kyselém prostředí s aldehydy a ketony (Obr. 16). U některých derivátů mohou vznikat dva píky odpovídající geometrickým izomerům cis a trans. Tyto deriváty mohou být separovány HPLC nebo GC. Ačkoli jsou DNPH derivatizace kvůli vysoké robustnosti a dobré opakovatelnosti více upřednostňovány v HPLC, v mnohých aplikacích lze uplatnit i GC. V některých komplexních směsích (např. kondenzát cigaretového kouře) se při separaci pomocí HPLC mohou vyskytovat interference a stanovení karbonylových sloučenin ve stopovém množství může být obtížné. Řešením je separace pomocí plynové chromatografie, která poskytuje vysoké rozlišení a ve srovnání s HPLC i kratší dobu analýzy. [30, 31] Nicméně, GC analýza DNPH derivátů vyžaduje vysoké teploty, kvůli nízké těkavosti těchto látek. [32] Před nástřikem je nezbytné odstranit nadbytek DNPH, který by jinak mohl vést k poškození kolony a detektoru.

V plynové chromatografii byly DNPH derivatizace užity pro stanovení karbonylových sloučenin v cigaretovém kouři a výfukových plynech motorových vozidel. Saito a kol. [33] analyzovali stopové množství aldehydů a ketonů ve výfukových plynech motorových vozidel pomocí GC-FID. Výfukové plyny byly prosáty přes dva sériově spojené impingry, které obsahovaly kyselinu chlorovodíkovou nasycenou DNPH. Deriváty byly extrahovány chloroformem. Jako vnitřní standard byl použit antracen. V jiné studii byl k záhytu

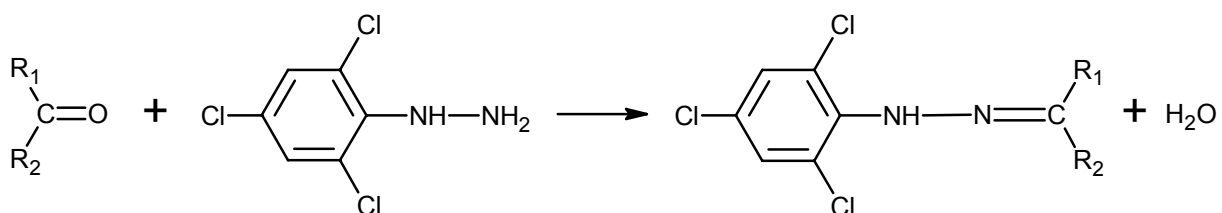
karbonylových sloučenin z cigaretového kouře použit roztok DNPH v acetonitrilu okyselený kyselinou chloristou. [34]



Obr. 16: Reakce karbonylové sloučeniny s DNPH [9]

Derivatizace karbonylových sloučenin halogenovanými aromatickými hydraziny našla uplatnění při GC analýze s ECD nebo MS. Mezi nejběžnější činidla patří 2,4,6-trichlorfenylnhydrazin (TCPH) a 2,3,4,5,6-pentafluorfenylnhydrazin (PFPH). Činidla jsou charakteristická tvorbou vysoce těkavých derivátů karbonylových sloučenin. Metody v GC založené na derivatizaci karbonylových sloučenin činidly TCPH a PFPH poskytují nízké limity detekce. [34]

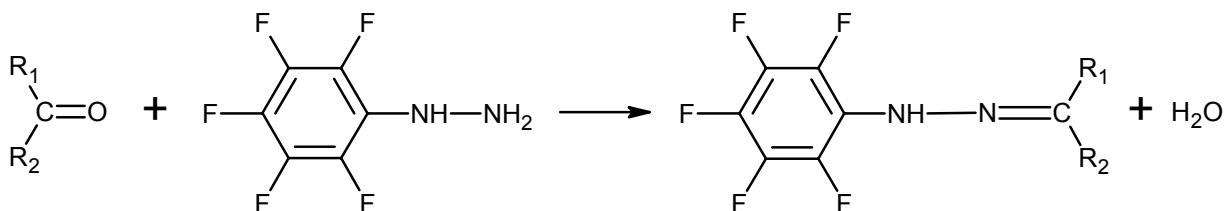
Činidlo TCPH bylo využito při analýze karbonylových sloučenin přítomných v atmosféře s použitím vzorkovací patry s náplní C18, která byla nasycena tímto derivatizačním činidlem. Reakce TCPH s nízkomolekulárními karbonylovými sloučeninami byla uskutečněna při 100 °C po dobu 6 minut za nepřítomnosti kyselého katalyzátoru (Obr. 17). Poté následovala eluce acetonitrilem a GC-ECD analýza. V případě formaldehydu byl stanoven detekční limit 0,1 ppb (v/v) v deseti litrech vzorku, pro ostatní karbonylové sloučeniny byly detekční limity mnohem menší a to 0,02-0,3 ppb (v/v). [35]



Obr. 17: Reakce karbonylové sloučeniny s TCPH [36]

Derivatizace 2,3,4,5,6-pentafluorfenylnhydrazinem byla využita ke stanovení karbonylových sloučenin vznikajících během peroxidace lipidů. PFPH reagoval v přítomnosti HCl s karbonylovými sloučeninami za vzniku příslušných hydrazonů (Obr. 18). Reakce probíhala za laboratorní teploty. Vytvořené deriváty byly extrahovány nepolárním rozpouště-

dlem. Při GC-ECD nebo GC-MS analýze činily dosažené limity 10^{-14} a 10^{-12} mol/ml. Tato metoda byla aplikována při analýze těkavých karbonylových sloučenin v zahřátém rostlinném oleji a v lidské moči. [37]

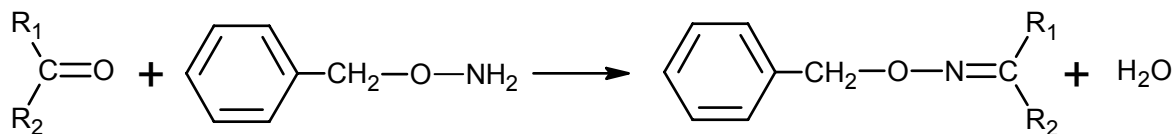


Obr. 18: Reakce karbonylové sloučeniny s PFPH [9]

▫ Derivatizace vedoucí ke tvorbě oximových derivátů

Principem oximové derivatizace je reakce O-alkylhydroxylaminu s karbonylovou sloučeninou vedoucí ke vzniku příslušného O-alkyloximu. [28] Oximové deriváty vykazují vyšší těkavost ve srovnání s DNPH deriváty. [38] Protože v molekulách oximů je vázán atom dusíku, je výhodné použít dusíko-fosforového detektoru (NPD), který umožňuje citlivější a selektivnější detekci O-alkyloximů než klasický plamenově ionizační detektor. Obdobně je vhodné použít detektor elektronového záchytu k detekci derivátů O-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)oximů. Za předpokladu, že je použita polární kolona, reagují nesymetrické karbonylové sloučeniny ($\text{R}_1 \neq \text{R}_2$; např. acetaldehyd) s benzyhydroxylaminem (BHA) za vzniku dvou geometrických isomerů, které se projeví dvěma píky v chromatografickém záznamu. [39] Bylo popsáno použití hydroxylaminu a O-alkylhydroxylaminu s těmito alkyly: methyl-, benzyl-, p-nitrobenzyl- a pentafluorbenzyl-. [28] Aplikace zaměřené na benzyloximové a O-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)oximové derivatizace jsou nejčastější.

V roce 1980 Magin [40] popsal metodu, využívající benzyloximových derivátů ke kvalitativní a semikvantitativní GC analýze těkavých karbonylových sloučenin v cigaretovém kouři. Aldehydy a ketony byly zachyceny na silikagelu, eluovány vodou a poté derivatizovány benzyhydroxylaminem (Obr. 19). Deriváty byly analyzovány plynovou chromatografií s citlivou NPD detekcí. Ačkoli je většina derivatizací uskutečněna za kyselých podmínek, existuje také studie, ve které benzyhydroxylamin reaguje s aldehydy v bazickém prostředí tvořeném triethylaminem (25 °C, 2 hodiny). Oximové deriváty byly extrahovány hexanem. Zjištěné limity detekce GC-FID analýzou byly v jednotkách $\mu\text{g/ml}$. Touto metodou je možné kvantitativně stanovit aldehydy až do C_{10} . [39]



Obr. 19: Reakce karbonylové sloučeniny s BHA [9]

Derivatizace O-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)hydroxylaminem (PFBHA) bylo poprvé využito při analýze ketosteroidů. [41] Posléze našlo čínidlo uplatnění při přeměně nejen ketonů, ale také aldehydů na příslušné O-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)oximy (PFBO; Obr. 20). PFBHA byl porovnán s PFPH [42]. Tvorby PFBO derivátů aldehydů bylo dosaženo při mnohem nižší koncentraci činidla PFBHA než je vyžadováno u PFPH. Jelikož jsou PFBO deriváty mnohem více těkavé než korespondující PFPH deriváty, může být separace uskutečněna při nižší teplotě (70-100 °C). PFBO deriváty, uchovávané v ethylacetátu při pokojové teplotě, mohou být stabilní až několik dní.

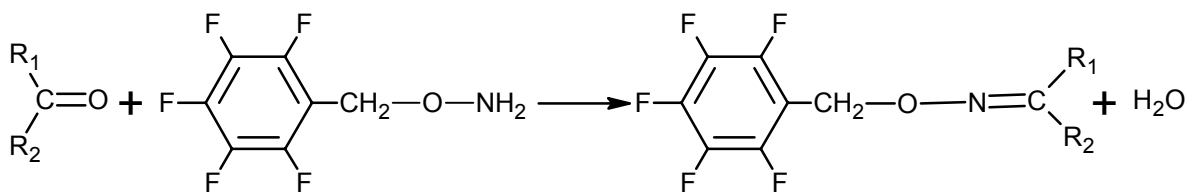
Derivatizace využívající PFBHA je ideální pro analýzu stopového množství aldehydů ve vzduchu. Příkladem aplikace je analýza formaldehydu, který byl po absorpci v destilované vodě modifikován PFBHA. Reakce probíhala při pokojové teplotě po dobu 40 minut. Deriváty byly extrahovány hexanem a analyzovány GC-ECD. V pěti litrech vzorku vzduchu byly stanoveny sub-ppb hodnoty formaldehydu. [43] Jiná metoda využívá k záchytu aldehydů ze vzduchu dva sériově spojené impingery naplněné ethanolickým roztokem PFBHA. [44] PFBO deriváty karbonylových sloučenin byly také analyzovány v pitné vodě, dále v pivě, víně a jiných alkoholických nápojích. [45-49] PFBHA byl užit také k nepřímému stanovení kyseliny močové v séru. [50]

Mnoho studií je zaměřeno na derivatizaci karbonylových sloučenin s užitím extrakce na tuhé fázi (SPE) nebo mikroextrakce na tuhé fázi (SPME), které ve srovnání s extrakcí kapalina-kapalina (L-L) vykazují vyšší návratnost, popřípadě kratší čas analýzy. [51] Derivatizace, využívající SPE lze rozdělit do tří kroků. Nejprve je příslušný objem PFBHA nasorbován na lože sorbentu. Poté dochází k reakci mezi činidlem a analytem ve vodné fázi procházející ložem. Nakonec jsou oximy eluovány hexanem. Tímto způsobem byly stanoveny aldehydy v pitné vodě. [52]

Většina aplikací využívá SPME. Vysoká těkavost PFBO totiž umožňuje použít head-space techniku vzorkování (HS; sorbce analytů z parní fáze nad vzorkem), která minimalizuje

interference způsobené maticí. Existují dva možné přístupy kombinující derivatizaci a techniku SPME:

- a) Derivatizace v roztoku s následnou SPME – činidlo reaguje s analytem v roztoku za vzniku derivátu, který je posléze sorbován vláknem z head-space prostoru. Tato technika byla užita při analýze karbonylových sloučenin v pivě. PFBHA derivatizace byla uskutečněna při 45 °C po dobu 105 minut. Pro SPME bylo použito vlákno pokryté vrstvičkou polydimethylsiloxan/divinylbenzenu (PDMS/DVB). Sorbce z head-space prostoru probíhala optimálně při 60 °C po dobu 40 minut a deriváty byly desorbovány v GC injektoru. [53] Tato metoda byla použita také při analýze aldehydů v pitné vodě [54] a karbonylových sloučenin ve víně [55].
- b) Přímá derivatizace na SPME vlákne - vlákno nasycené PFBHA je umístěno do head - space prostoru nad vzorek. Této techniky bylo využito při analýze alifatických aldehydů v travní a kukuřičné siláži. PFBHA byl při 25 °C po dobu deseti minut sorbován na vlákno, pokryté vrstvičkou PDMS/DVB. Vlákno, nasycené činidlem, poté bylo vystaveno head-space prostoru nad vzorkem siláže (60 °C, 8 min) a vytvořené oximy byly desorbovány v GC injektoru. [56] Obdobně byly stanoveny karbonylové sloučeniny v rybím masě [57].



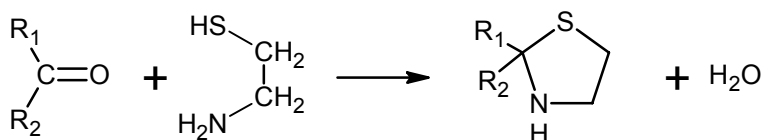
Obr. 20: Reakce karbonylové sloučeniny s PFBHA [9]

▫ Derivatizace vedoucí ke tvorbě cyklických derivátů

Shibamoto a jeho spolupracovníci vyvinuli derivatizační metodu, která za mírných podmínek poskytuje pro každý aldehyd jen jeden derivát. Principem je reakce aldehydů s 2-aminoethanthiolem (cysteaminem) za vzniku stabilních thiazolidinových derivátů (Obr. 21). Vytvořené thiazolidinové deriváty mohou být dokonale separovány křemennou kapilární kolonou s citlivou NPD detekcí. Tuto metodu je možno aplikovat jak na nasycené, tak nenasyčené karbonylové sloučeniny.

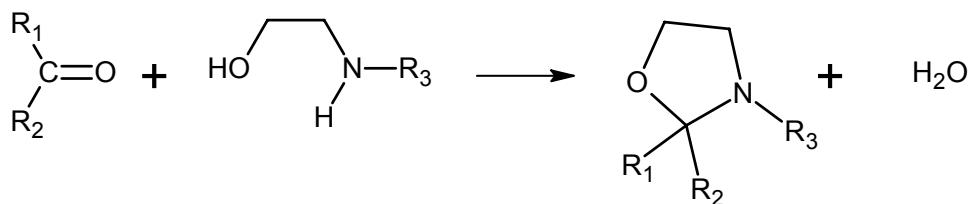
T. Shibamoto a kol. zveřejnili mnohé publikace zaměřené na analýzu aldehydů v potravinách. Například kvantitativně analyzovali acetaldehyd v jídle a nápojích. Acetaldehyd přítomný v potravinách byl derivatizován vodným roztokem cysteaminu při pH 8 (25 °C, 1 hod). Po úpravě pH na 7 kyselinou chlorovodíkovou následovala extrakce dichlormethanem. Pro odstranění vlhkosti byl k extraktu přidán bezvodý síran sodný. Analýza byla provedena pomocí GC-NPD. Zjištěný obsah acetaldehydu byl v rozsahu 0,46 (cola) až 101,9 ppm (whisky) a limit detekce byl 16,7 pg. [58]. Obdobným postupem byl v jídle a nápojích také stanoven obsah methylglyoxalu. [59] Rovněž analyzovali aldehydy v potravinovém oleji [60], v přepáleném hovězím [61] a vepřovém tuku [62] a také kvantitativně stanovili obsah aldehydů vytvořených během tepelného zpracování různých druhů rybiho masa [63]. Dále se věnovali analýze karbonylových sloučenin v životním prostředí, např. v cigaretovém kouři. [64] Stopové množství aldehydů bylo zjištěno i ve výfukových plynech motorových vozidel. [65]

Kataoka a kol. využili thiazolidinovou derivatizaci pro GC-FPD analýzu derivátů aldehydů ve vybraných potravinách [66] a v kouři po spálení různých vzorků (dřevo, vlasy, cigarety, plasty, odpad atd.). [67] Limity detekce u obou aplikací byly 4 - 100 pg. Derivatizační metoda byla také aplikována při analýze aldehydů v alkoholických nápojích. [68]



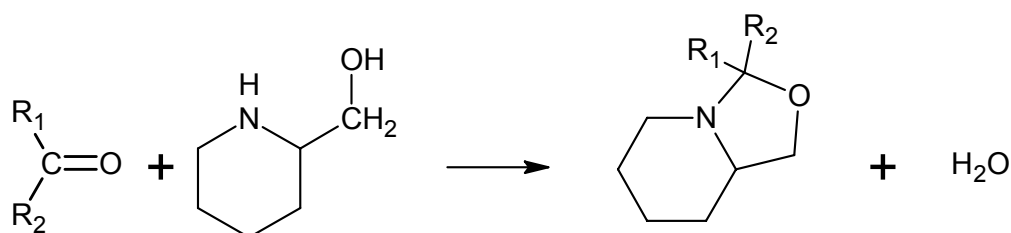
Obr. 21: Reakce karbonylové sloučeniny s cysteaminem [9]

Jiné cyklické deriváty (tzv. oxazolidiny) mohou být připraveny reakcí karbonylové sloučeniny se substituovaným ethanthiolem. Pro stanovení formaldehydu bylo využito reakce s 2-N-benzylethanolaminem (BEA) za vzniku příslušného 3-benzylloxazolidinu (Obr. 22). Plynný formaldehyd byl zachycen na sorbentu Chromosorb 102 s navázaným činidlem BEA, následovala eluce isooktanem a analýza GC-FID. Metoda je použitelná v rozmezí koncentrací 0,55 - 4,71 mg/m³ formaldehydu a není vhodná pro analýzu formaldehydu v okolním vzduchu. [69]



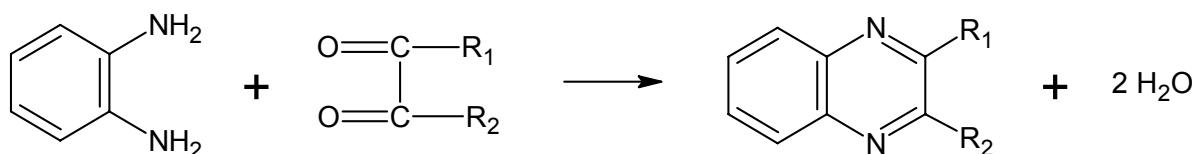
Obr. 22: Reakce karbonylové sloučeniny s BEA [36]

Obdobně byl stanoven akrolein po reakci s 2-(hydroxymethyl)-piperidinem (HMP), (Obr. 23). Vzorek byl prosáván přes trubici se sorbentem (XAD-2), na kterém byl navázán HMP. Následovala eluce toluenem a analýza GC s dusíkovým specifickým detektorem. Metoda je použitelná v rozmezí koncentrací 0,13 - 1,5 mg/m³ akroleinu. [70]



Obr. 23: Reakce karbonylové sloučeniny s HMP [36]

Pro derivatizaci α -dikarbonylových sloučenin je možné využít reakci s o-fenylendiaminem, kdy vzniká alkylderivát chinoxalinu (Obr. 24). Reakcí s glyoxalem vzniká chinoxalin, s methylglyoxalem 2-methylchinoxalin, s diacetylem 2,3-dimethylchinoxalin. Podobně reagují i aromatické α -dikarbonylové sloučeniny, dokonce i benzoin. Reakce probíhá ve vodném a alkoholickém prostředí, nebo v prostředí kyseliny octové již za chladu či při mírném zahřátí. [71]

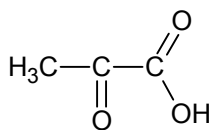


Obr. 24: Reakce α -dikarbonylové sloučeniny s o-fenylendiaminem; R₁, R₂ = alkyl

2.3.2 Kyselina pyrohroznová

Kyselina pyrohroznová (Obr. 25) je nejznámější α -ketokyselina. Ve své molekule obsahuje kromě funkční skupiny karboxylové ještě skupinu karbonylovou. Tato látka, známá také pod názvem 2-oxopropanová nebo α -ketopropanová kyselina, má sumární vzorec C₃H₄O₃ a molární hmotnost 88,06 g/mol. Tato kyselina je nažloutlá ostře páchnoucí kapalina

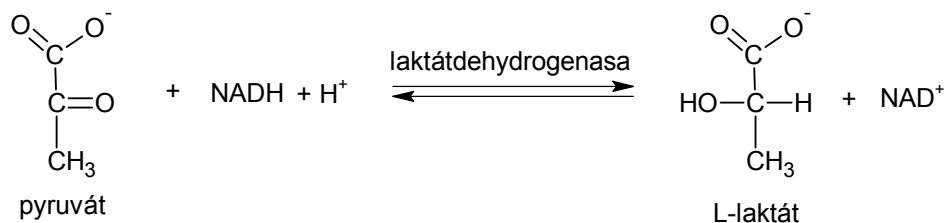
dobře mísitelná s vodou. Její bod varu je 165 °C a bod tání 11 - 12 °C. Disociační konstanta pKa při 25 °C je 2,49. [25]



Obr. 25: Chemická struktura kyseliny pyrohroznové

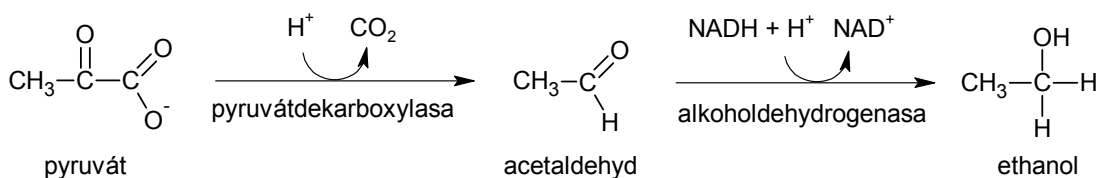
Kyselina pyrohroznová je biologicky důležitá molekula podílející se na různých biochemických reakcích v těle člověka, zvířat a v rostlinách. Klíčovou roli v buněčném metabolismu zaujímá sůl kyseliny pyrohroznové tzv. pyruvát ($\text{CH}_3\text{-CO-COO}^-$). Pyruvát se účastní mnoha katabolických (degradačních) a anabolických (biosyntetických) drah. V katabolismu sacharidů vzniká pyruvát v cytosolu v závěrečné fázi glykolýzy (štěpení cukru). [72] Úhrnná rovnice glykolýzy je:

$\text{Glukosa} + 2 \text{NAD}^+ + 2 \text{ADP} + 2 \text{Pi} \rightarrow 2 \text{NADH} + 2 \text{pyruvát} + 2 \text{ATP} + 2 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{H}^+$,
kde ADP = adenosindifosfát, ATP = adenosintrifosfát, Pi = monofosfát (PO_4^{3-}), NAD^+ a NADH = nikotinamidadeninukleotid a jeho redukováná forma. [73] Za anaerobních podmínek je pyruvát mléčným kvašením redukován na laktát (Obr. 26),



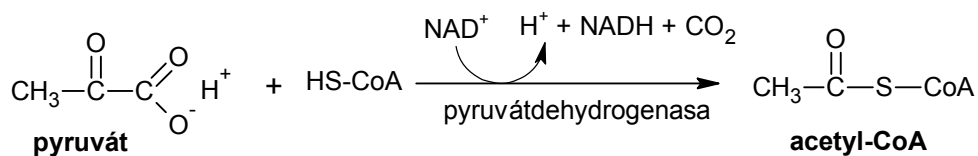
Obr. 26: Mléčné kvašení [73]

nebo alkoholovým kvašením na acetaldehyd, který je poté redukován na ethanol (Obr. 27).



Obr. 27: Alkoholové kvašení [73]

Při aerobním procesu je pyruvát oxidační dekarboxylací přeměněn na Acetyl CoA, který dále vstupuje do citrátového (Krebsova) cyklu (Obr. 28).



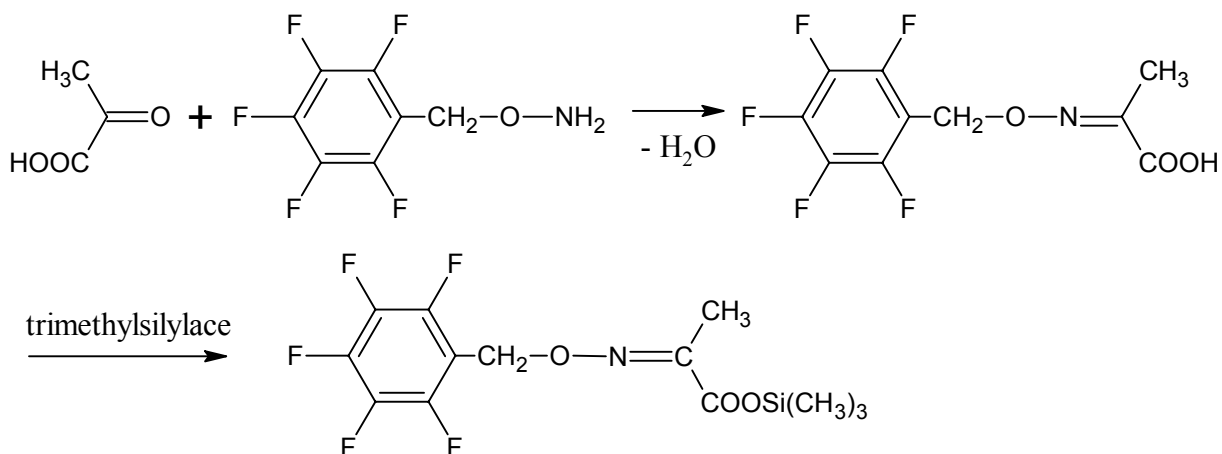
Obr. 28: Aerobní proces [73]

V anabolismu sacharidů vystupuje pyruvát jako prekurzor biosyntézy glukózy (tzv. glukoneogeneze). V metabolismu aminokyselin je pyruvát konečným produktem odbourávání uhlíkového skeletu cysteinu, serinu, glycinu, threoninu a hydroxyprolinu. Z alaninu vzniká pyruvát transaminací. [72] Kyselina pyrohroznová se přirozeně vyskytuje v černém pivu a ve víně, dále v ovoci (např. jablkách) a v některých druzích sýrů. [74]

Kyselina pyrohroznová se rovněž vyskytuje v atmosféře. Její přítomnost byla zaznamenána v aerosolu, dešťové vodě a v plynné fázi atmosféry jak v městech, tak i ve vzdálených kontinentálních a mořských oblastech. Je produktem biogenních emisí a fotochemické oxidace přírodních organických sloučenin (např. izopren a krezoly). [75]

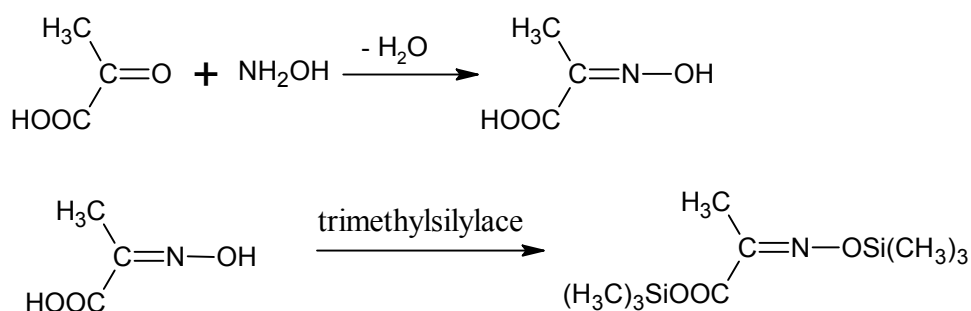
Derivatizace

Při analýze kyseliny pyrohroznové, může být využita dvoukroková derivatizace, která zahrnuje kondenzační reakci ketokyseliny s PFBHA a poté silanizaci trimethylsilylačním činidlem (Obr. 29). O-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)oximtrimethylsilyl estery různých ketokyselin, včetně kyseliny pyrohroznové, byly analyzovány v moči GC-MS. Ke vzorku moči, obsahující ketokyselinu, byl přidán PFBHA, pH roztoku bylo upraveno na 2-3 kyselinou sírovou a reakční směs byla ponechána dvě hodiny při laboratorní teplotě. Pro odstranění biologických interferencí byla použita kolonová kationtově-výměnná chromatografie. Poté byly ketokyseliny extrahovány ethylacetátem a podrobeny silanizaci činidly N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) a trimethylsilylchloridem (TMCS) v poměru 100 : 1 při 60 °C po dobu 30 minut. [76]



Obr. 29: Reakce kyseliny pyrohroznové s PFBHA a následná trimethylsilylace

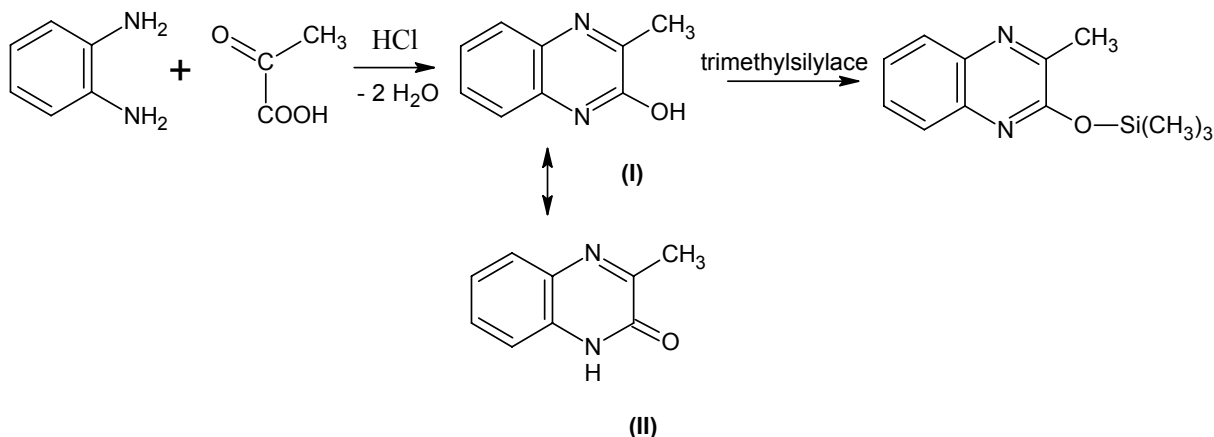
Jinou alternativou oximové derivatizace je reakce ketokyseliny s hydroxylaminem. Produkt reakce je poté podroben trimethylsilylaci (Obr. 30). Kimura a kol. [77, 78] analyzovali ketokyseliny v moči GC-MS. Ke vzorku moči, jejíž pH bylo upraveno na 12 - 14 NaOH byl přidán 5 % vodný roztok hydroxylaminu hydrochloridu. Derivatizace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Po okyselení a vysolení, byly deriváty extrahovány diethyletherem. Organická vrstva byla oddělena, vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena pod proudem dusíku při 60 °C. Konečný produkt byl derivatizován N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (BSTFA) a TMCS v poměru 10 : 1 (80 °C, 30 min).



Obr. 30: Reakce kyseliny pyrohroznové s hydroxylaminem a TMS činidlem

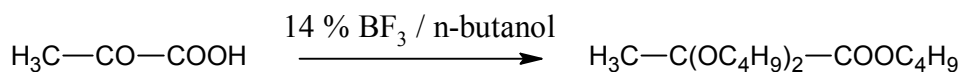
Široce využívanou derivatizační technikou pro analýzu ketokyselin je tvorba O-(trimethylsilyl)chinoxalinových derivátů. Kondenzací ketokyseliny s o-fenylendiaminem (OPDA) při pH < 4 vznikají 2-hydroxychinoxaliny (I), které jsou tautomerní s 1,2-dihydrochinoxalin-2-ony (II). 2-hydroxychinoxaliny mohou být poté podrobeny trimethylsilylaci za vzniku O-(trimethylsilyl)chinoxalinových derivátů (Obr. 31). Tento typ derivatizace

různých ketokyselin, včetně kyseliny pyrohroznové, byl aplikován při GC-MS analýze v plazmě a moči. [79-81]



Obr. 31: Reakce kyseliny pyrohroznové s OPDA a trimethylsilylačním činidlem

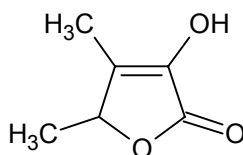
Kawamura [82] ve své studii popsal analýzu kyseliny pyrohroznové v dešťových srážkách a aerosolu GC-MS. Karboxylová skupina a ketoskupina kyseliny pyrohroznové byla derivatizována 14 % roztokem BF_3 v n-butanolu (100 °C, 30 minut), (Obr. 32). Poté následovala extrakce hexanem.



Obr. 32: Reakce kyseliny pyrohroznové s BF_3 a n-butanolem. [82]

2.3.3 Sotolon

Sotolon, nebo-li 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanon (Obr. 33), je řazen do skupiny pětičlenných laktonů. Molární hmotnost sotolonu je 128 g/mol. Vyskytuje se v podobě těkavé kapaliny (t.v. 184 °C), která je dobře rozpustná v polárních rozpouštědlech. [25] Ve vysokých koncentracích je sotolon charakteristický kořeněnou vůní (kari), v nižších koncentracích se vyznačuje vůní sladkou či oříškovou.

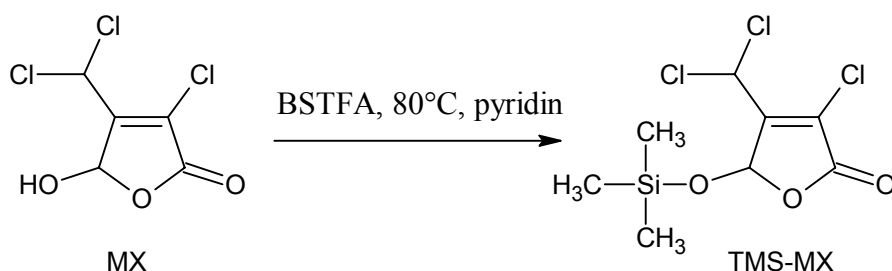


Obr. 33: Chemická struktura sotolonu

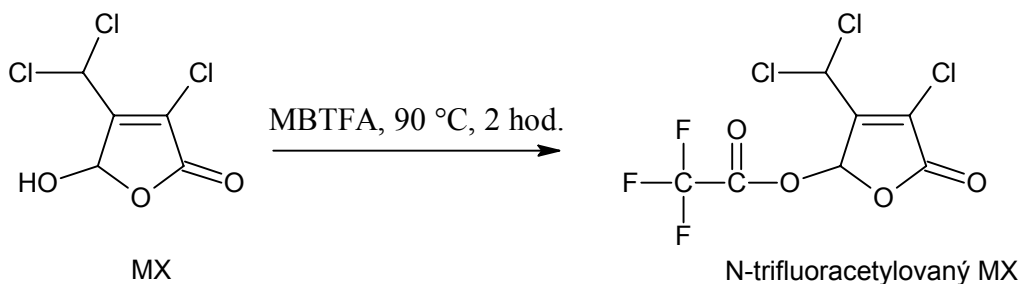
Sotolon je klíčovou aromatickou složkou v semenech rostliny pískavice řecké seno a libečku. Dále je přítomný ve třinové melase, kávě, sušeném tabáku, javorovém sirupu, houbě *Lactarius helvus*, japonském Sake a některých vínech. [83-86]

Derivatizace

Většina studií se zabývá analýzou nederivatizovaného sotolonu. V rámci této studie se nepodařilo nalézt publikace, které by se detailně zabývaly analýzou sotolonu po derivatizaci. Nicméně mnohé publikace se věnují derivatizaci jiných hydroxyfuranů, zejména chlorovaných, které se z hlediska toxicity mnohdy vyznačují karcinogenními či mutagenními účinky. Plynovou chromatografií byl v pitné vodě stanoven obsah 3-chloro-4-(dichlormethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanonu (MX). Při analýze byla využita silylace s BSTFA (Obr. 34) [87], acylace s N-methyl-bis-trifluoracetamidem (MBTFA; Obr. 35) [88] a alkylace s 2-propanolem [89], sek. butanolem [90], pentafluoropropanolem [91] či methanolickým roztokem BF_3 [92].



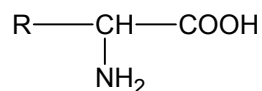
Obr. 34: Reakce 3-chloro-4-(dichlormethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanonu (MX) s BSTFA



Obr. 35: Reakce 3-chloro-4-(dichlormethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanonu (MX) s MBTFA

2.3.4 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou substituční deriváty karboxylových kyselin, které obsahují aminoskupinu $-\text{NH}_2$ vázanou obvykle na centrální uhlíkový atom označovaný jako uhlík α (Obr. 36).



Obr. 36: Chemická struktura aminokyseliny; R=alkyl, aryl apod.

Přítomnost skupin $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$, které mohou být ionizovány na $-\text{COO}^-$ a $-\text{NH}_3^+$, dodává aminokyselinám bez ohledu na zbytek molekuly dipolární charakter a aminokyseliny se mohou chovat v závislosti na pH jako kyseliny nebo zásady. [93] Aminokyseliny se proto řadí mezi amfolyty nebo amfoterní látky. Při určitém pH, které se označuje jako izoelektrický bod (pI), jsou ionizovány obě skupiny a molekula se navenek chová jako elektroneutrální. Při tomto pH jsou aminokyseliny nejméně rozpustné. V prostředí, které má nižší hodnotu pH než pI, nastává protonizace aminokyseliny, a proto v něm převládá kladně nabitá forma. Naopak v zásaditém prostředí aminokyselina proton odevzdává a převažuje forma aniontu. Hodnota pI je pro každou aminokyselinu charakteristická. Tuto vlastnost lze využít například při jejich separaci isoelektrickou fokusací. [73]

Aminokyseliny jsou většinou krystalické látky poměrně dobře rozpustné ve vodě a polárních rozpouštědlech. V nepolárních rozpouštědlech jsou již nerozpustné. Chemická různorodost aminokyselin je dána postranním řetězcem $-\text{R}$, který je také připojen k uhlíku α . Vzhledem k tomu, že uhlík α je v aminokyselinách s výjimkou glycinu (postrádá postranní řetězec; $\text{R}=\text{H}$) chirální, mohou tyto látky existovat ve formě dvou optických isomerů D a L. Tyto enantiomery se v běžném makrosvětě chovají totožně, rozlišitelné jsou pouze v asymetrickém prostředí, z čehož plyne nutnost užít pro GC separaci jeden ze dvou základních přístupů:

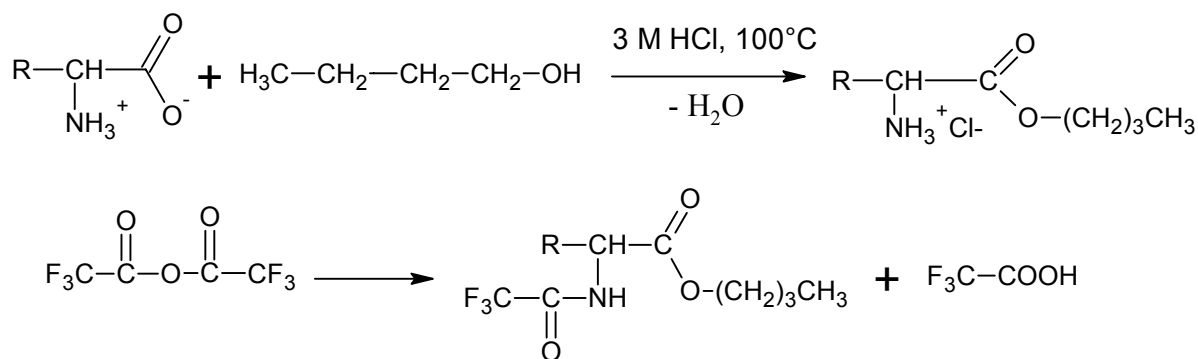
- a) Derivatizace aminokyselin opticky inaktivním činidlem (např. BSTFA) a separace derivátů chirální stacionární fází.
- b) Derivatizace aminokyselin opticky aktivním činidlem tak, aby derivát nesl dvě chirální centra a bylo možno separovat pár fyzikálně-chemicky odlišných diastereoizomerů. Diastereomery mohou být tvořeny esterifikací nebo acylací. Příkladem chirálního acylačního činidla pro aminokyseliny je N-trifluoracetyl-L-prolyl chlorid. [94]

V současné době je známo více než sto aminokyselin z nichž nejvýznamnějších je 20 L aminokyselin, které jsou základními stavebními jednotkami proteinů. [93, 95]

Derivatizace

Aminokyseliny, jako silně polární látky, jsou velmi málo těkavé, a proto není možné je chromatografovat přímo. Nejdříve je nutné převést aminokyseliny na vhodný derivát, dostatečně těkavý, stabilní, neinteragující s nosičem. [96]

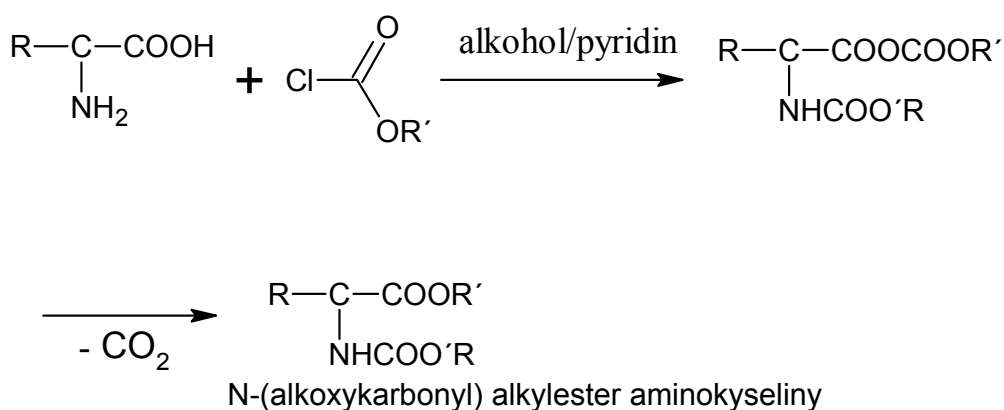
V r. 1962 Zomzely a kol. [97] analyzovali 22 běžně se vyskytujících aminokyselin pomocí GC-FID. K modifikaci aminokyselin byla využita derivatizace, která zahrnovala esterifikaci karboxylové skupiny n-butanolem a acylaci aminoskupiny anhydridem kyseliny trifluoroctové (TFAA). V r. 1965 Gehrke a kol. [98] popsali přípravu n-butyl-(N-trifluoroacetyl)esterů pro kvantitativní analýzu aminokyselin plynovou chromatografií. Jelikož cystin a některé bazické aminokyseliny jsou v butanolu nerozpustné, bylo zapotřebí nejprve připravit methylester, který je rozpustnější. Esterifikací aminokyseliny v methanolu při laboratorní teplotě byl připraven methylester, který byl poté interesterifikován butanolem při 90 °C po dobu 3 hodin. V obou případech bylo užito HCl jako katalyzátoru. N-butylester hydrochloridu byl poté podroben acylaci roztokem TFAA v CH₂Cl₂. Později byly reakční podmínky upraveny tak, aby bylo dosaženo přímé esterifikace aminokyseliny n-butanolem. Optimálního průběhu esterifikace bylo dosaženo při katalýze 3-M HCl a reakční teploty 100°C (Obr. 37). Doba esterifikace se tak významně zkrátila na 15 minut, s výjimkou isoleucinu, který vyžadoval 35 minut. [99] Aminokyseliny derivatizované butanolem a anhydridem trifluoroctové kyseliny byly analyzovány v krvi GC-FID a GC-MS [100]. Navzdory vysokým výtěžkům derivatizace, není tato metoda v současnosti oblíbená. Důvodem je zejména časová náročnost provedení.



Obr. 37: Reakce aminokyseliny s n-butanolem a TFAA

chloroformiáty za nejlepší. N-(alkoxykarbonyl)alkylestery byly analyzovány GC-MS v lidské moči [105], krvi a plazmě [104, 107].

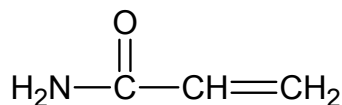
Vzorek, obsahující aminokyseliny byl derivatizován alkylchloroformiáty v prostředí směsi alkohol-pyridin (1 : 4). Reakční směs byla míchána po dobu asi jedné minuty při laboratorní teplotě. Reakce byla charakteristická tím, že v jednom reakčním kroku docházelo k esterifikaci karboxylové skupiny a zároveň acylaci aminoskupiny tímto činidlem. Deriváty byly poté extrahovány organickým rozpouštědlem (např. chloroformem). [104] Derivatizace může být také uskutečněna v kombinaci se SPME. [108]



Obr. 40: Reakce aminokyseliny s alkylchloroformiátem

2.3.5 Akrylamid

Akrylamid (2-propenamid; Obr. 41) je bezbarvá krystalická látka bez chuti a zápachu s molární hmotností 71,8 g/mol. Teplota tání této látky je 84 °C a teplota varu 125 °C/25 mm Hg. Akrylamid je monomer, obsahující amidovou skupinu a elektrofilně reaktivní dvojnou vazbu. Má vlastnosti slabé kyseliny i zásady. Je vysoce rozpustný ve vodě (215,5 g /100 ml při 30 °C) a jiných polárních rozpouštědlech. V nepolárních rozpouštědlech je prakticky nerozpustný. Má vysokou mobilitu v půdě a podzemních vodách, je biodegradovatelný. Z hlediska toxicity je akrylamid považován za potencionální lidský karcinogen. [24, 25, 109, 110]

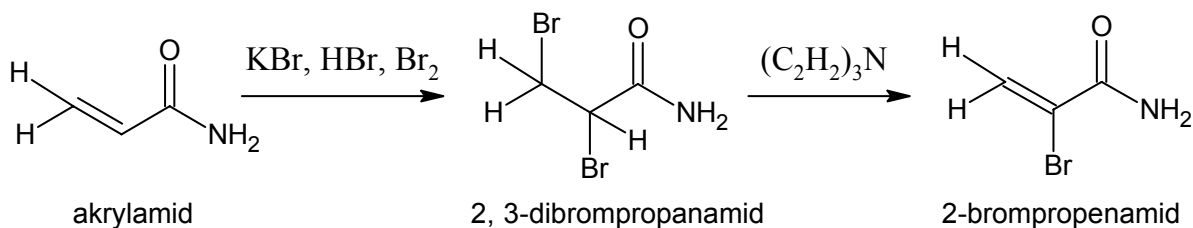


Obr. 41: Chemická struktura akrylamidu

Přítomnost akrylamidu v životním prostředí je způsobena jak přírodními, tak i antropogenními procesy, které jsou zejména průmyslového původu. Zdrojem této látky v ovzduší může být také cigaretový kouř. [111] V r. 2002 [114] švédští vědci ze Stockholmské University a Státního ústavu pro kontrolu potravin zveřejnili výsledky výzkumu, podle něhož byly v některých základních potravinách bohatých na škrob nalezeny neobvykle vysoké hodnoty akrylamidu. Výskyt tohoto karcinogenu v potravinách může být způsoben kontaminací z vnějšího prostředí, nejpravděpodobnější je ale vznik akrylamidu během tepelného zpracování potravin bohatých na škrob při teplotách nad 120 °C. Za hlavní mechanismus vzniku akrylamidu je všeobecně považována Maillardova reakce, která patří mezi nejvýznamnější a zároveň nejrozšířenější reakce probíhající po dobu skladování a zpracování potravin. [113] Vzhledem k přítomnosti elektrofilně reaktivní dvojně vazby, byl akrylamid zvolen jako modelový vzorek pro bromační reakce (kapitola 3.3.5).

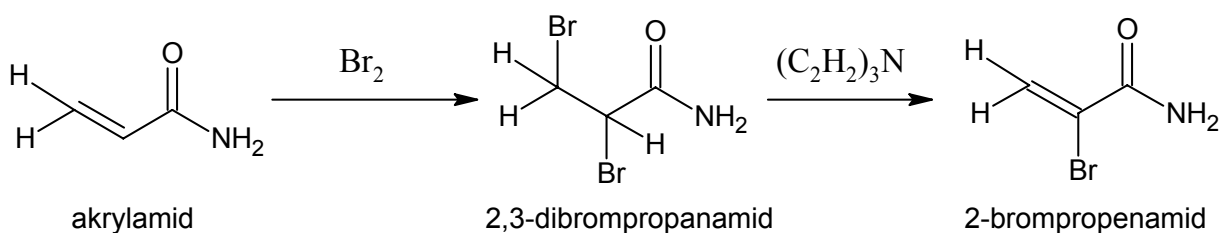
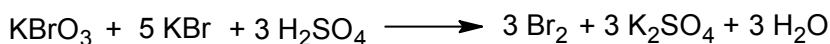
Derivatizace

Bromací akrylamidu je tvořen derivát, který je méně těkavý a méně polární než původní látka. Zavedením bromu do molekuly separované látky se zvýší citlivost při detekci elektronovým záchytem. Z pohledu MS detekce, se deriváty vyznačují vyšší iontovou hmotou a charakteristickými $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ zákonitostmi. [114] Hashimoto [115] popsal analýzu akrylamidu ve vodě pomocí GC-ECD. Derivatizace zahrnuje přidavek KBr, kyseliny bromovodíkové a nasyceného roztoku bromu (Obr. 42). Nadbytek bromu je pak odstraněn přídavkem thiosíranu sodného až do odbarvení roztoku. Vzniklý 2,3-dibrompropanamid je méně polární než původní sloučenina a je proto dobře rozpustný v nepolárních organických rozpouštědlech (např. ethylacetát a hexan). 2,3-dibrompropanamid je nestabilní a podléhá dehydrobromaci. Tento typ bromace byl využit také při analýze akrylamidu v polních plodinách [116], cereáliích [117], houbách [118] a vybraných jídlech [119] Tento derivatizační postup představuje rizika spojená s manipulací s toxickým bromem a silnou kyselinou bromovodíkovou. [114]



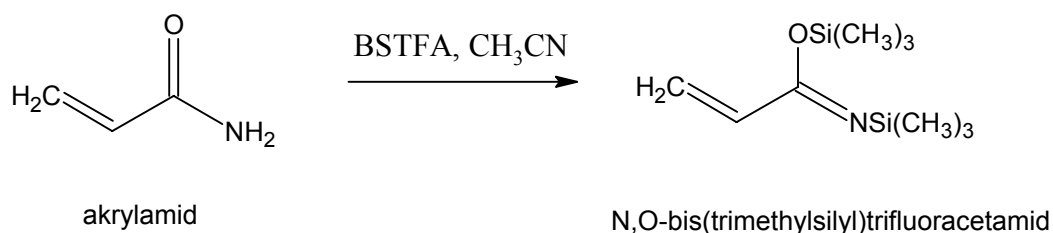
Obr. 42: Reakce akrylamidu s KBr, HBr a nasyceným roztokem bromu

Nemoto a kol. [120] popsal alternativní metodu, která je založena na derivatizaci akrylamidu v potravinách směsí KBr a KBrO_3 v přítomnosti 10 % kyseliny sírové (Obr. 43). Reakce je uskutečněna při teplotě 4 - 10 °C po dobu 90 minut. Stanovený limit detekce byl 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Jelikož brom je produktem oxidačně-redukční reakce mezi KBr a KBrO_3 , není tato metoda již tak nebezpečná. Touto metodou byl akrylamid stanoven ve smažených jídlech a v dalších jídlech bohatých na cukry. [121]



Obr. 43: Reakce akrylamidu s KBr a KBrO_3 [122]

Lagalante a Felter [123] publikovali metodu kvantitativní analýzy akrylamidu, založenou na derivatizaci a HS-SPME. Akrylamid byl reakcí s BSTFA v prostředí acetonitrilu převeden na těkavý N,O-bis(trimethylsilyl)akrylamid (BTMSA; Obr. 44). BTMSA byl poté extrahován SPME vláknem, pokrytým vrstvou polydimethylsiloxanu. Metodou GC-MS bylo dosaženo detekčního limitu 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Obr. 44: Reakce akrylamidu s BSTFA. [123]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- plynový chromatograf HP 6890, Hewlett Packard, USA
- hmotnostní spektrometr Agilent 5973, Agilent Technologies, USA
- autosampler HP 7683, Hewlett Packard, USA
- křemenná kapilární kolona ZB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm),
- nosný plyn – He 5.0. Siad, Itálie
- N₂, Messer, Německo
- centrifuga Eppendorf 5702, USA
- pH metr inoLab, pH elektroda SenTix 41, WTW Německo
- analytické váhy Mettler toledo, NewClassic MS205S, Švýcarsko
- ultrazvuková lázeň, Merci, ČR
- SPME zařízení - vlákno carboxen/polydimethylsiloxan 85 μm, Supelco, USA
- magnetická míchačka MM2A, Laboratorní přístroje Praha, ČR
- suchý termostat Evaterm, Labicom, ČR
- bodotávek HMK 68/2085, Franz Küstner Nacht. K. G., Německo
- automatické mikropipety
- laboratorní sklo, plastové špičky, zkumavky a eppendorfky, víčka, septa, krimpovací vialky (1,8 ml), krimpovací kleště.

3.2 Chemikálie

3.2.1 Derivatizační činidla

- cysteamin hydrochlorid, p.a., Fluka, Švýcarsko
- N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid, p.a., Fluka, Švýcarsko
- o-fenylendiamin, p.a., Lachema N.P. Brno, ČR
- bromid a bromičnan draselný, p.a., Lachema N.P. Brno, ČR
- ethylchloroformiát, p.a., Fluka, Švýcarsko
- t-butyldimethylsilylchlorid, p.a., Fluka, Švýcarsko
- hexamethylendisilazan a trimethylchlorsilan, p.a., Fluka, Švýcarsko - pro silanizaci vialek

3.2.2 Standardy

- formaldehyd, acetaldehyd, propionaldehyd, butyraldehyd, isobutyraldehyd, valeraldehyd, kapronaldehyd, furfural: p.a., Fluka, Švýcarsko
- benzaldehyd, p.a., Loba-chemie, Wien-Fischamend, Austrálie
- 4-hydroxybenzaldehyd, p.a., Sigma Aldrich, USA
- aceton, p.a., Lach-Ner, ČR
- kyselina pyrohroznová, p.a., Fluka, Švýcarsko
- sotolon, p.a., SAFC supply solutions, Čína
- akrylamid, p.a., Fluka, Švýcarsko

3.2.3 Rozpouštědla

- dichlormethan, p.a., Lach-Ner, ČR
- methanol, p.a., Lach-Ner, ČR
- ethanol, denaturovaný, Moravský lihovar Kojetín a.s., ČR
- chloroform, p.a., Lach-Ner, ČR
- hexan, p.a., Lach-Ner, ČR
- pyridin, p.a., Lach-Ner, ČR

3.2.4 Analyzované vzorky

- bílé víno Veltlínské zelené, r. 2008, ZD Němčičky, ČR
- červené víno Cabernet Moravia, r. 2009, ZD Němčičky, ČR
- vzorky červeného vína Cabernet Moravia s přísady acetaldehydu, acetonu, 4-hydroxybenzaldehydu a kyseliny pyrohroznové, r. 2009, ZD Němčičky, ČR, odběry: 26. 05. 2010, 26. 08. 2010, 08. 11. 2010, 09.03. 2011
- víno Mistelle de Muscat, r. 2004, Jan Stávek, ČR
- červené víno Old Porter, r. 2005, spol. Petr Baruelo SA, Španělsko
- bílé víno Old Porter, r. 2005, spol. Petr Baruelo SA, Španělsko
- destilát, meruňkovice, r. 2006, ČR
- Strážnické brambůrky, Petr Hobža, ČR

3.2.5 Ostatní chemikálie

- kyselina chlorovodíková 35 %, p.a., Lach-Ner, ČR
- kyselina sírová 96 %, p.a., Lach-Ner, ČR
- thiosíran sodný, p.a., Lachema N.P. Brno, ČR
- uhličitan sodný a hydrogenuhličitan sodný, p.a., Lachema N.P. Brno, ČR
- hydroxid sodný, p.a., Lachema N.P. Brno, ČR
- tris(hydroxymethyl)aminometan (TRIS), p.a., Fluka, Švýcarsko
- destilovaná voda

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Karbonylové sloučeniny

Příprava derivatizačního činidla

Roztok činidla byl připraven rozpuštěním asi 0,568 g cysteaminu hydrochloridu ve 20 ml destilované vody. Roztok byl titrován 1-M NaOH na pH 8 a doplněn na objem 25 ml destilovanou vodou.

Analýza vzorků

K derivatizaci bylo použito 0,5 ml vína a 2 ml cysteaminu o pH 8. Po 5 minutovém třepání byla reakční směs ponechána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl roztok extrahován dichlormethanem o objemu 2 ml a odstředěn. Doba extrakce byla nastavena na 5 minut a doba centrifugace na 2 minuty. Spodní organická vrstva byla odebrána, zakonzentrována proudem dusíku na objem 1 ml a analyzována GC-MS. Pro citlivou analýzu v SIM módu byly využity selektivní ionty (Tab. VI).

Pro stanovení přirozené koncentrace karbonylové sloučeniny ve víně byla aplikována metoda standardního přídatku. V případě zjištění koncentrace ve víně obohaceném o příslušnou karbonylovou sloučeninu byla použita metoda kalibrační přímky.

Stanovení výtěžnosti derivatizace

Syntéza 2-fenylthiazolidinu

V 10 ml 50 % methanolického roztoku bylo rozpuštěno 0,68 g cysteaminu hydrochloridu a roztok byl titrován 1-M hydroxidem sodným na pH 7. Benzaldehyd (0,64 g) v 5 ml methanolu byl po kapkách přidán k připravenému roztoku cysteaminu a reakční směs

byla za pokojové teploty míchána po dobu asi 15 hodin. Poté byly za míchání přikapávány 3 ml vodného roztoku uhličitanu draselného (0,43 g/l). Reakční směs byla zředěna 15 ml vody a pak extrahována čtyřmi podíly dichlormethanu o objemu 5 ml, přičemž vždy byla odebírána spodní organická vrstva. Vyextrahované podíly byly spojeny a extrakt byl proudem dusíku odpařen dosucha. Vytvořený produkt se vyznačoval bílými jehlicovitými krystalky. Pomocí bodotávku byla změřena teplota tání.

Zpracování vzorků pro stanovení výtěžnosti derivatizace a extrakce

Výtěžnost extrakce, derivatizace a celkového pracovního postupu byla určena z výsledků analýz následující vzorků.

Vzorek č. 1: K derivatizaci bylo odebráno 50 µl benzaldehydu (2 g/l v 10 % ethanolu), který by dále naředěn vínem na objem 0,5 ml. Následovala derivatizace a extrakce dichlormethanem o objemu 2 ml. Extrakt byl zakoncentrován proudem dusíku na objem 1 ml a analyzován GC-MS.

Vzorek č. 2: 50 µl roztoku 2-fenylthiazolidinu (3,11 g/l v 10 % ethanolu) bylo odpipetováno do vialky a doplněno na objem 1 ml dichlormethanem. Následovala GC-MS analýza.

Vzorek č. 3: 50 µl roztoku 2-fenylthiazolidinu (3,11 g/l v 10 % ethanolu) bylo naředěno vínem na objem 0,5 ml a extrahováno 2 ml dichlormethanu. Extrakt byl zakoncentrován proudem dusíku na objem 1 ml a analyzován GC-MS.

3.3.2 Kyselina pyrohroznová

Příprava derivatizačního činidla

Roztok činidla o-fenylendiaminu (OPDA) byl připraven rozpuštěním asi 0,133 g o-fenylendiaminu ve 100 ml 3-M kyseliny chlorovodíkové.

Analýza vzorků

K derivatizaci bylo použito 0,5 ml vína a 8 ml roztoku činidla OPDA. Po protřepání byla reakční směs inkubována 20 minut při 80 °C. Po ochlazení byl roztok extrahován dvěma

podíly dichlormethanu o objemu 1 ml a odstředěn v centrifuze. Doba extrakce byla zvolena na pět minut a doba centrifugace na dvě minuty. Spojené extrakty (organické fáze) byly odpařeny proudem dusíku téměř do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 60 μ l pyridinu a 60 μ l BSTFA a derivatizován při 80 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení byl objem doplněn na 1 ml hexanem. Pro citlivou analýzu v SIM módu byly využity selektivní ionty 217 m/z a 232 m/z.

Pro stanovení přirozené koncentrace kyseliny pyrohroznové ve víně byla aplikována metoda standardního přídatku. V případě zjištění koncentrace ve víně obohaceném o kyselinu pyrohroznovou byla použita metoda kalibrační přímky.

3.3.3 Sotolon

Příprava derivatizačního činidla

Pro analýzu sotolonu bylo využito derivatizace t-butyldimethylsilylchloridem (TBDMSCl) a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (BSTFA). Roztok činidla TBDMSCl byl připraven rozpuštěním asi 0,080 g TBDMSCl ve 100 μ l pyridinu.

Analýza vzorků

10 ml vína bylo extrahováno dvěma podíly dichlormethanu o objemu 1 ml a roztok byl odstředěn v centrifuze. Doba extrakce byla zvolena na 5 minut a doba centrifugace na 2 minuty. Spojené extrakty (organické fáze) byly odpařeny proudem dusíku téměř do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 60 μ l pyridinu a 60 μ l BSTFA a derivatizován při 80 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení byl objem doplněn na 1 ml hexanem a analyzován GC-MS. Jako alternativa k derivatizačnímu postupu byla zvolena modifikace sotolonu reakcí s TBDMSCl. Odparek byl rozpuštěn v 50 μ l roztoku činidla TBDMSCl a derivatizován při 80 °C po dobu 1 hodiny. Oba způsoby derivatizace byly aplikovány na vzorky vín Mistelle de Muskat (č. 1 - 6) a Old Porter (č. 7 a 8). Pro citlivou analýzu v SIM módu byl zvolen selektivní ion 185 m/z (retenční čas: BSTFA - 11,40 min, TBDMSCl – 14,70 min).

3.3.4 Aminokyseliny

Analýza vzorků

Ke 2 ml vína bylo přidáno 50 μ l ethylchloroformiátu a 100 μ l pyridinu. Roztokem se protřepalo, aby došlo k uvolnění oxidu uhličitého. Poté následoval přídatek 1 ml chloroformu

a 2 ml 1-M roztoku uhličitanu-hydrogenuhlčitanu sodného. Po minutovém třepání byla spodní organická vrstva odebrána do silanizované vialky a podrobena analýze.

Vialky byly silanizovány směsí pyridinu, hexamethylendisilazanu a trimethylchlorsilanu v poměru 5 : 5 : 1 (60 °C, 2 hodiny). Před použitím byly vymyty vodou, ethanolom a na závěr methanolem.

3.3.5 Akrylamid

Analýza vzorků

20 g bramborových lupínek bylo zhomogenizováno a dvakrát extrahováno směsí H₂O - hexan 3 : 2 (v/v) v ultrazvuku. Po extrakci vždy následovalo odstředění v centrifuze. Doba extrakce byla zvolena na 15 minut a doba centrifugace na 5 minut. Celkem bylo získáno 50 ml extraktu (vodné fáze). K 10 ml extraktu byl (po okyselení 2 ml H₂SO₄) přidán asi 1 g KBr a 2 ml 0,1 M KBrO₃. Reakční směs byla ponechána 30 minut ve tmě při teplotě 4 - 5 °C. Nadbytek bromu byl odstraněn Na₂S₂O₃, který byl přikapáván až do odbarvení oranžového roztoku. Poté bylo přidáno 400 µl 10 % triethylaminu. Nakonec následovala extrakce dvěma podíly dichormethanu o objemu 1 ml, zakoncentrování extraktu proudem dusíku na objem 1 ml a GC-MS analýza. Přirozená koncentrace akrylamidu v brambůrkách byla zjištěna metodou standardního přídatku. Pro citlivou analýzu v SIM módu byly využity selektivní ionty 150 a 152 m/z (retenční čas 12,86 min).

3.4 Experimentální podmínky

3.4.1 Analýza derivátů

Veškeré analýzy byly uskutečněny na plynovém chromatografu HP 6890, který byl vybaven hmotnostním spektrometrem Agilent 5973N MSD s kvadrupólovým analyzátozem. Přímé dávkování kapalných vzorků bylo provedeno prostřednictvím autosampleru HP 7683. K analýze byl odebrán 1 µl vzorku a nadávkován na kolonu metodou pulzního dávkování (140 kPa, 24 s) bez děliče toku. Teplota nástřiku byla nastavena na 280 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 0,9 ml/min. Separace byla provedena na kapilární koloně ZB - 5MS o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a s tloušťkou filmu 0,25 µm. Teplotní program byl nastaven na 50 °C - 2 min - 10 °C/min - 300 °C - 15 min. Hmotnostní spektro-

metr využíval pozitivní ionizaci elektronem (70 eV). Sběr dat byl realizován v módech záznamu celkového iontového proudu (TIC) a monitorování selektivních iontů (SIM). Celková doba analýzy byla 42 minut. Obsluha přístroje byla prováděna pomocí softwaru ChemStation G1701D pro GC/MSD.

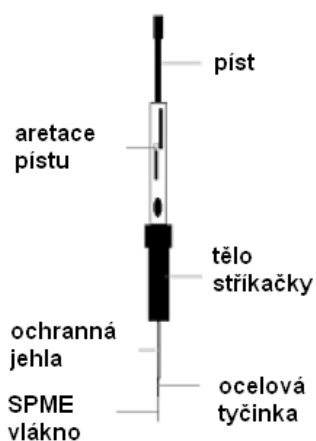


Schéma 1: SPME uspořádání

3.4.2 Analýza s využitím mikroextrakce na tuhé fázi

Techniky mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) bylo využito pro analýzu karbonylových sloučenin ve víně bez předchozí derivatizace. K extrakci bylo odebráno 0,5 ml vína do vialky. Pro ruční vzorkování bylo použito SPME vlákno pokryté vrstvou sorbentu (carboxen/polydimethylsiloxan) o tloušťce 85 μm . Jehlou se zasunutým vláknem bylo propíchnuto septum vialky a posunutím pistu bylo vlákno vysunuto do volného prostoru nad hladinou vzorku, tzv. head-space metoda. Doba expozice byla zvolena na 30 minut a přestup těkavých látek ze vzorku do plynné fáze byl podpořen mícháním. Po ukončení extrakce bylo vlákno opět zataženo do jehly a spolu s ní vytaženo z vialky. Jehla byla zavedena do injektoru plynového chromatografu, kde bylo vlákno vystaveno teplotě 250 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 4 minut. Za těchto podmínek byly analyty z povrchu vlákna tepelně desorbovány a unášeny na kolonu. Zároveň nebyl pozorován přenos analytů (carry over) do další analýzy. Vzorky byly analyzovány pomocí plynového chromatografu HP 6890, který byl vybaven hmotnostním spektrometrem Agilent 5973N MSD. Teplotní program byl nastaven na 50 $^{\circ}\text{C}$ - 2 min - 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 250 $^{\circ}\text{C}$ - 10 min. Celková doba analýzy byla 52 minut. Ostatní podmínky GC-MS analýzy byly dále stejné jako v případě analýzy derivátů.

3.5 Vyhodnocení

Výsledky měření byly vyhodnoceny v prostředí ChemStation, přičemž naměřená spektra byla porovnáována s knihovnou spekter NIST 08 Mass Spectral Library (NIST08/EPA/NIH). Výsledky byly dále zpracovány v tabulkovém procesoru Microsoft Excel. Limity detekce a kvantifikace byly vypočítány pomocí statistického softwaru QC-Expert. V případě určení závislosti plochy thiazolidinových derivátů na pH reakční směsi

byl použit program CurveExpert 1.3 (Daniel Hyams, 1998), který modeluje regresní křivky podle adekvátních matematických vztahů.

V této studii byly kromě retenčního času a plochy píku posuzovány následující chromatografické parametry:

Asymetrii píku charakterizuje asymetrický faktor A_s :

$$A_s = \frac{b}{a} , \quad (1.5.1)$$

kde a a b vyjadřují šířku píku v jeho vzestupné a sestupné části. Je-li $A_s < 1$ je pík frontující, pokud je $A_s > 1$ je pík chvostující. V případě, že $A_s = 1$, vyznačuje se pík symetrickým tvarem. Asymetrie píku se měří nejčastěji v 10 % jeho výšky.

Účinnost chromatografické kolony je vyjádřena bezrozměrnou veličinou, která se nazývá počet teoretických pater:

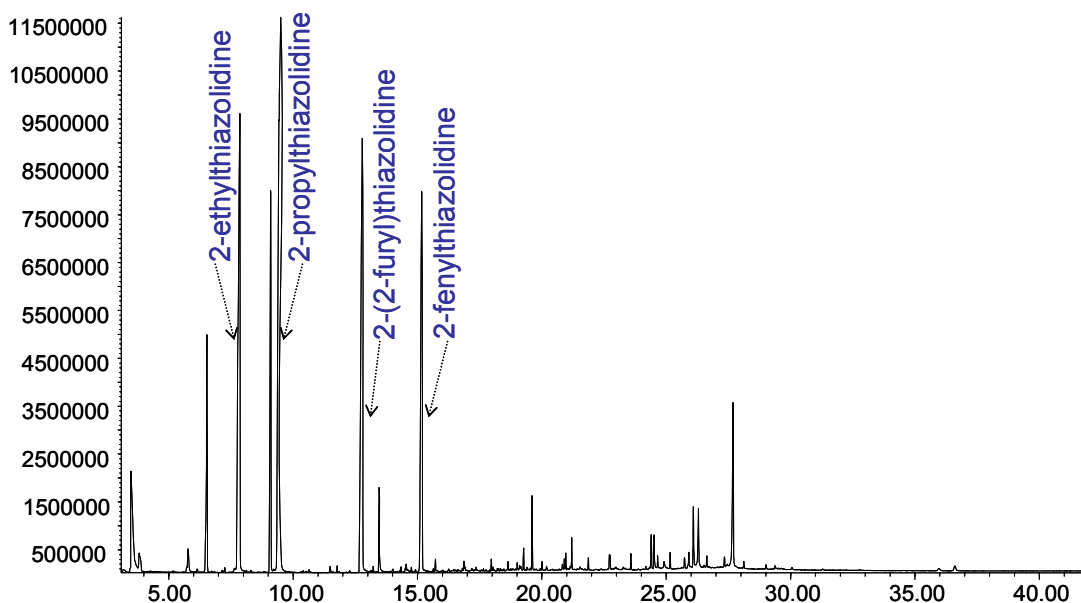
$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 , \quad (1.5.2)$$

kde t_R je retenční čas a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Karbonylové sloučeniny

Analýza nižších aldehydů plynovou chromatografií je bez předchozí derivatizace problematická. V důsledku vysoké těkavosti obvykle dochází k překrytí píků aldehydů s píkem rozpouštědla. Důvody pro derivatizaci aldehydů proto spočívají ve zvýšení molekulové hmotnosti analytu, což dále vede ke zvýšení teploty varu a tedy i retenčního času. Vybraným derivatizačním činidlem, které respektuje požadavky kladené na vlastnosti derivátu, je cysteamin. Cysteamin reaguje s aldehydy za vzniku thiazolidinových derivátů. Derivatizace byla provedena v methanolicém roztoku, obsahujícím butyraldehyd, propionaldehyd, furfural a benzaldehyd (Obr. 45).



Obr. 45: Chromatogram vzorku obsahující směs aldehydů v methanolu (0,0103 mol/l butyraldehyd; 0,0035 mol/l propionaldehyd; 0,0103 mol/l furfural a 0,0083 mol/l benzaldehyd)

Vzorek destilátu a vína byl podroben derivatizaci cysteaminem. Chromatogramy všech derivátů alifatických aldehydů, s výjimkou formaldehydu, jsou charakteristické základním píkem při 88 m/z, který odpovídá deprotonovanému thiazolidinovému kruhu. Deriváty analytů, jejich retenční časy, charakteristické ionty a ionty použité pro kvantifikaci shrnuje Tab. VI.

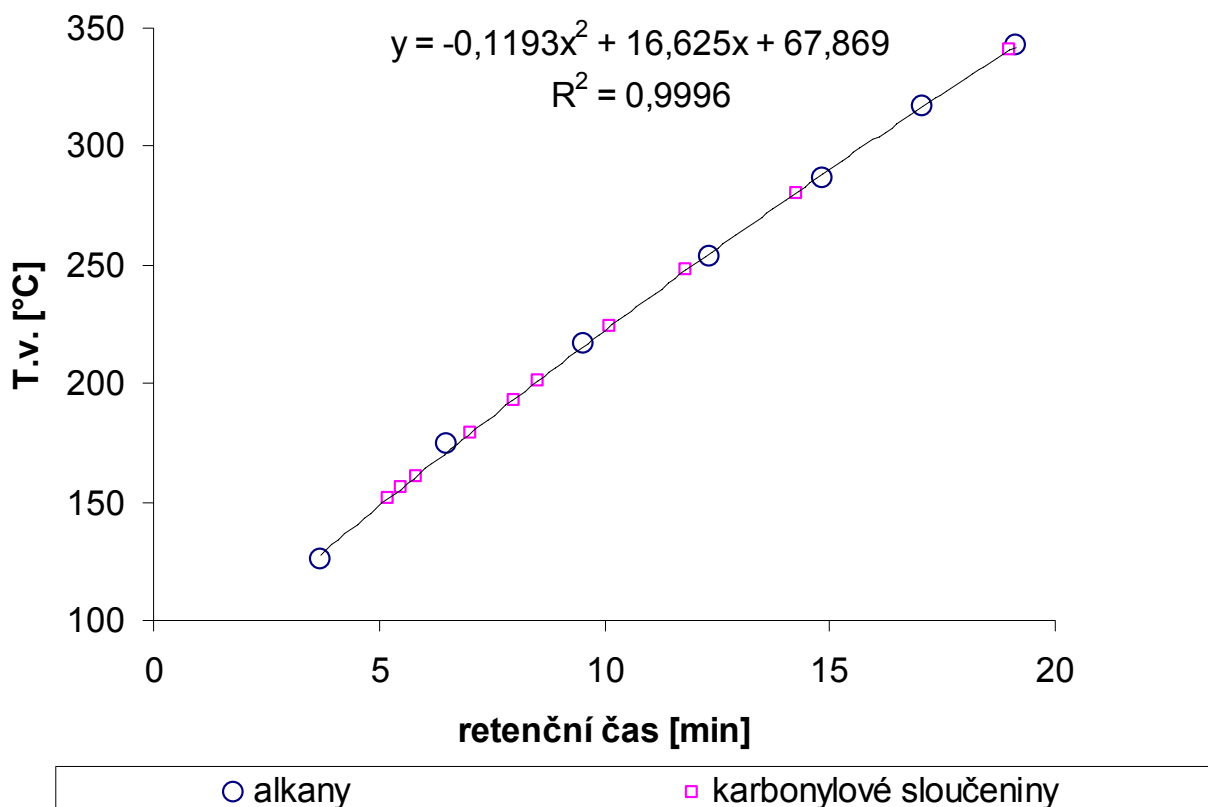
Tab. VI: Retenční časy, charakteristické ionty a ionty použité pro kvantifikaci thiazolidinových derivátů

Analyt	Derivát	t_R [min]	Charakteristické ionty [m/z]	SIM [m/z]
formaldehyd	thiazolidin	5,87	89, 88, 84, 59, 44, 30	89
acetaldehyd	2-methylthiazolidin	6,12	103, 88, 56, 44, 30	103
aceton	2,2-dimethyl- thiazolidin	6,48	117, 102, 84, 70, 58, 42, 30	117
propionaldehyd	2-ethylthiazolidin	7,79	117, 88, 70, 56, 41, 30	117
isobutyraldehyd	2-isopropyl- thiazolidin	8,92	131, 88, 70, 61, 30	131
butyraldehyd	2-propylthiazolidin	9,38	131, 88, 70, 56, 42, 30	131
valeraldehyd	2-butylthiazolidin	10,25	145, 117, 98, 88, 70, 61, 56, 42, 30	145
kapronaldehyd	2-pentylthiazolidin	12,47	159, 112, 103, 88, 70, 56, 41, 30	159
furfural	2-(2-furyl)thiazolidin	12,78	155, 122, 109, 94, 81, 69, 60, 52, 39	155
benzaldehyd	2-fenylthiazolidin	15,16	165, 132, 118, 106, 91, 77, 60, 50, 44, 39, 28	165
4-hydroxy benzaldehyd	2-(4-hydroxy)fenyl- thiazolidin	18,92	181, 179, 133, 119, 107, 77, 60, 39	119

4.1.1 Stanovení teplot varu derivátů

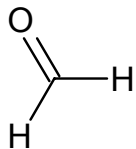
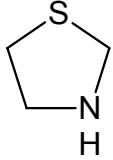
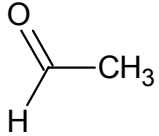
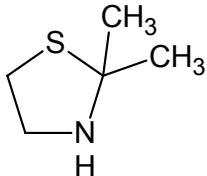
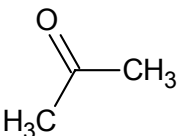
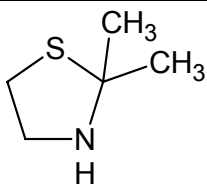
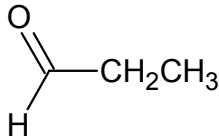
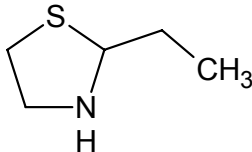
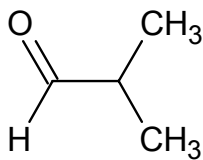
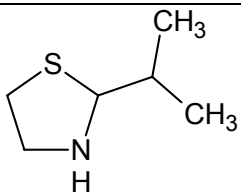
Prostřednictvím plynové chromatografie byly zjištěny teploty varu jednotlivých thiazolidinových derivátů. Pro experiment byla využita skutečnost, že při separaci na nepolární koloně je eluční pořadí dané pořadím posloupnosti teplot varu. Ke směsi

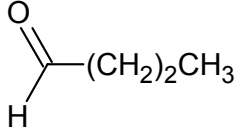
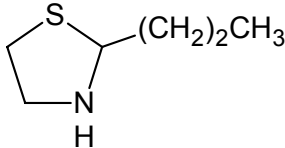
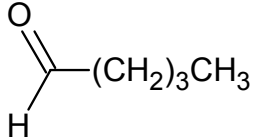
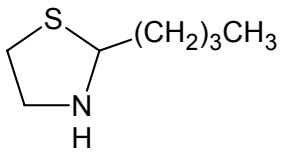
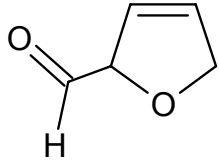
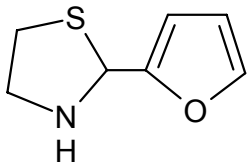
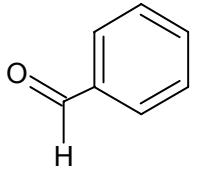
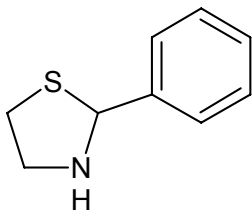
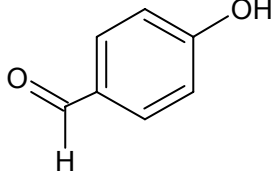
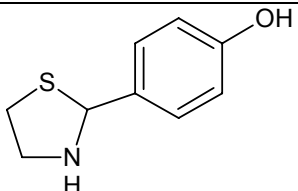
studovaných derivátů, byla přidána směs alkanů (oktan, dekan, dodekan, tetradekan, hexadekan, oktadekan a eikosan), jejichž teploty varu byly známy a byla provedena GC-MS analýza. Z výsledků měření byl sestaven graf závislosti teploty varu na retenčním čase pro použité standardy a neznámé teploty varu derivátů byly vypočítány z rovnice regrese (Obr. 46). Zjištěné teploty varu jsou vedle tabelovaných hodnot shrnuty v Tab. VII. Jelikož jsou tabelované teploty varu karbonylových sloučenin a stanovené teploty varu derivátů ve stejných jednotkách, mohou být hodnoty porovnávány. Bylo tedy ověřeno, že reakcí s cysteaminem jsou tvořeny deriváty s vyšší teplotou varu než je tomu u výchozích látek. Konkrétně u acetaldehydu teplota varu po derivatizaci narostla o 134,85 °C.



Obr. 46: Graf závislosti teplot varu příslušných analytů na retenčním čase

Tab. VII: Struktury, tabelované tepoty varu karbonylových sloučenin a derivátů a změřené teploty varu derivátů [124, 125]

KS / DKS	Strukturní vzorec	Tabelované t.v.	Strukturní vzorec	Tabelované t.v.	Změřené t.v.
	KS	KS [°C]	DKS	DKS [°C/mmHg]	DKS [°C]
formaldehyd / thiazolidin		- 19,3 (roztok)		-	151,40
acetaldehyd / 2-methylthiazolidin		21		37/5	155, 85
aceton / 2,2-dimethylthiazolidin		56		35-38/4	160,74
propionaldehyd / 2-ethylthiazolidin		46-50		48/5	178, 70
isobutyraldehyd / 2-isopropylthiazolidin		63		51-52/4	193, 23

butyraldehyd / 2-propylthiazolidin		75		58-60/4	201,15
valeraldehyd / 2-butylthiazolidin		102-103		77-79/4	223,90
furfural / 2-(2-furyl)thiazolidin		162		t.t. [°C]: 51,5-58,5	247, 57
benzaldehyd/ 2-fenylthiazolidin		178-179		t.t. [°C]: 109-110	280, 55
4-hydroxybenzaldehyd / 2-(4-hydroxy)- fenylthiazolidin		310-311		-	340, 80

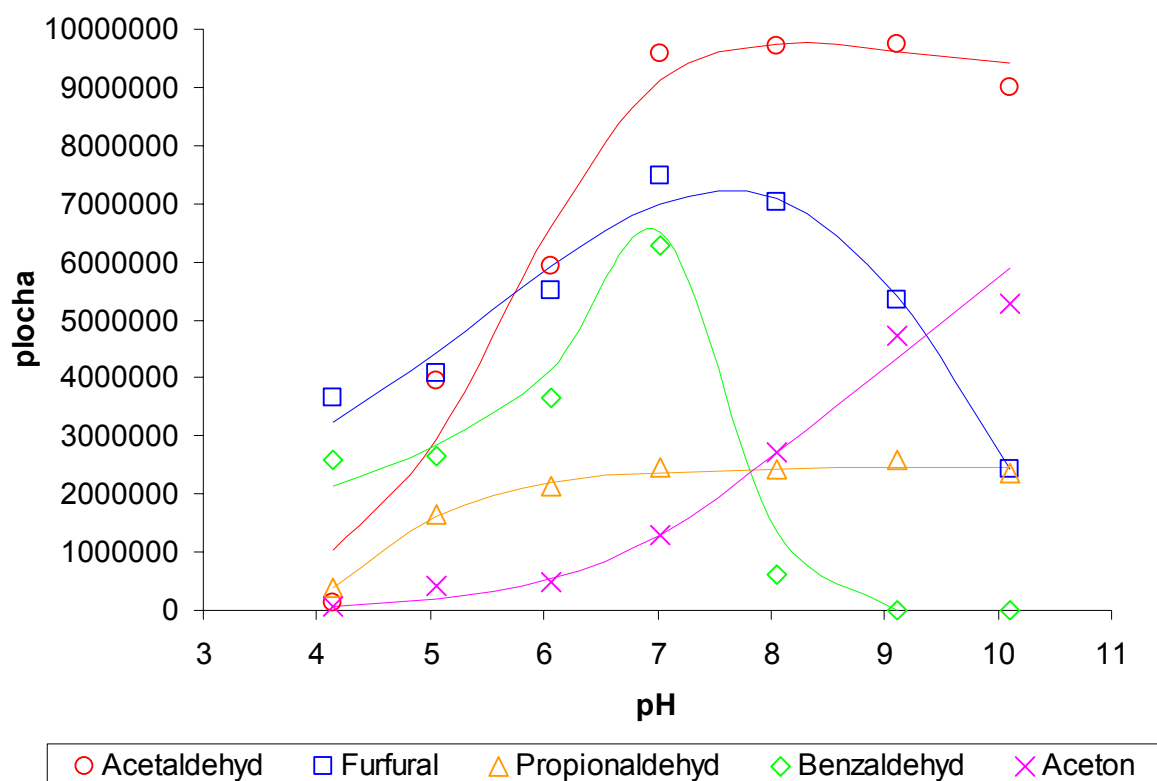
KS – karbonylová sloučenina

DKS – derivát karbonylové sloučeniny

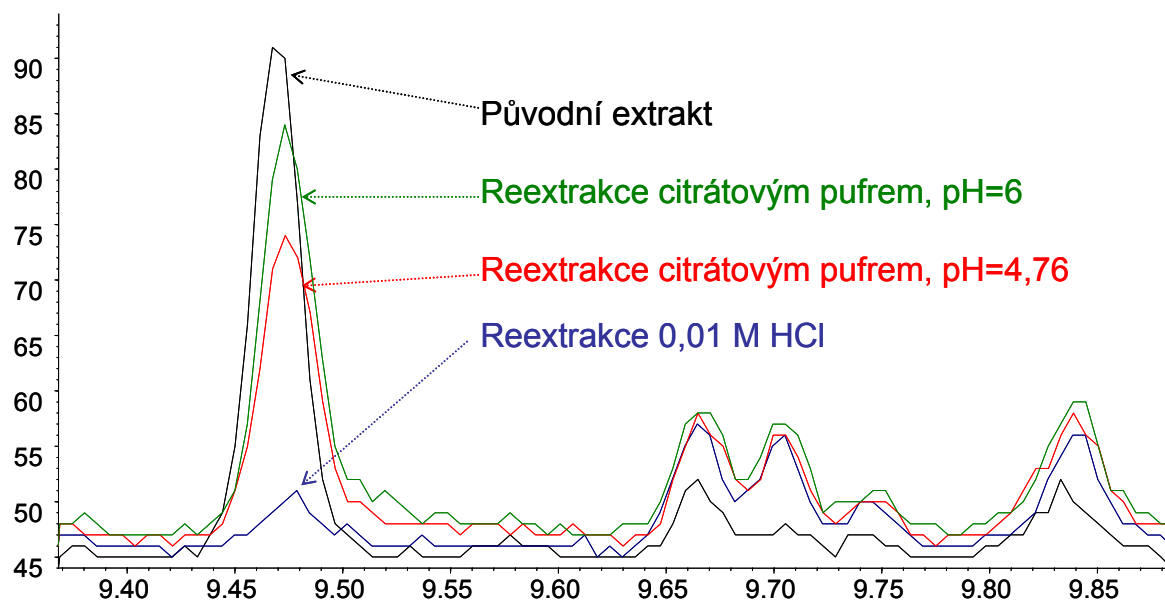
4.1.2 Vliv pH prostředí na tvorbu derivátů

Byl studován vliv pH prostředí na tvorbu thiazolidinových derivátů. Při obvyklém způsobu stanovení se k vínu přidalo činidlo cysteaminu o pH 8 a výsledné pH roztoku bylo 7,3 - 7,7. Pro posouzení vlivu pH byl ovšem k vínu přidán nealkalizovaný roztok cysteaminu hydrochloridu. Pomocí 1 a 4-M NaOH bylo pH roztoku upraveno na 4 - 10, přičemž objemové změny byly zanedbány. Dále byl roztok zpracován obvyklým postupem. Z výsledků bylo zjištěno, že zatímco alifatické aldehydy dosahovaly maximální plochy píku nad pH 7, největších výtěžků u aromatických aldehydů bylo dosaženo při pH 7 a při dalším zvyšování pH výtěžky klesaly. Aceton, jakožto zástupce ketonů, poskytoval maximální plochu píku při nejvyšším měřeném pH (Obr. 47).

Dále byl studován vliv pH prostředí na extrakci thiazolidinových derivátů. Derivatizace v destilátu probíhala za přítomnosti báze tris(hydroxymethyl)aminomethanu (TRIS) a vytvořené deriváty byly extrahovány dichlormethanem. Extrakt byl rozdělen na 4 podíly. První podíl extraktu byl podroben GC-MS analýze. Zbylé tři podíly byly reextrahovány citrátovým pufrem (pH 4,76 a 6), popřípadě 0,01-M kyselinou chlorovodíkovou (pH ~ 2), a dichlormethanová fáze byla analyzovaná GC-MS. Sledovaly se plochy píků derivátů v původním extraktu a po reextrakci (Obr. 48). Závěrem lze shrnout, že pH významně ovlivňuje nejen tvorbu derivátů, ale i jejich extrakci. V případě aromatických aldehydů je třeba dodržet optimální pH reakční směsi. V případě alifatických aldehydů je nutné upravit pH reakční směsi nad 7, kdy je zajištěn kvantitativní průběh derivatizace a extrakce. Metoda je vhodná také pro některé ketony, u níž je ovšem výhodnější pracovat při vyšším pH.



Obr. 47: Vliv pH prostředí na tvorbu derivátů vybraných karbonylových sloučenin



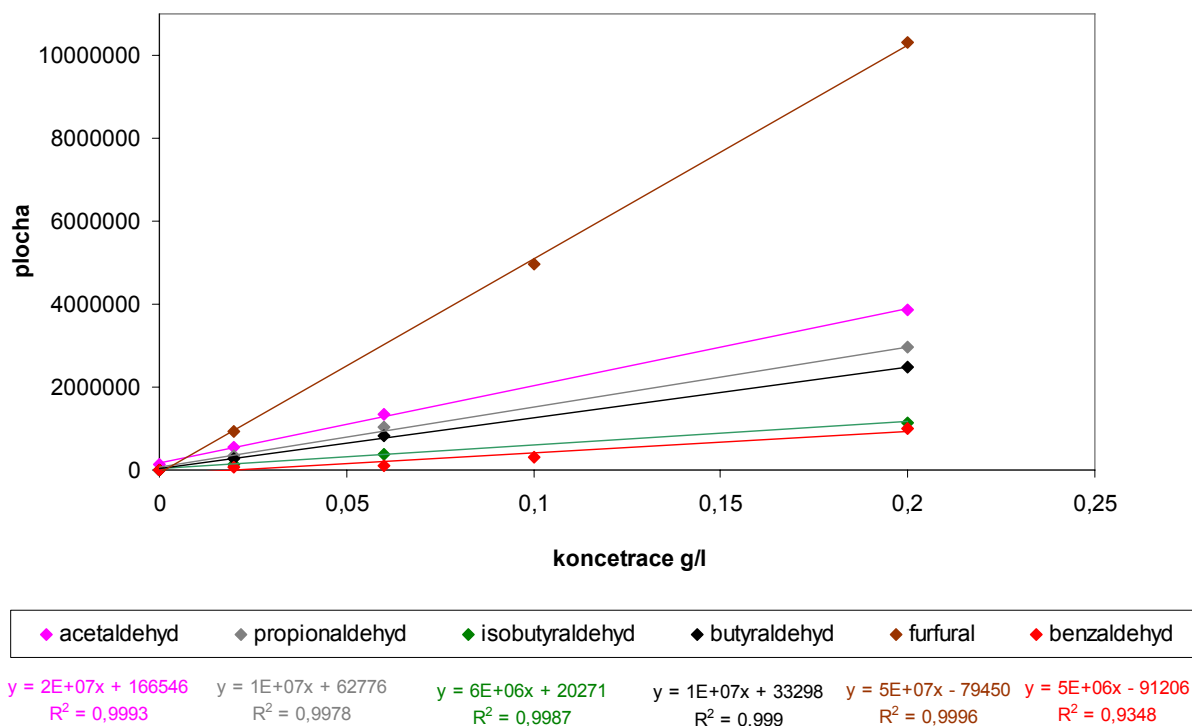
Obr. 48: Chromatogram reextrakce propylthiazolidinu z dichlormethanu citrátovým pufrem a HCl

4.1.3 Stanovení výtěžnosti derivatizace a extrakce

Výtěžek extrakce i derivatizace byl stanoven pro benzaldehyd. Za účelem zjištění výtěžku derivatizace byl připraven 2-fenylthiazolidin. Derivát se vyznačoval bílými jehlicovitými krystalky. Pro posouzení čistoty preparátu byla změřena jeho teplota tání 108 – 109 °C, která byla v souladu s tabelovanou hodnotou (108,3 - 108,8 °C). Výtěžky byly zjištěny ze srovnání odezvy standardu 2-fenylthiazolidinu a odezvy standardu 2-fenylthiazolidinu po extrakci z vína, respektive odezvy 2-fenylthiazolidinu po derivatizaci a extrakci. Byl stanoven výtěžek extrakce 99,97 % a výtěžek celkového postupu (derivatizace a extrakce) 79,68 %.

4.1.4 Linearita

Pro deriváty acetaldehydu, propionaldehydu, isobutyraldehydu, butyraldehydu, furfuralu a benzaldehydu (Obr. 49) byla testována linearita kalibrační závislosti v rozsahu koncentrací 0 - 0,2 g/l a byly vypočítány limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), (Tab. VIII).



Obr. 49: Kalibrační závislosti derivátů vybraných aldehydů

Tab. VIII: Limity detekce a kvantifikace derivátů aldehydů

Aldehyd	Derivát aldehydu	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
acetaldehyd	2-methylthiazolidin	4,010	5,873
propionaldehyd	2-etyhlthiazolidin	7,027	10,130
isobutyraldehyd	2-isopropylthiazolodin	3,644	5,346
butyraldehyd	2-propylthiazolidin	6,972	10,040
furfural	2-(2-furyl)thiazolidin	15,360	22,430
benzaldehyd	2-fenylthiazolidin	91,330	114,600

4.1.5 Stanovení karbonylových sloučenin ve víně

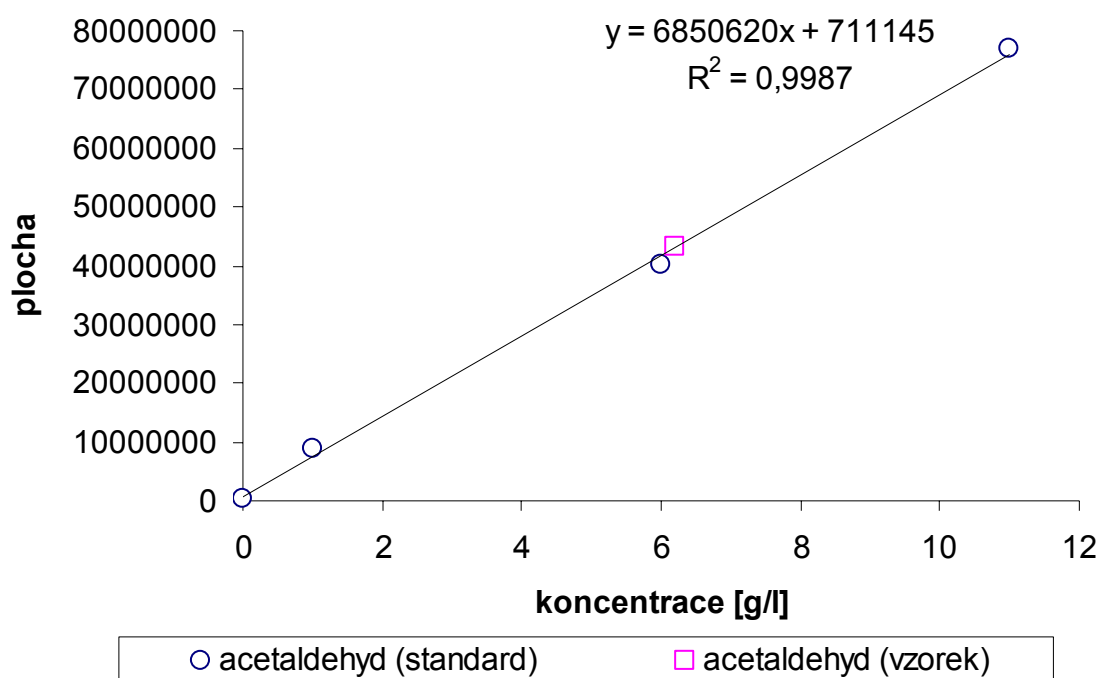
Stanovení acetaldehydu ve víně

Acetaldehyd je nejvýznamnější aldehyd obsažený ve víně, jelikož zaujímá kolem 90 % z celkového množství aldehydů. Je předposledním meziproduktem fermentace. Acetaldehyd, vznikající nikoli při kvasném procesu, nýbrž zpětně z alkoholu (např. probubláváním vína kyslíkem), se podílí na stabilizaci barvy a barevného odstínu červených vín při procesu zrání. Barva mladých červených vín je tvořena především monomerními anthokyaniny, které jsou nestabilní. Acetaldehyd vytváří produkty polymerizace mezi anthokyaniny a taniny. Polymerní barviva, která se mohou takto vytvářet, jsou odolnější ke změnám pH vína a změnám obsahu oxidu siřičitého. [126, 127] Cílem studie bylo navrhnout metodu pro stanovení acetaldehydu ve vzorcích červeného vína, přičemž výsledky analýzy byly uplatněny ve studiu anthokyaninů. Odběr vzorků pro experiment, byl proveden ve čtyřech intervalech a sledovala se změna koncentrace v závislosti na čase. V souvislosti se studiem anthokyaninů byly ve vzorcích vína rovněž sledovány koncentrace 4-hydroxybenzaldehydu, acetonu a kyseliny pyrohroznové, viz dále.

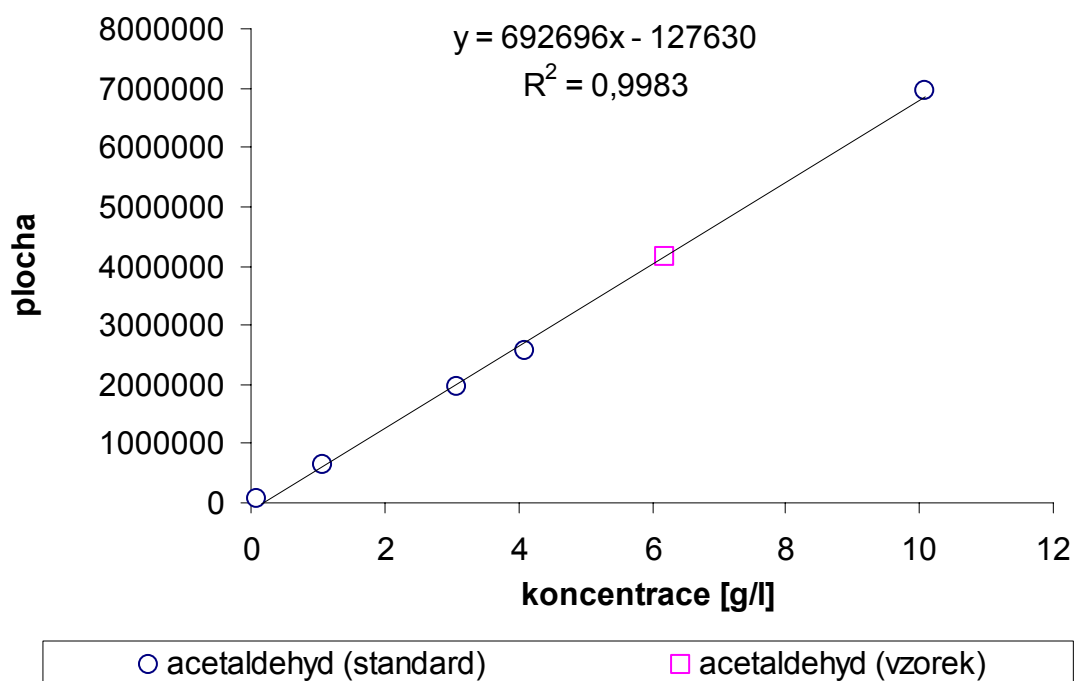
Pro stanovení přirozené koncentrace acetaldehydu v použitém víně byla aplikována metoda standardního přídatku. Kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním acetaldehydu v původním víně v rozmezí koncentrací 0 - 11 g/l. Dále následovala derivatizace cysteaminem a analýza GC-MS. Pro kvantifikaci 2-methylthiazolidinu byl zvolen molekulární ion 103 m/z (retenční čas 6,12 min). Kalibrační křivka vykazovala lineární průběh (Obr. 50). V původním víně byla nalezena přirozená koncentrace acetaldehydu 0,1038 g/l. Pro zjištění

koncentrace ve víně obohaceném o acetaldehyd byla použita metoda kalibrační přímky a nalezená koncentrace činila 6,194 g/l.

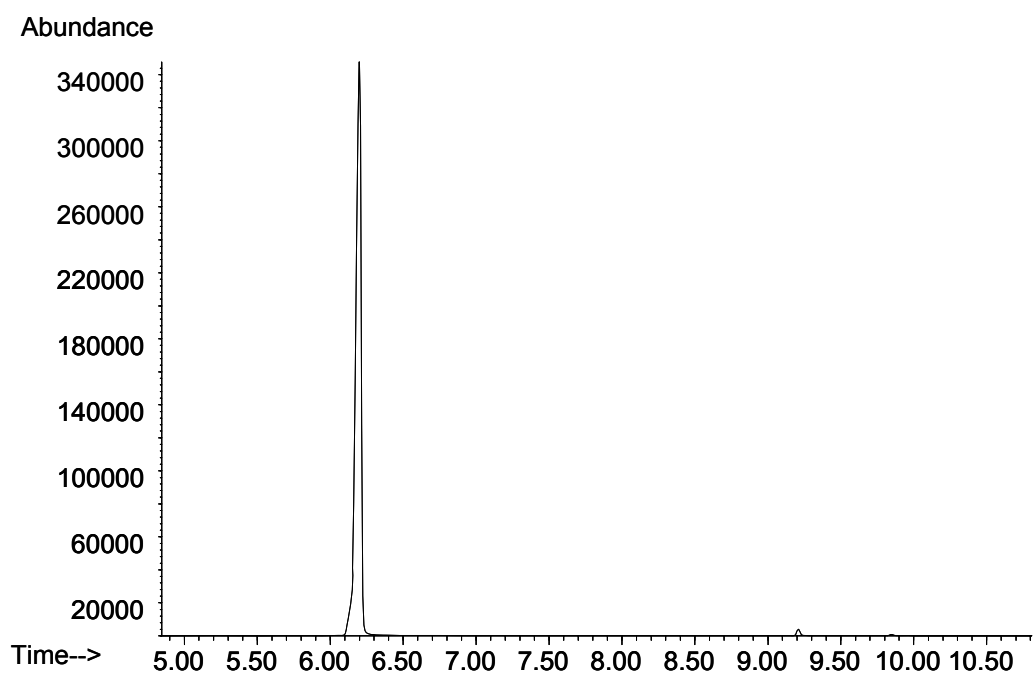
Karbonylové sloučeniny lze bez předchozí derivatizace analyzovat s použitím SPME. Mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) je jednoduchá a účinná sorpčně-desorpční technika zakoncentrování analytů, která oproti extrakci kapalina-kapalina nevyžaduje přítomnost organického rozpouštědla. V oblasti analýzy nízkomolekulárních karbonylových sloučenin představuje SPME alternativní přístup k zamezení překryvu píku analytu s píkem rozpouštědla. Pro extrakci bylo použito extrakční vlákno carboxen/polydimethylsiloxan 85 μm . Vzorky byly analyzovány head-space technikou, při níž bylo vlákno umístěno do volného prostoru nad hladinou vzorku. Pro stanovení acetaldehydu ve vzorku vína byla opět aplikovaná metoda více standardních přídavek. Kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním acetaldehydu v původním víně v rozmezí koncentrací 0 - 10 g/l Pro kvantifikaci acetaldehydu byl zvolen ion 29 m/z, který vznikl odštěpením methylové skupiny (retenční čas 1,34 min). Kalibrační křivka vykazoval lineární průběh (Obr. 51). V původním víně byla nalezena přirozená koncentrace acetaldehydu $9,213 \cdot 10^{-2}$ g/l. Zjištěná koncentrace acetaldehydu ve vzorku byla 6,189 g /l.



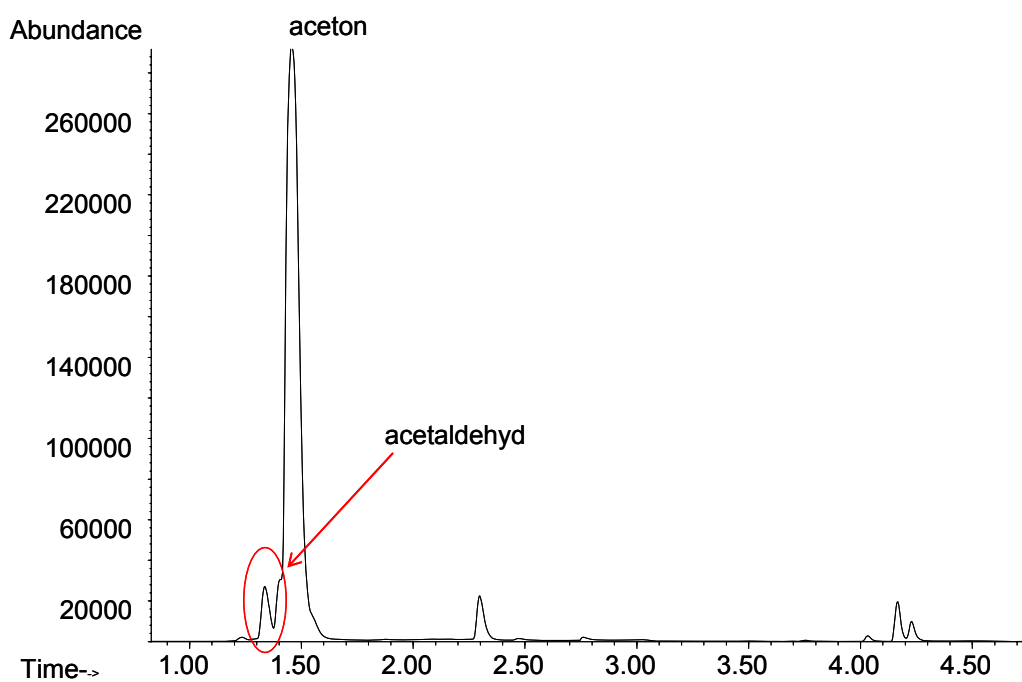
Obr. 50: Kalibrační závislosti pro stanovení acetaldehydu ve vzorku s užitím derivatizace



Obr. 51: Kalibrační závislost pro stanovení acetaldehydu ve vzorku s užitím SPME bez předchozí derivatizace



Obr. 52: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ion 103 m/z (2-methylthiazolidin); 1 g/l ve víně (derivatizace)



Obr. 53: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ion 29 m/z (acetaldehyd); 1 g/l ve víně (SPME)

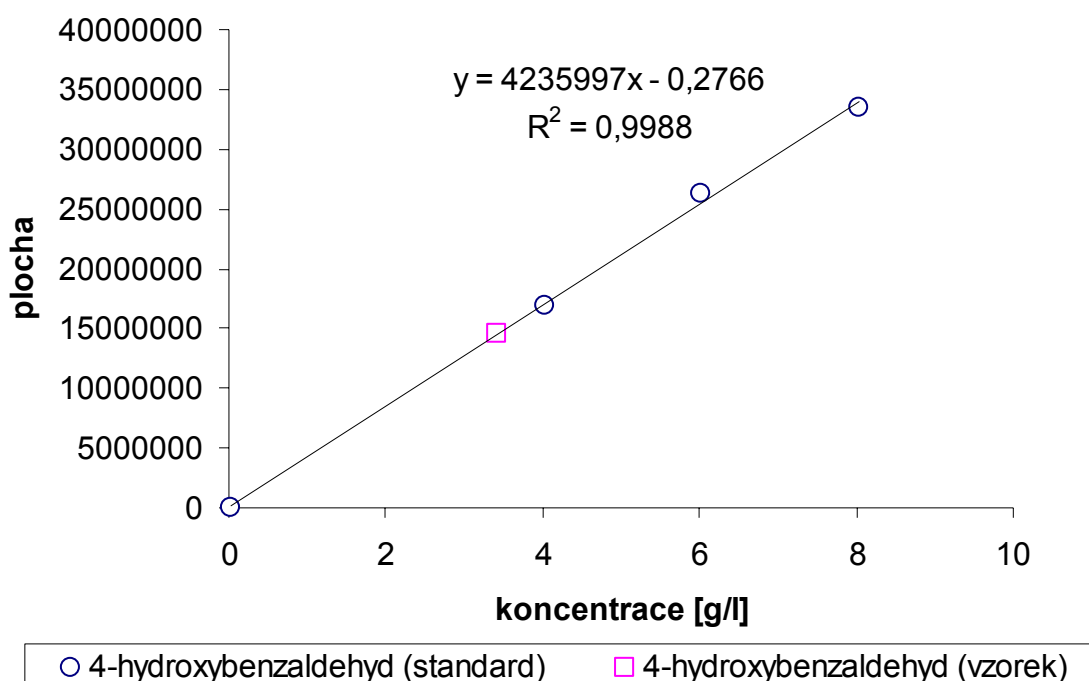
Z chromatografického záznamu derivatizovaného a nederivatizovaného acetaldehydu (Obr. 52, 53) byly vyjádřeny vybrané chromatografické parametry, které shrnuje Tab. IX, kde As = asymetrický faktor, N = počet teoretických pater. Z výsledků lze vyvodit závěr, že derivatizací je dosaženo jak vyšší účinnosti separace, tak lepší symetrie píku.

Tab. IX: Chromatografické parametry acetaldehydu a jeho derivátu

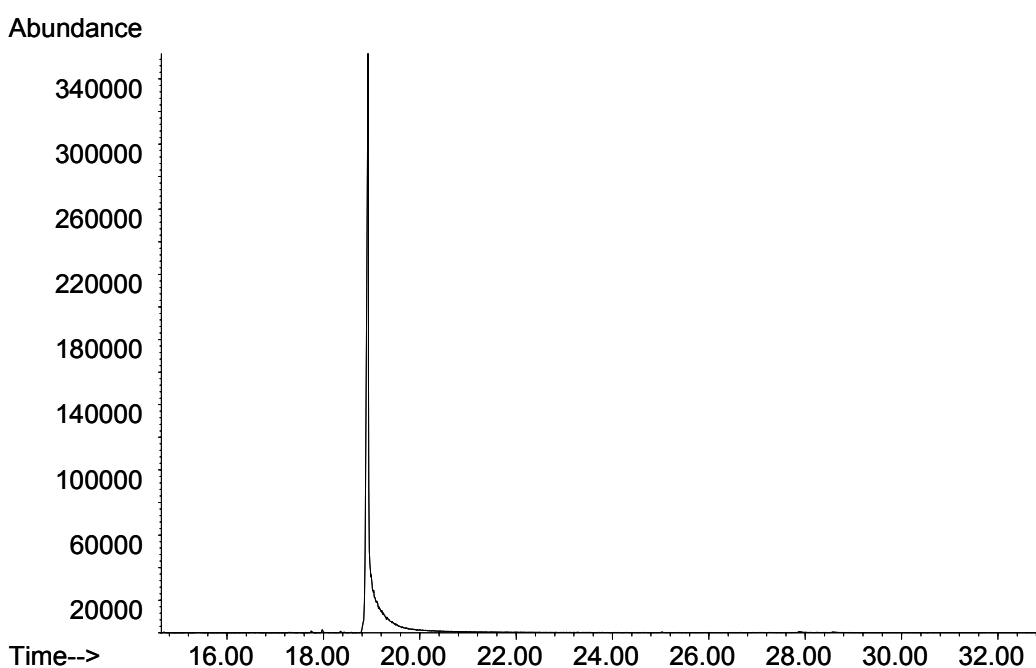
Analyt / Typ analýzy	As (popis)	N
acetaldehyd / SPME bez derivatizace	1,79 (chvostující pík)	6189
acetaldehyd / derivatizace cysteaminem	1,00 (symetrický pík)	120646

Stanovení 4-hydroxybenzaldehydu ve víně

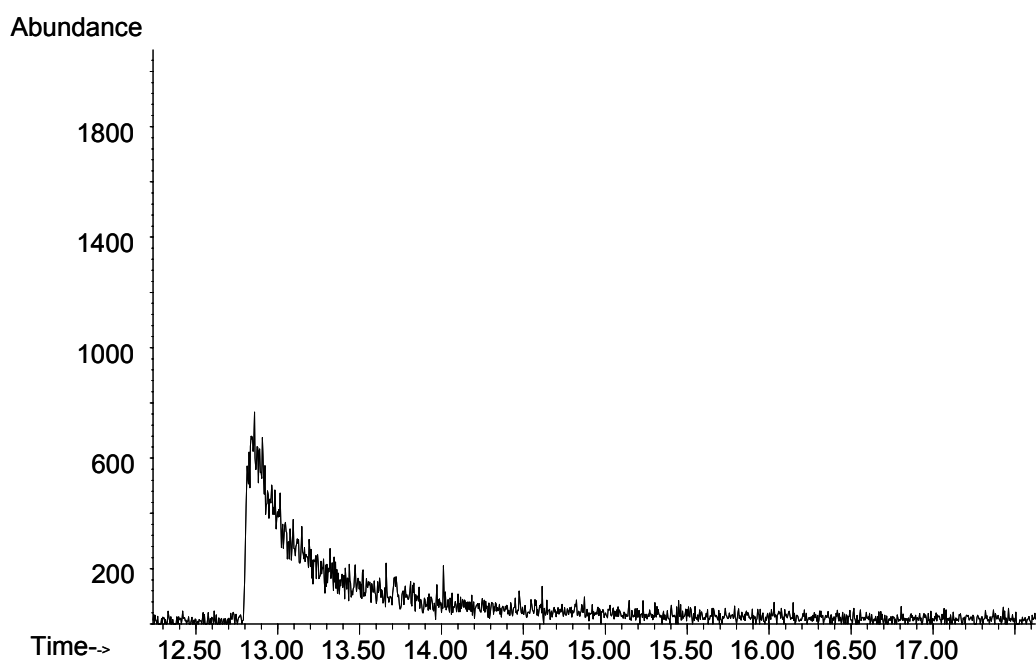
4-hydroxybenzaldehyd reaguje s cysteaminem za vzniku 2-(4-hydroxyfenyl)-thiazolidinu. Pro stanovení přirozené koncentrace 4-hydroxybenzaldehydu v použitém víně byla aplikována metoda standardního přídávku. Kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním 4-hydroxybenzaldehydu v původním víně v rozmezí koncentrací 0 – 8 g/l. Dále následovala derivatizace cysteaminem a analýza GC-MS. Pro kvantifikaci 2-(4-hydroxy)-fenylthiazolidinu byl zvolen molekulární ion 119 m/z (retenční čas 18,92 min). Kalibrační křivka vykazovala lineární průběh (Obr. 54). V původním víně byla nalezena přirozená koncentrace 4-hydroxybenzaldehydu $3,041 \cdot 10^{-2}$ g/l. Pro zjištění koncentrace ve víně obohaceném o hydroxybenzaldehyd byla použita metoda kalibrační přímky a nalezená koncentrace činila 3,429 g/l. Jako srovnávací metoda byla stejně jako v případě acetaldehydu zvolena SPME bez předchozí derivatizace.



Obr. 54: Kalibrační závislost pro stanovení 4-hydroxybenzaldehydu ve vzorku



Obr. 55: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ion 119 m/z (2-fenyl-(4-hydroxy)-thiazolidin); 4 g/l ve víně (derivatizace)



Obr. 56: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ion 122 m/z (4-hydroxybenzaldehyd); 4 g/l ve víně (SPME)

Z chromatografického záznamu derivatizovaného a nederivatizovaného 4-hydroxybenzaldehydu (Obr. 55, 56) byly vyjádřeny vybrané chromatografické parametry, které shrnuje Tab. X. Bylo zjištěno, že v důsledku silně chvostujícího píku je analýza 4-hydroxybenzaldehydu pomocí SPME nevhodná. Také bylo ověřeno, že derivatizací 4-hydroxybenzaldehydu se mnohonásobně zvýší účinnost chromatografické separace, odstup signálu od šumu a citlivost stanovení.

Tab. X: Chromatografické parametry 4-hydroxybenzaldehydu a jeho derivátu

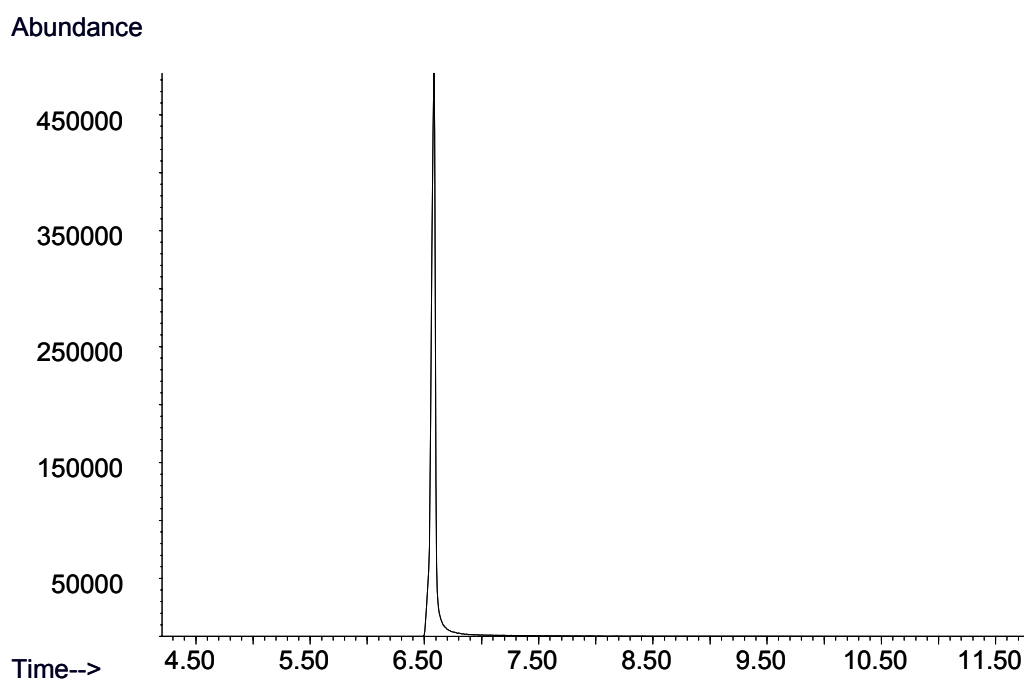
Analyt / Typ analýzy	As (popis)	N
4-hydroxybenzaldehyd / SPME bez derivatizace	10,50 (chvostující pík)	15769
4-hydroxybenzaldehyd / derivatizace cysteaminem	0,43 (frontující pík)	382629

4-hydroxybenzaldehyd obsahuje ve své struktuře hydroxyskupinu, která snadno podléhá silylaci. V úvahu tedy přichází i dvoukroková derivatizace zahrnující kondenzaci 4-hydroxy-

benzaldehydu s cysteaminem a následně silanizaci 2-(4-hydroxyfenyl)thiazolidinu silylačním činidlem (např. BSTFA). Nicméně experiment již v této studii nebyl realizován.

Stanovení acetonu ve víně

Pro stanovení přirozené koncentrace acetonu v použitém víně byla aplikována metoda standardního přídatku. Roztok standardu o koncentraci asi 4 g/l byl připraven rozpuštěním acetonu v původním víně. Dále následovala derivatizace cysteaminem a analýza GC-MS. Pro derivát acetonu byl zvolen molekulární ion 117 m/z (retenční čas 6,60 min). V původním víně byla nalezena přirozená koncentrace acetonu $6,663 \cdot 10^{-3}$ g/l. Pro zjištění koncentrace ve víně obohaceném o aceton byla použita metoda kalibrační přímky a nalezená koncentrace činila 2,625 g/l.



Obr. 57: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ion 117 m/z (2,2-dimethylthiazolidin); 4 g/l ve víně

Z chromatografického záznamu derivatizovaného a nederivatizovaného acetonu (Obr. 53 a 57) byly vyjádřeny vybrané chromatografické parametry, které shrnuje Tab. XI. Z výsledků lze vyvodit závěr, že zatímco symetrie píku byla lepší u postupu využívající SPME, vyššího počtu teoretických pater bylo naopak dosaženo v případě derivatizace.

Tab. XI: Chromatografické parametry acetonu a jeho derivátu

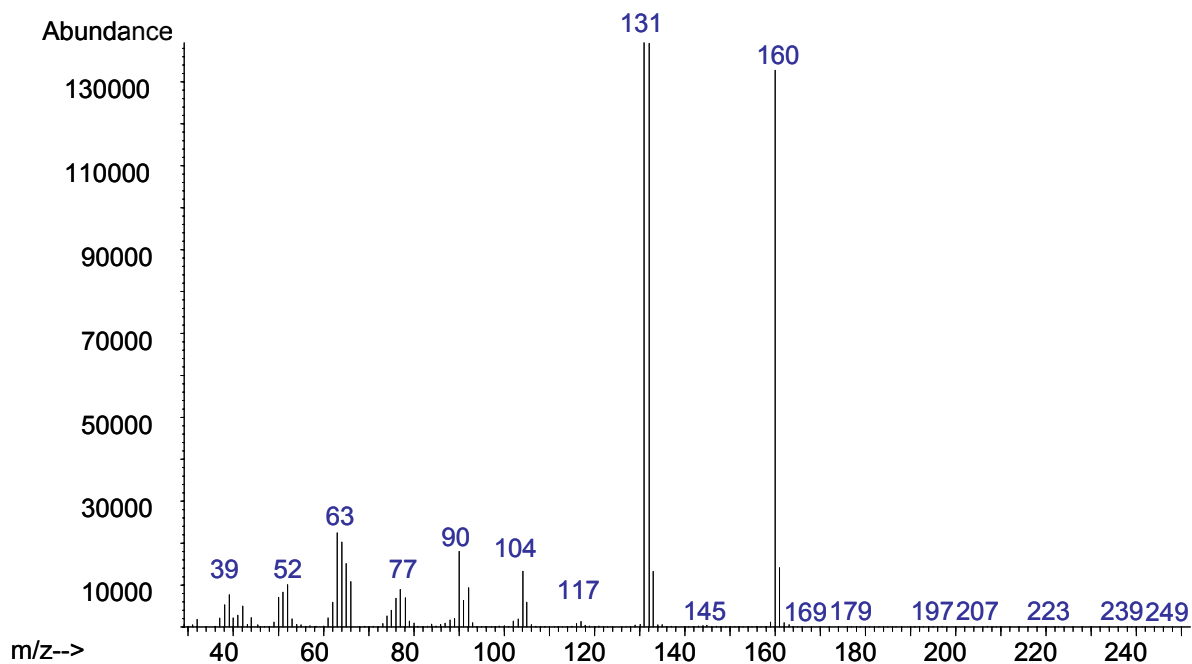
Analyt / Typ analýzy	As (popis)	N
aceton / SPME bez derivatizace	2,07 (chvostující pík)	3640
aceton / derivatizace cysteaminem	0,24 (frontující pík)	66993

4.2 Kyselina pyrohroznová

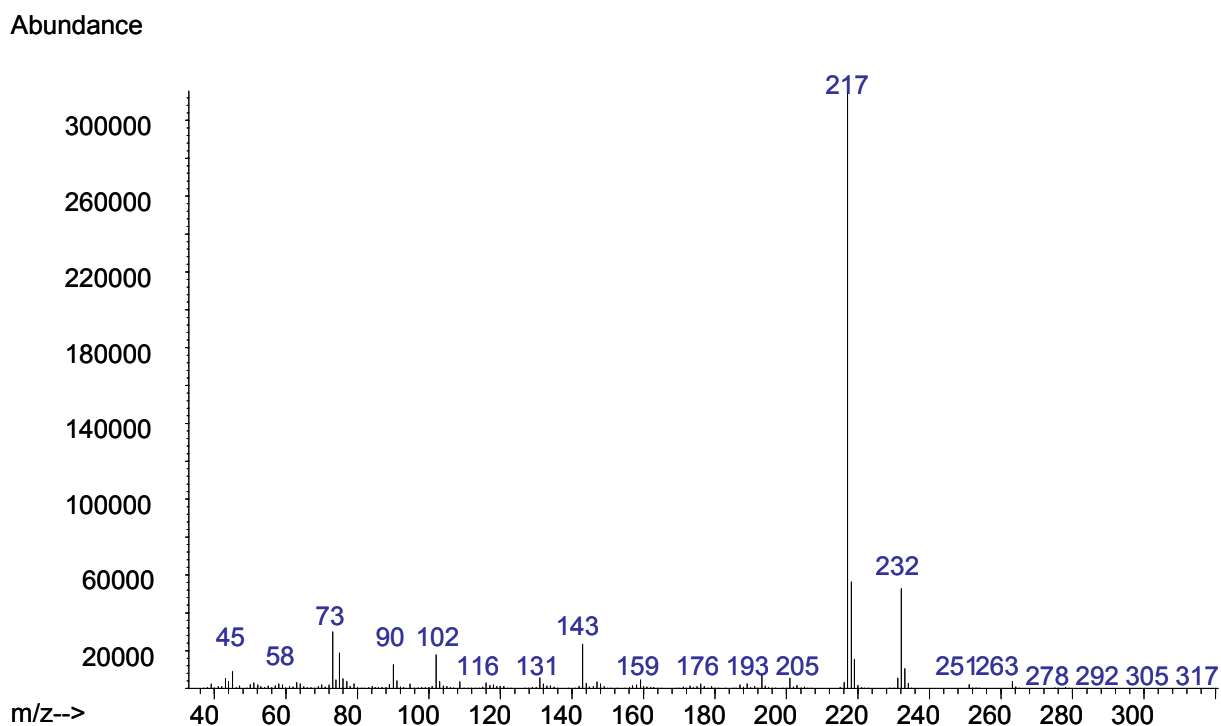
Kyselinu pyrohroznovou ve formě soli lze separovat kapilární elektroforézou, popřípadě izotachoforézou. [128, 129] Aplikace v kapalinové chromatografii jsou vzhledem k horší detekci omezené, avšak použitím fluorescenční detekce lze citlivost zvýšit. Jelikož kyselina pyrohroznová je látka, jež přirozeně nefluoreskuje, je třeba ji vhodnou derivatizací převést na látku fluoreskující. K tomuto účelu se používá činidlo o-fenylendiamin (OPDA), které reakcí s ketokyselinou poskytuje 2-hydroxychinoxalin. [130, 131] Činidlo OPDA se s oblibou využívá i při derivatizaci ketokyselin v plynové chromatografii. Výhody derivatizace těchto látek spočívají v potlačení tautomerie, zvýšení stability struktury, a v důsledku toho k dosažení lepších separačních a detekčních vlastností.

Derivatizace kyseliny pyrohroznové

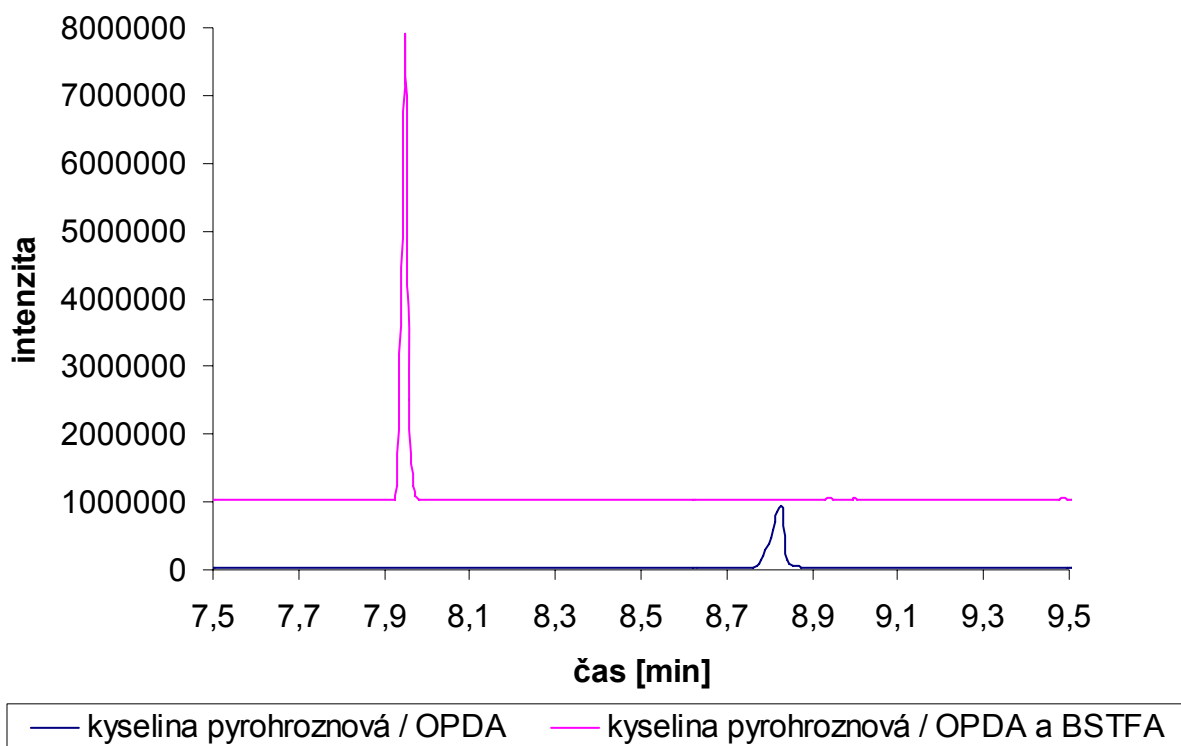
Kyselina pyrohroznová byla ve vzorku vína podrobena kondenzaci s o-fenylendiaminem za vzniku 2-hydroxy-3-methylchinoxalinu (Obr. 58). Hydroxyskupina chinoxalinového derivátu byla poté silanizována činidlem BSTFA (Obr. 59). Pro kvantifikaci derivátu byl zvolen molekulární ion 232 m/z a ion 217 m/z, odpovídající ztrátě methylové skupiny. Z chromatogramu (Obr. 60) si lze dále povšimnout, že OPDA derivát kyseliny pyrohroznové je eluován v čase 8,83 min, zatímco kyselina modifikovaná činidly OPDA a BSTFA v čase 7,95 min. Z toho vyplývá, že dvoukrokovou derivatizací je dosaženo vyšší těkavosti analytu.



Obr. 58: Hmotnostní spektrum kyseliny pyrohroznové po derivatizaci OPDA



Obr. 59: Hmotnostní spektrum kyseliny pyrohroznové po derivatizaci OPDA a BSTFA



Obr. 60: Chromatogram kyseliny pyrohroznové po derivatizaci OPDA a po derivatizaci OPDA - BSTFA

Pro oba způsoby derivatizace byly z chromatogramů vyjádřeny vybrané chromatografické parametry, které shrnuje Tab. XII. Z výsledků lze vyvodit závěr, že dvoukrokovou derivatizací je dosaženo jak vyšší symetrie píku, tak vyšší účinnosti separace.

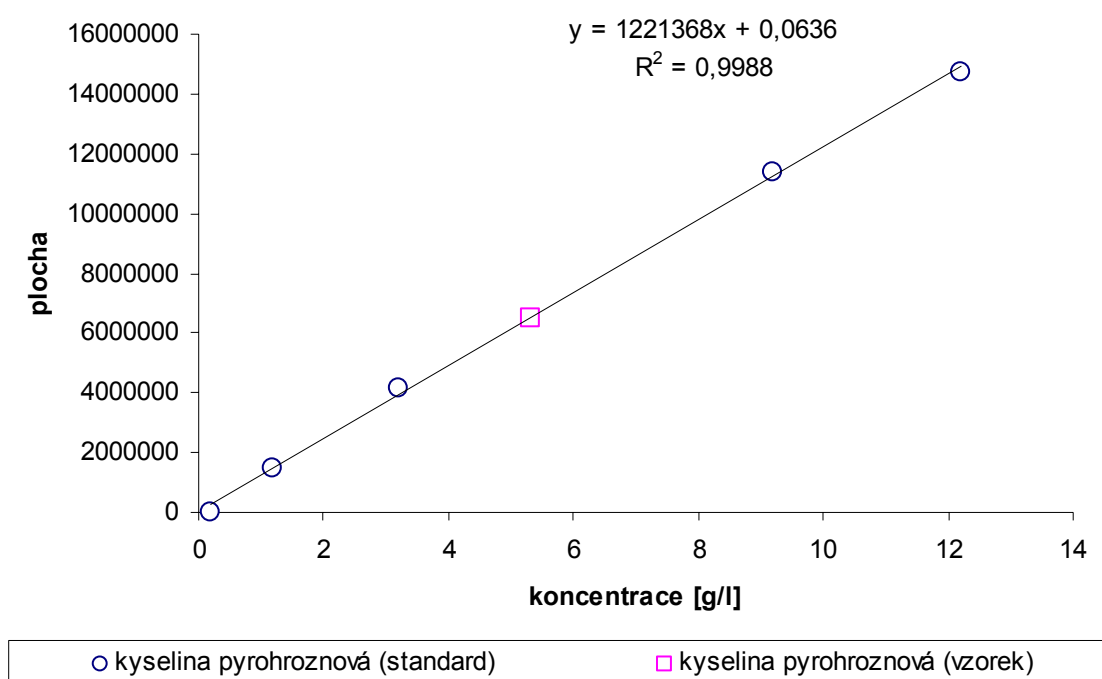
Tab. XII: Chromatografické parametry kyseliny pyrohroznové derivatizované OPDA a OPDA-BSTFA

Způsob derivatizace	As (popis)	N
OPDA	0,42 (frontující pík)	298929
OPDA a BSTFA	0,94 (frontující pík)	1367053

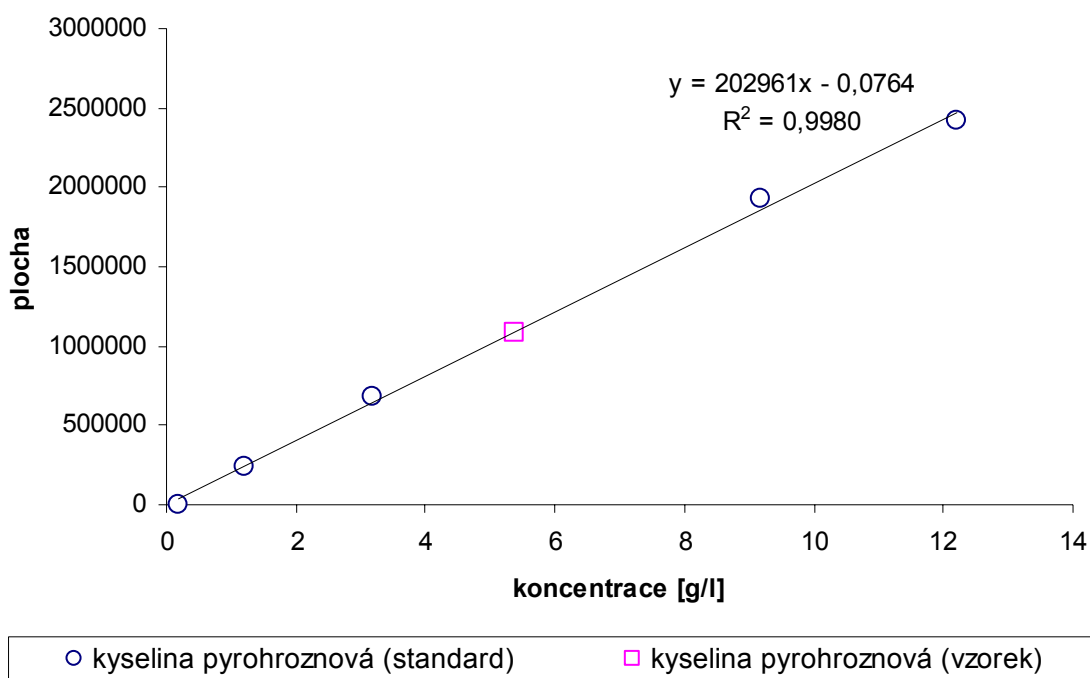
Analýza vzorků

Pro stanovení přirozené koncentrace kyseliny pyrohroznové v použitém víně byla aplikována metoda standardního přídávku. Kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním

kyseliny pyrohroznové v původním víně v rozmezí koncentrací 0 - 12 g/l. Dále následovala derivatizace OPDA-BSTFA a analýza GC-MS. Pro kvantifikaci kyseliny pyrohroznové byl zvolen molekulární ion 232 a ion 217 m/z (retenční čas 7,95 min). Kalibrační křivka vykazovala lineární průběh (Obr. 61 a 62). V původním víně byla nalezena přirozená koncentrace kyseliny pyrohroznové 0,1972 g/l pro ion 217 m/z a 0,1942 g/l pro ion 232 m/z. Pro zjištění koncentrace ve víně obohaceném o kyselinu pyrohroznovou byla použita metoda kalibrační přímky a nalezená koncentrace činila 5,328 g/l pro ion 217 m/z a 5,366 g/l pro ion 232 m/z.



Obr. 61: Kalibrační závislost pro stanovení kyseliny pyrohroznové ve vzorku; 217 m/z



Obr. 62: Kalibrační závislost pro stanovení kyseliny pyrohroznové ve vzorku; 232 m/z

Metodou standardního přídávku byla s využitím derivatizace stanovena koncentrace acetaldehydu, 4-hydroxybenzaldehydu, acetonu a kyseliny pyrohroznové ve vzorcích vína Cabernet Moravia při dalších odběrech. Zjištěné koncentrace zahrnuje Tab. XIII.

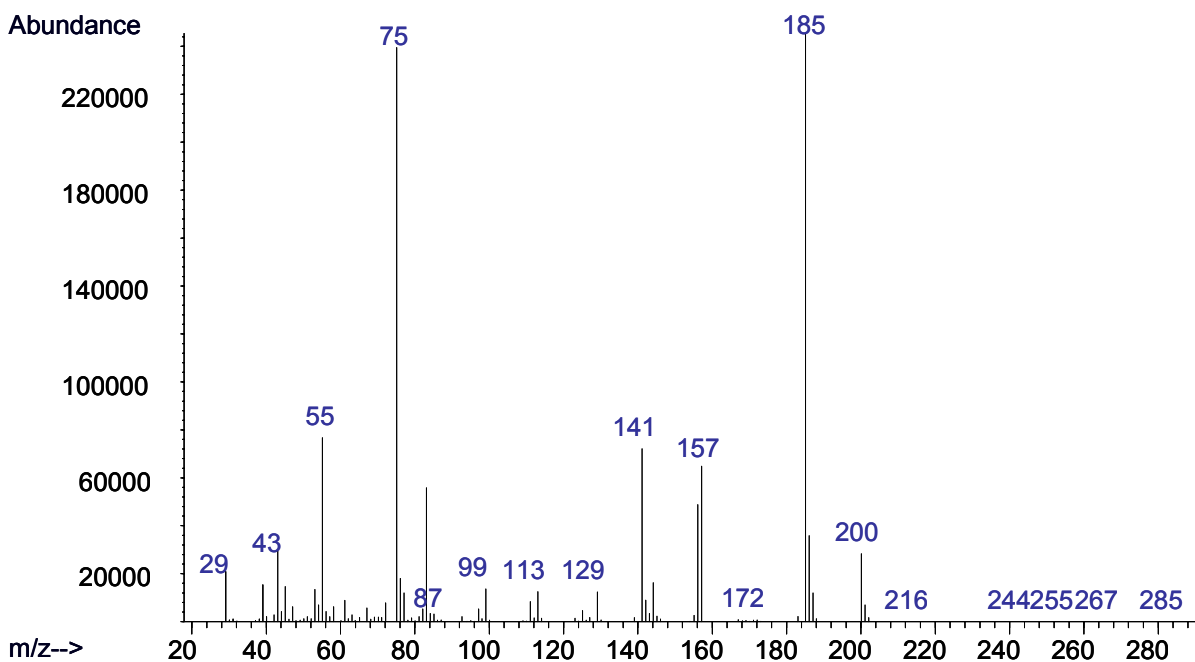
Tab. XIII: Zjištěné koncentrace analytů ve vzorcích vína metodou standardního přídávku.

analyt	koncentrace [g/l]			
	květen 2010	srpen 2010	listopad 2010	březen 2011
acetaldehyd	6,189	5,226	5,299	3,755
4-hydroxybenzaldehyd	3,429	3,648	3,868	2,933
kyselina pyrohroznová	5,347	4,922	3,369	2,940
aceton	-	4,034	3,447	2,625

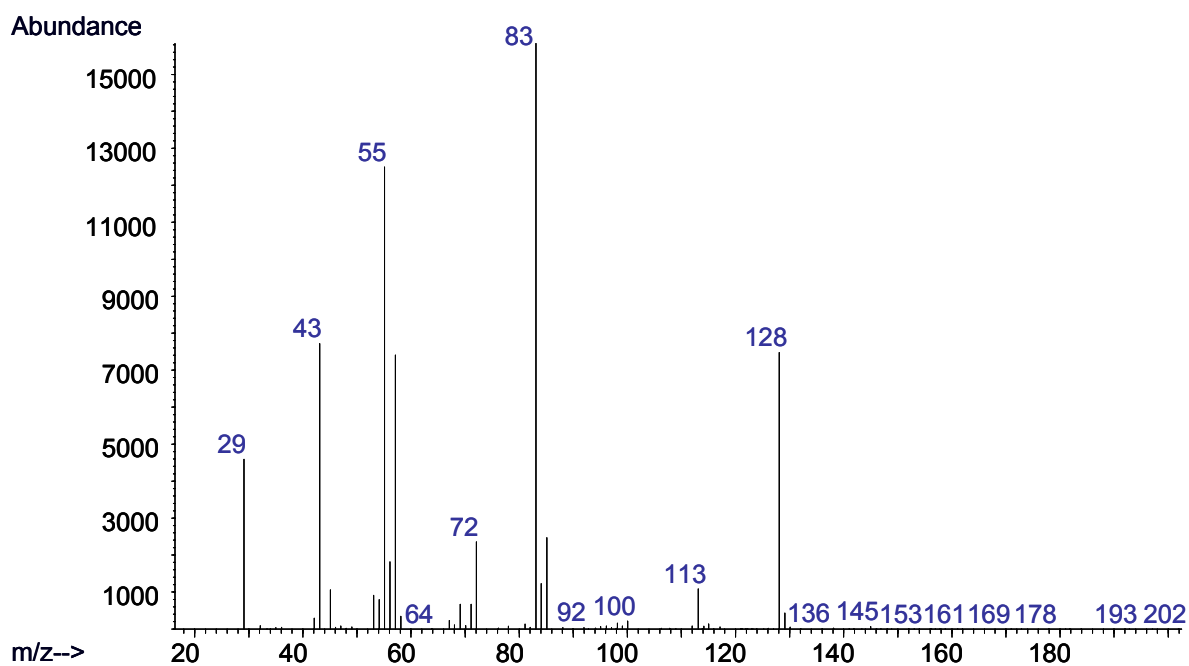
4.3 Sotolon

Výskyt sotolonu ve víně byl poprvé zaznamenán ve „flor sherry“ v roce 1976. [132] Posléze byl analyzován i ve víně Jura, Tokajském, Portském, ve fortifikovaném víně Madeira a víně infikovaném plísní šedou, tzv. Botrytické víno. Mnoho autorů podotklo, že právě sotolon může přispívat k typické vůni, charakterizující staré víno. [133] Sotolon bývá nejčastěji analyzován plynovou chromatografií bez předchozí derivatizace, kdy se využívá metoda přímého nástřiku nebo metoda založená na SPME. Dalším přístupem k analýze sotolonu je kapalinová chromatografie.

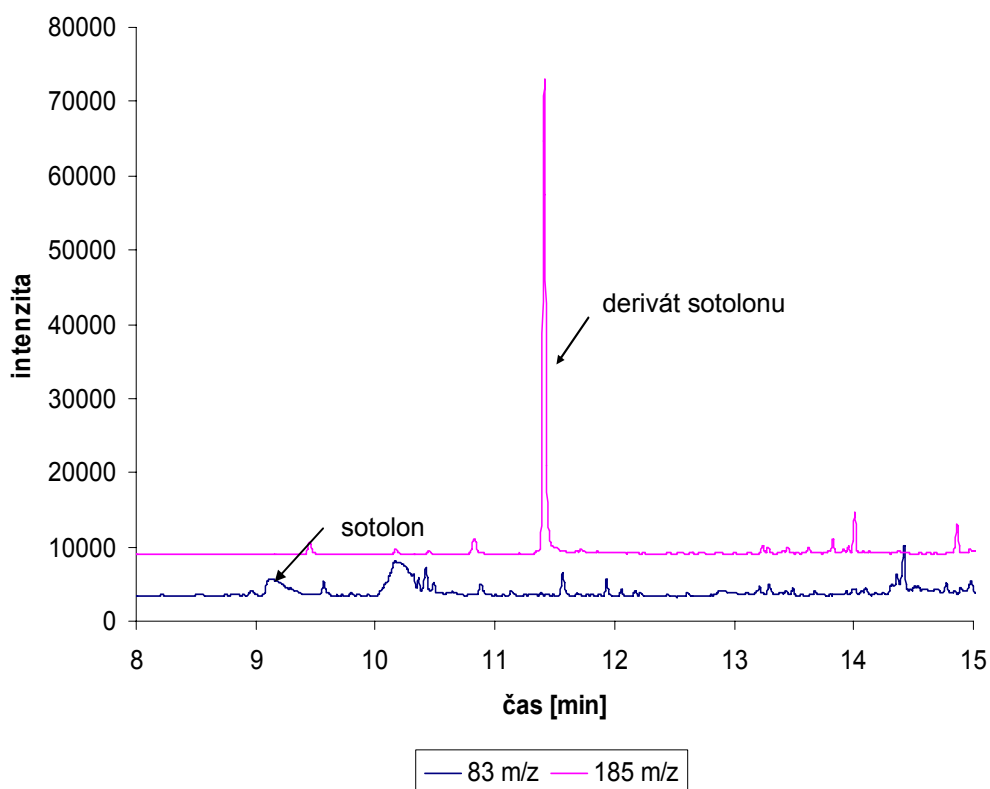
Tato studie je zaměřena na GC analýzu sotolonu po předchozí derivatizaci. Sotolon je lakton obsahující ve své struktuře hydroxylovou skupinu, která snadno podléhá silylaci. Jako derivatizační činidlo byl zvolen BSTFA. Výhody reakce s BSTFA spočívají v jednoduchosti a rychlosti. Pro kvantifikaci sotolonu (Obr. 63) byl zvolen ion 83 m/z (retenční čas 9,10 min) a pro kvantifikaci derivatizovaného sotolonu (Obr. 64) ion 185 m/z (retenční čas 11,40 min).



Obr. 63: Hmotnostní spektrum sotolonu po derivatizaci BSTFA



Obr. 64: Hmotnostní spektrum sotolonu bez derivatizace



Obr. 65: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ion 83 m/z (sotolon) a 185 m/z (BSTFA derivát sotolonu); 1 mg/l ve víně

Z chromatografického záznamu derivatizovaného a nederivatizovaného sotolonu (Obr. 65) byly vyjádřeny vybrané chromatografické parametry, které shrnuje Tab. XIV. Z výsledků lze vyvodit závěr, že derivatizací je dosaženo mnohonásobně vyšší symetrie píku a vyšší účinnosti chromatografické separace, než v případě přímého nástřiku.

Tab. XIV: Počet teoretických pater sotolonu a jeho derivátu

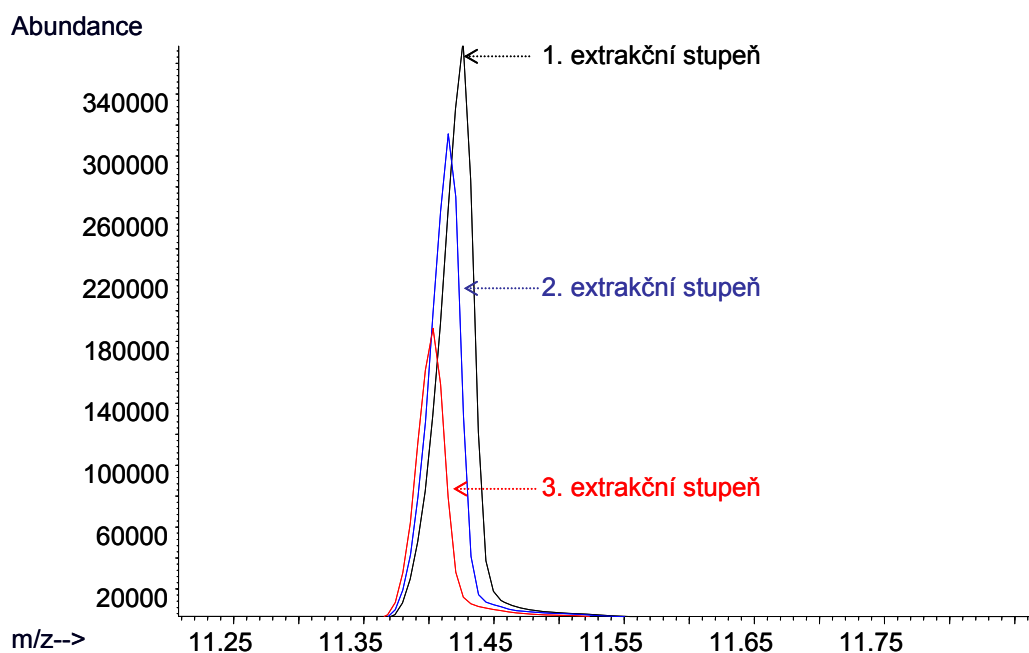
Analyt / typ analýzy	As (popis)	N
Sotolon / přímý nástřik	9,00 (chvostující pík)	11021
Sotolon / derivatizace - BSTFA	0,75 (frontující pík)	860459

Dále byl sledován vliv derivatizace na detekční limity. Odstup signálu (S) od šumu (N) byl stanoven pro sotolon (0,1 mg/l) z analýzy přímého nástřiku a z analýzy po derivatizaci. Měření bylo provedeno v SIM módu. Zjištěný poměr S/N byl pro sotolon 3 a pro derivát sotolonu 230. Poměr S/N byl tedy v případě derivátu 70 krát vyšší. Z výsledků lze shrnout, že derivatizací je dosaženo vyšší citlivosti stanovení než v případě přímého nástřiku.

4.3.1 Návratnost extrakce

V souvislosti s derivatizací sotolonu, byla sledována návratnost extrakce pracovního postupu, který zahrnoval extrakci sotolonu z vína dvěma podíly dichlormethanu o objemu 1 ml. Dále následovala derivatizace a analýza GC-MS. Zbylý objem vína (po oddělení dichlormethanové fáze) byl extrahován opět dvěma podíly dichlormethanu a dále se pokračovalo stejně jako v předchozím kroku - postup se opakoval celkem 3x (Obr. 66). Vypočítaná návratnost prvního extrakčního stupně (tzn. po opakované extrakci dvěma podíly rozpouštědla) byla pouze 21,73 %. Nízká hodnota může být důsledkem malé účinnosti extrakce, případně ztrátou relativně těkavého derivátu sotolonu při odpařování. Návratnost druhého extrakčního stupně byla 30,32 %. Možný důvod, proč se návratnost těchto dvou extrakčních stupňů liší, spočívá v tom, že při první extrakci bylo ve víně obsaženo mnoho balastních látek a schopnost dichlormethanu solvatovat sotolon byla nižší než v případě druhého extrakčního stupně. Dalším důvodem mohou být konkurence sotolonu s jinou látkou

o rozpouštědlo. Bylo tedy zjištěno, že opakovanou extrakcí (dvakrát dvěma podíly rozpouštědla) se návratnost významně zvýší (52,05 %).



Obr. 66: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ion 185 m/z (BSTFA derivát sotolonu); pro 1., 2. a 3. extrakční stupeň

4.3.2 Analýza sotolonu ve víně

Při umělém zrychlování zrání fortifikovaných vín byl prokázán zvyšující se obsah sotolonu. [134] V roce 2004 byla provedena studie, dokazující, že vyšší koncentrace sotolonu se nacházejí ve vínech s vyšším obsahem zbytkového cukru. [135] Z tohoto důvodu bylo pro reálnou analýzu sotolonu zvoleno likérové víno Mistelle de Muscat, popřípadě vína portského typu, která jsou charakteristická vysokým obsahem zbytkového cukru. Vína byla po různou dobu vystavena různým skladovacím podmínkám a teplotám:

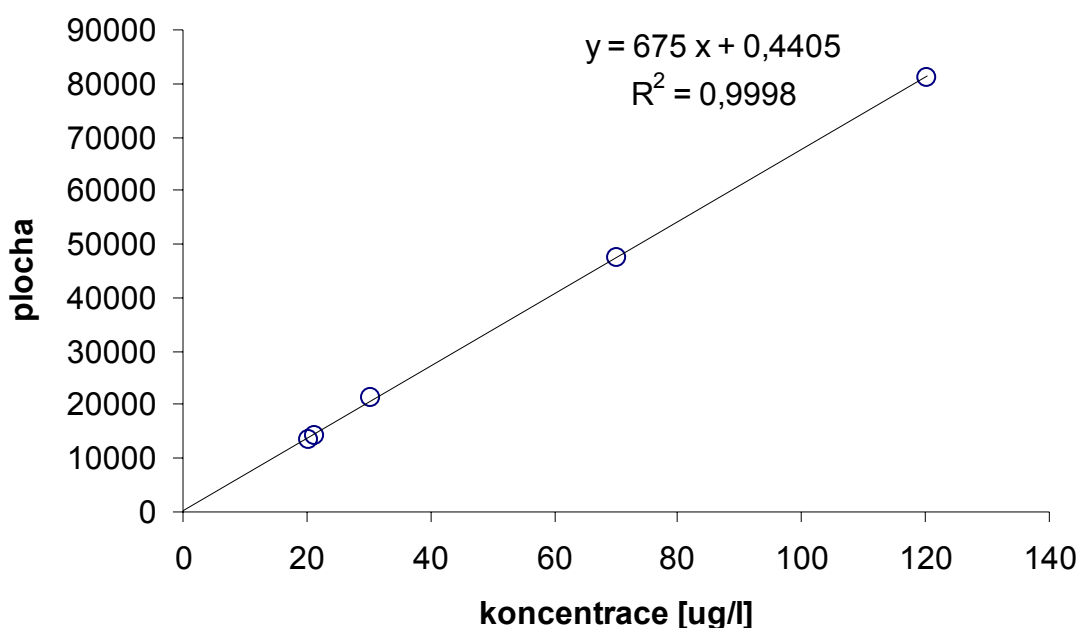
Vzorky 1-6: Mistelle de Muscat, r. 2004, J. Stávek, ČR

Vzorek 7: červené víno Old Porter, r. 2005, spol. Petr Baruelo SA, Španělsko

Vzorek 8: bílé víno Old Porter, r. 2005, spol. Petr Baruelo SA, Španělsko

Derivatizace činidlem BSTFA byla využita při analýze sotolonu v osmi vzorcích vína Mistelle de Muscat a Old Porter. Pro stanovení přirozené koncentrace sotolonu v použitém víně byla aplikována metoda standardního přídatku. Kalibrační standardy byly připraveny

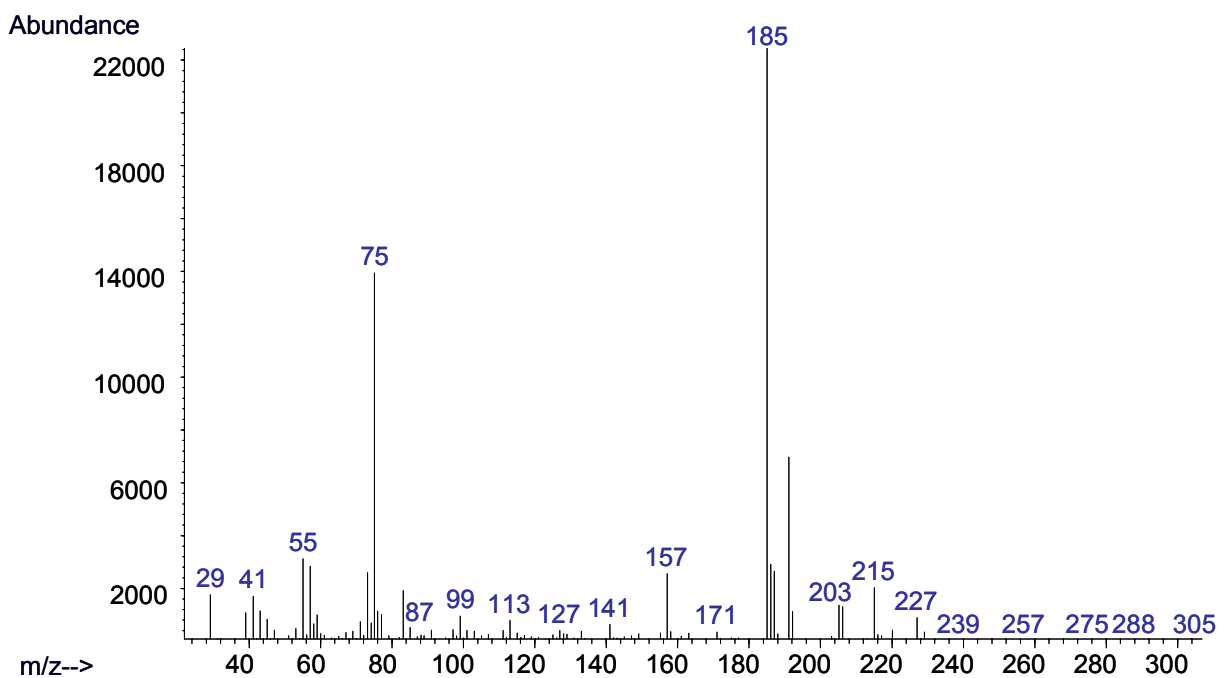
rozpuštěním sotolonu v původním víně v rozmezí koncentrací 0 - 100 µg/l. Dále následovala derivatizace činidlem BSTFA a analýza GC-MS. Pro kvantifikaci sotolonu byl zvolen ion 185 m/z (retenční čas 11,40 min). Kalibrační přímka vykazovala lineární průběh (Obr. 67) a vypočítaný limit detekce a kvantifikace měl hodnotu 3,985 a 5,905 µg/l. V původním víně byla nalezena přirozená koncentrace sotolonu 20,29 µg/l. Pro zjištění koncentrace sotolonu ve vzorcích vína Mistelle de Muscat a Old Porter byla použita metoda kalibrační přímky a nalezené koncentrace zahrnuje Tab. XV.



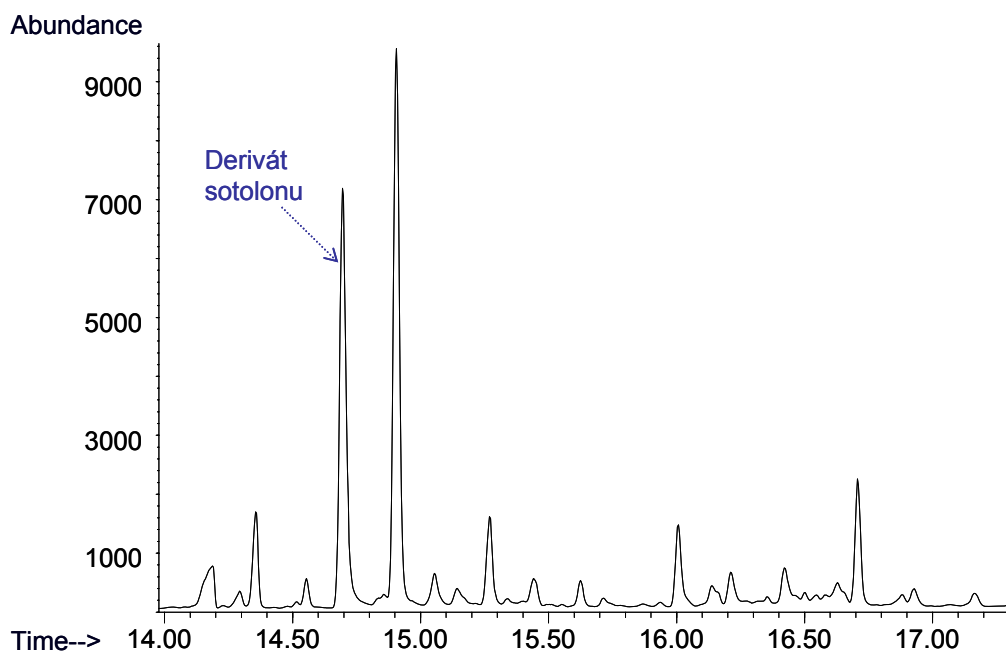
Obr. 67: Kalibrační závislost pro stanovení sotolonu ve vzorku s užitím derivatizace BSTFA

Jinou alternativu derivatizace sotolonu představuje reakce s t-butyldimethylsilylchloridem (TBDMSCl; Obr. 68, 69). Pro stanovení přirozené koncentrace sotolonu v použitém víně byla aplikována rovněž metoda standardního přidavku. Kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním sotolonu v původním víně v rozmezí koncentrací 0 - 100 µg/l. Dále následovala derivatizace činidlem TBDMSCl a analýza GC-MS. Pro kvantifikaci sotolonu byl zvolen ion 185 m/z (retenční čas 14,70 min). Kalibrační přímka vykazovala lineární průběh (Obr. 70) a vypočítaný limit detekce a kvantifikace měl hodnotu 1,126 a 1,682 µg/l. V původním víně byla nalezena přirozená koncentrace sotolonu 6,977 µg/l. Pro

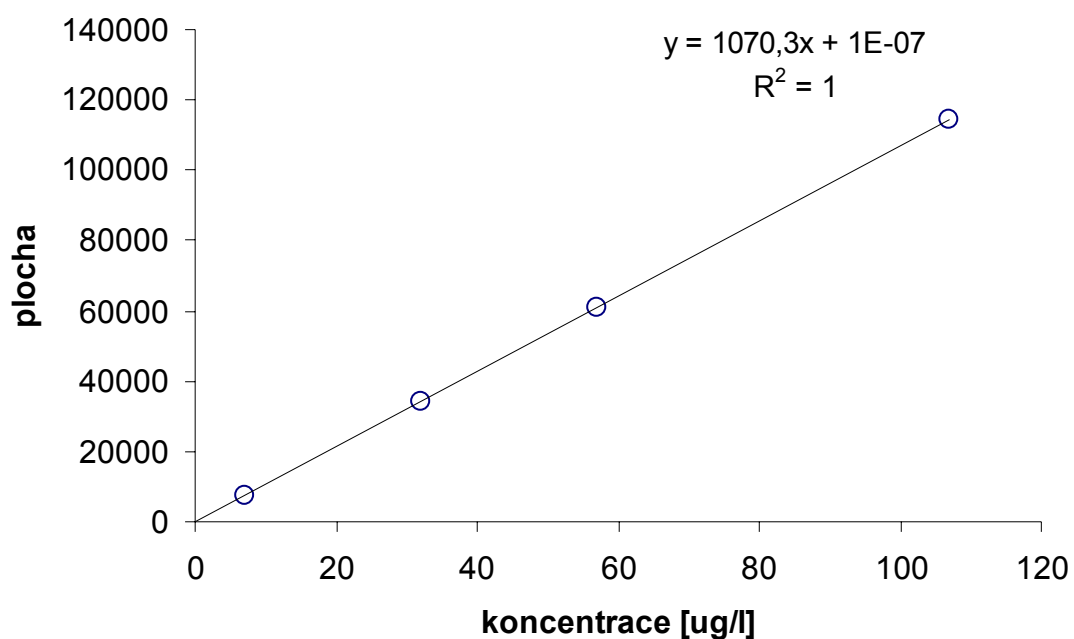
zjištění koncentrace sotolonu ve vzorcích vína Mistelle de Muscat a Old Porter byla použita metoda kalibrační přímky a nalezené koncentrace zahrnuje Tab. XV.



Obr. 68: Hmotnostní spektrum sotolonu po derivatizaci TBDMSCl



Obr. 69: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ion 185 m/z (TBDMSCl derivát sotolonu); 100 $\mu\text{g/l}$ ve víně



Obr. 70: Kalibrační závislost pro stanovení sotolonu ve vzorku s užitím derivatizace TBDMSCl

Tab. XV: Experimentálně zjištěné koncentrace sotolonu ve vzorku vína pomocí derivatizace BSTFA a TBDMSCl, měřeno v TIC módu.

Číslo vzorku vína	Koncentrace sotolonu [μg/l] derivatizace BSTFA	Koncentrace sotolonu [μg/l] derivatizace TBDMSCl
1	48,61	53,72
2	30,54	36,15
3	40,16	39,77
4	82,59	102,20
5	38,36	39,83
6	44,75	73,39
7	20,77	18,69
8	18,99	18,22

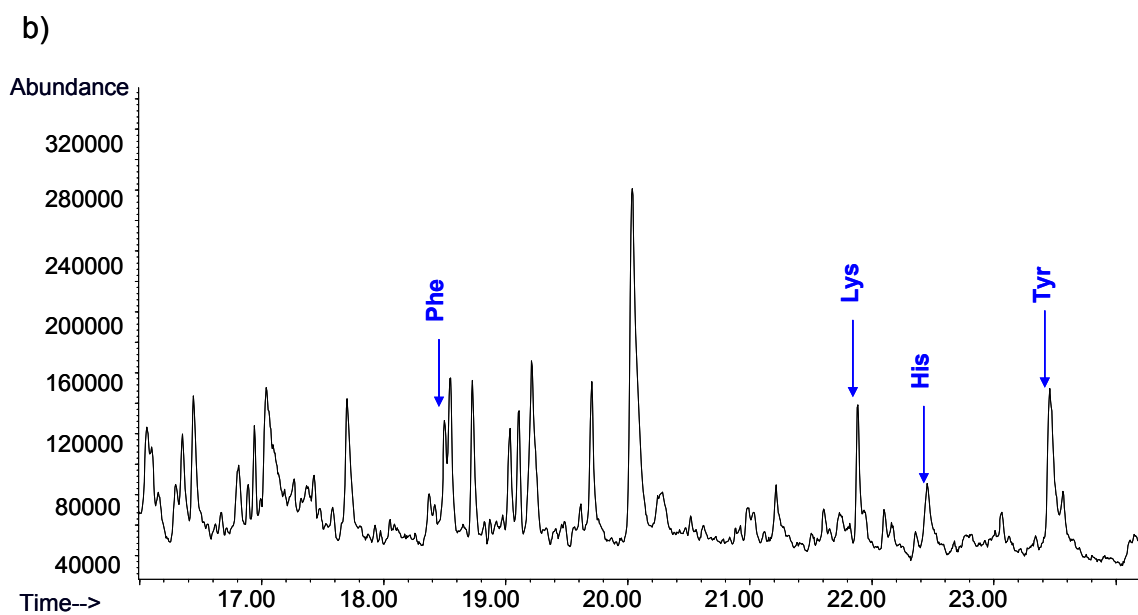
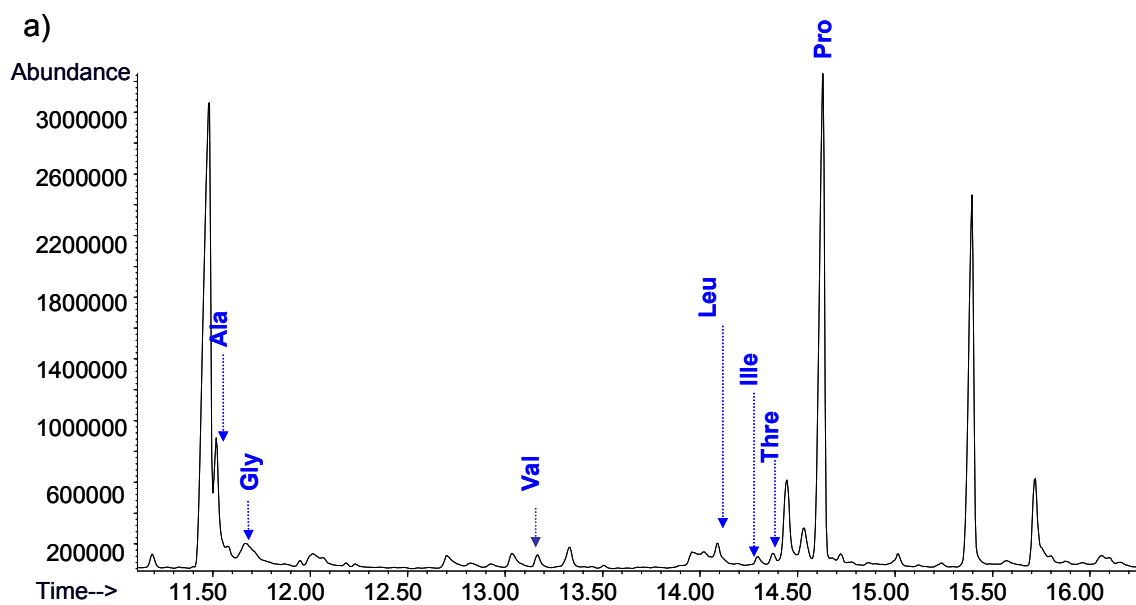
4.4 Aminokyseliny

Další typ sloučenin, které se ve víně vyskytují, jsou aminokyseliny. Aminokyseliny se v technologii výroby vína uplatňují především jako hlavní zdroj dusíku pro činnost kvasinek. Poslední studie ovšem také dokazují, že jejich biochemickou přeměnou v průběhu různých fází zpracování (fermentace, ležení vína na kvasnicích) vzniká celá řada organolepticky významných látek a jsou tedy považovány za důležité prekurzory aromatické skladby vína. Aminokyseliny se také společně s redukujícími sacharidy účastní Maillardovy reakce, tzv. reakce neenzymatického hnědnutí. [136, 137]

Mezi běžné přístupy pro analýzu aminokyselin patří: papírová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě, iontoměničová chromatografie, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza a plynová chromatografie. Aminokyseliny jako silně polární látky jsou velmi málo těkavé, a proto není možné provádět přímou GC analýzu. Nejprve je nutné převést aminokyseliny na vhodný derivát, který je dostatečně těkavý, stabilní a neinteraguje s nosičem. [76]

4.4.1 Analýza aminokyselin ve víně

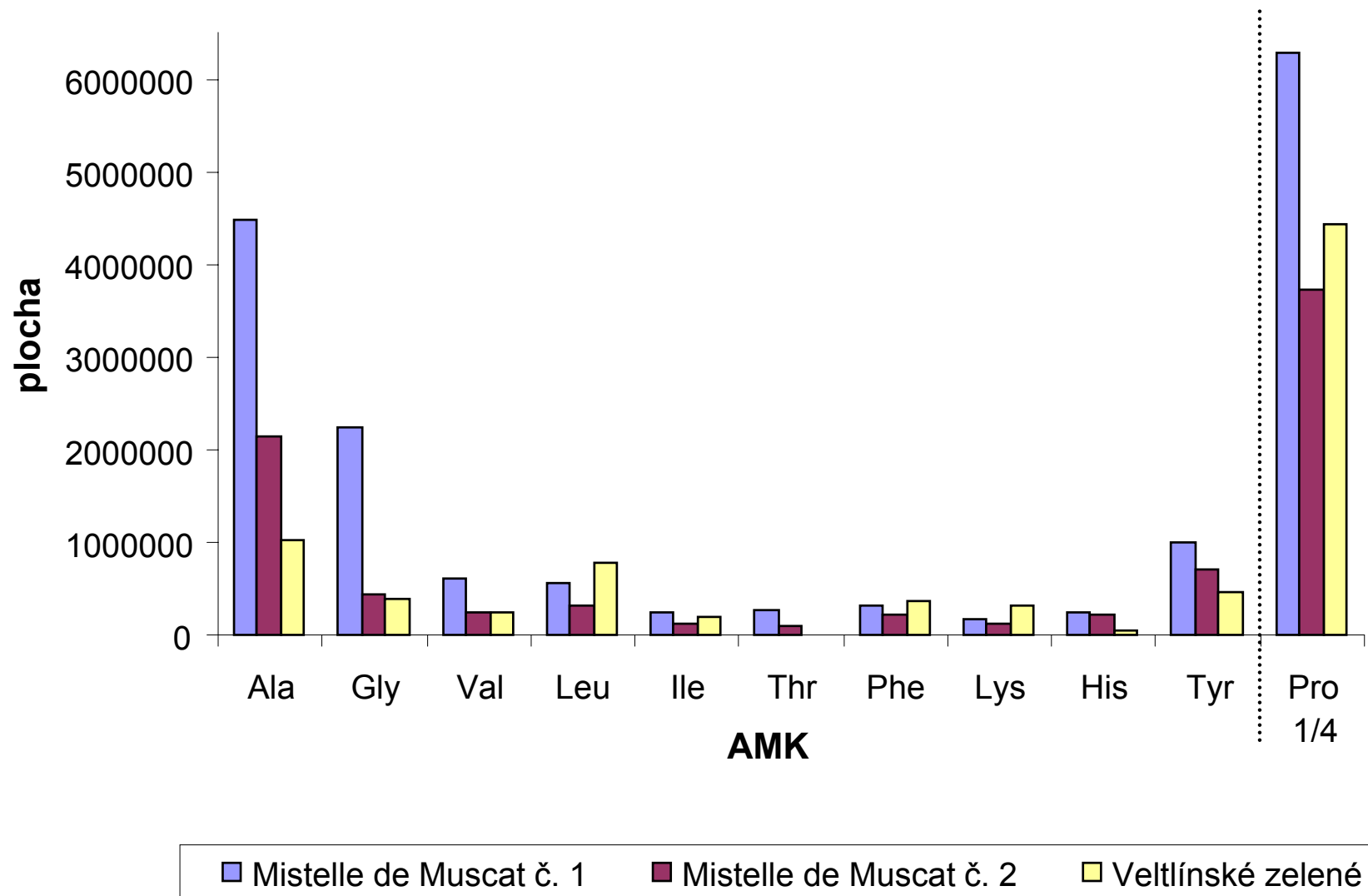
V rámci této studie bylo sledováno přirozené zastoupení aminokyselin ve víně. Pro analýzu bylo zvoleno bílé víno Veltlínské zelené a Mistelle de Muscat (vzorek č. 1 a 2). Aminokyseliny ve víně byly derivatizovány ethylchloroformiátem. Tento způsob derivatizace se vyznačuje rychlou reakcí (sekundy) probíhající za laboratorní teploty ve vodně-organickém prostředí, přičemž současně dochází k esterifikaci $-\text{COOH}$ a acylaci $-\text{NH}_2$ skupiny. Ve víně bylo identifikováno 11 běžně se vyskytujících aminokyselin, jejichž retenční časy a charakteristické ionty shrnuje Tab. XVI. Dále bylo zjištěno, že v největší míře je ve víně zastoupen prolin (Obr. 71, 72). Zajímavé bylo také zjištění, že ve vínech Mistelle de Muscat byl zaznamenán výskyt threoninu, zatímco ve Veltlínském zeleném přítomnost threoninu nebyla prokázána. Threonin je považován za jeden z možných prekurzorů sotolonu. [138] Předchozí studií bylo zjištěno, že narozdíl od vína Veltlínského, obsahuje víno Mistelle de Muscat stopové množství sotolonu. Z výsledků se tedy dá předpokládat, že existuje souvislost mezi výskytem sotolonu a threoninu ve víně.



Obr. 71: a), b) Chromatogram reálné analýzy AMK ve víně po derivatizaci ethylchloroformiátem; TIC mód

Tab. XVI: Retenční časy, charakteristické ionty a ionty použité pro kvantifikaci aminokyselin

AMK (zkratka)	t_R [min]	Charakteristické ionty [m/z]	SIM [m/z]
alanin (Ala)	11,52	170, 139, 116, 72, 44	116
glycin (Gly)	11,67	175, 130, 102, 74, 30	102
valin (Val)	13,17	174, 144, 129, 116, 98, 72, 55, 30	144
leucin (Leu)	14,09	231, 186, 158, 142, 129, 114, 102, 86, 74, 56, 44	158
isoleucin (Ile)	14,29	186, 158, 142, 129, 114, 102, 86, 74, 56, 41	158
threonin (Thr)	14,37	204, 175, 158, 151, 146, 129, 101, 74, 45	129
prolin (Pro)	14,63	215, 179, 142, 120, 114, 98, 70, 32	142
fenylalanin (Phe)	18,5	250, 220, 198, 192, 176, 148, 131, 120, 102, 91, 74, 56, 30	176
lysin (Lys)	21,93	156, 144, 128, 102, 84, 56, 30	156
histidin (His)	22,45	327, 282, 254, 238, 193, 182, 166, 154, 136, 122, 121, 109, 94, 81, 54, 31	238
tyrosin (Tyr)	23,46	280, 264, 241, 220, 208, 192, 164, 147, 135, 120, 107, 74, 43	107



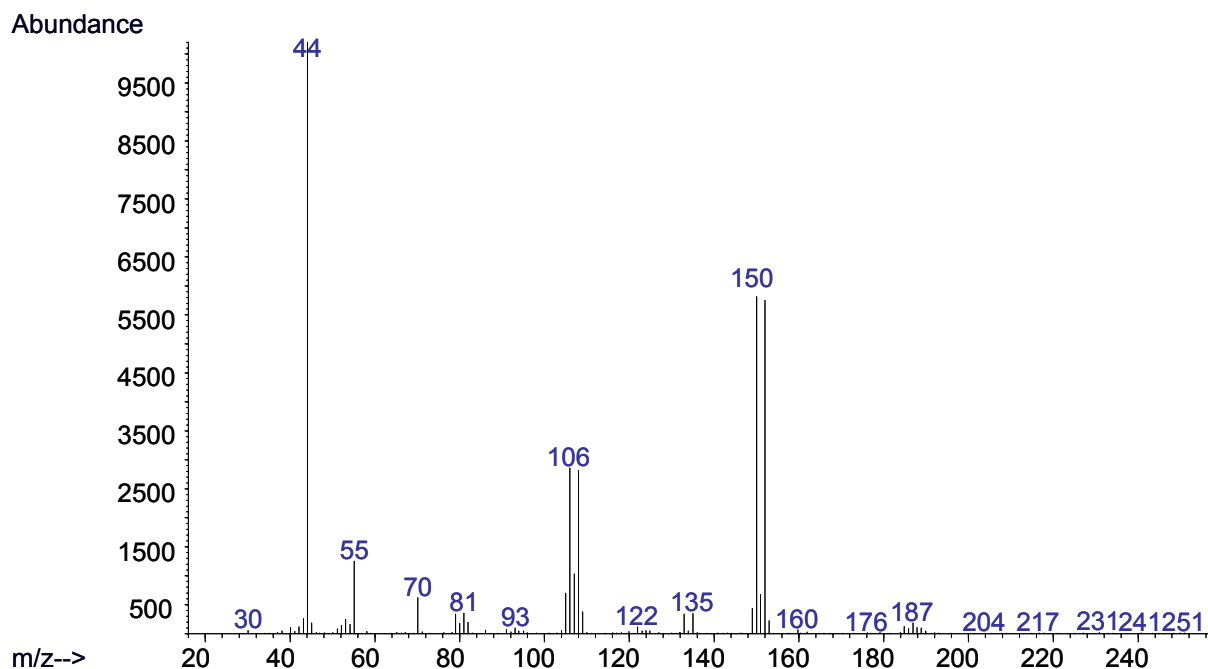
Obr. 72: Graf zastoupení jednotlivých aminokyselin ve víně Mistelle de Muscat a Veltlínském zelené.

4.5 Akrylamid

Za hlavní proces vzniku akrylamidu v potravinách je považována Maillardova reakce mezi asparaginem a redukujícími sacharidy, probíhající v matrici během tepelného zpracování při teplotách nad 120 °C. [137] Jelikož je akrylamid klasifikován jako možný karcinogen pro člověka (IARC 2004) [139], je mnoho publikací zaměřeno právě na analýzu akrylamidu v potravinách.

Úskalí při analýze akrylamidu v potravinách jsou způsobena fyzikálně chemickými vlastnostmi akrylamidu, variabilitou vzorků potravin a jejich komplexností, tvorbou akrylamidu z přítomných prekurzorů při zpracování vzorku při vyšší teplotě (např. Soxhletova extrakce) a možnostmi výskytu akrylamidu v některých materiálech, (např. obalová technika, voda na oplach atd.) čímž může dojít ke kontaminaci vzorku. Za tradiční způsob analýzy akrylamidu v potravinách je pokládána GC-MS a GC-ECD analýza po předchozí derivatizaci. Existují také studie zabývající se přímým GC-MS stanovením, zde je ale potřeba optimalizovat GC nástřík a/nebo upravit vzorek za účelem eliminace tvorby akrylamidu během nástříku z přítomných prekurzorů. Novější přístupy využívají HPLC-MS nebo lépe HPLC-MS/MS, přičemž je využívána metoda izotopově značeného standardu a/nebo derivatizace (např. 2-merkaptobenzoovou kyselinou). [140]

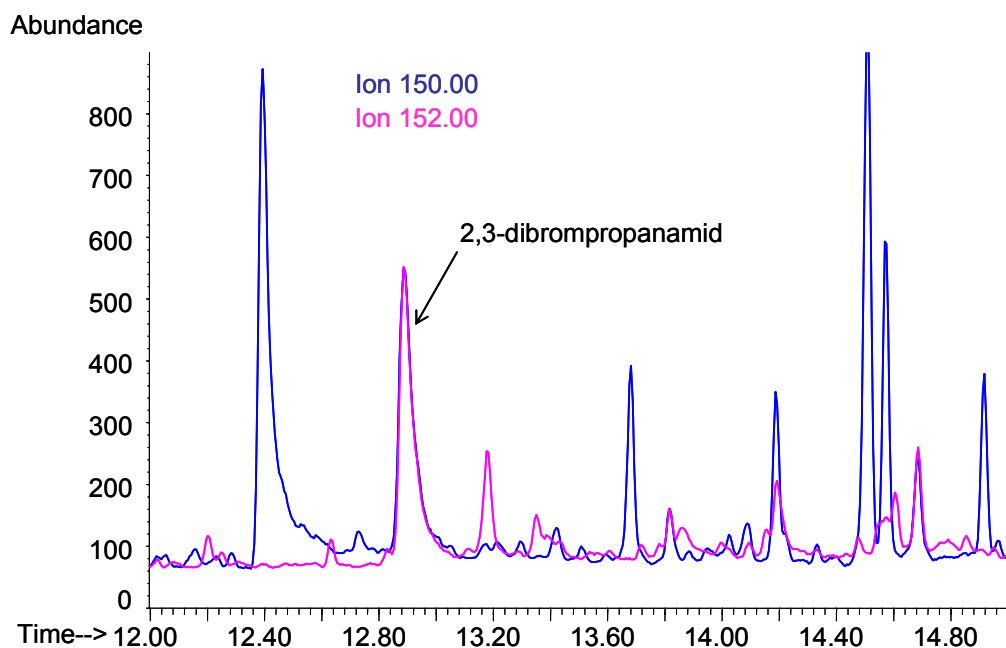
V této studii byla pro GC-MS analýzu akrylamidu zvolena derivatizační metoda, při níž se k modifikaci analytu využívá bromoční směs tvořené bromidem a bromičnanem draselným. Reakce probíhala v prostředí 10 % kyseliny sírové. V hmotnostním spektru 2,3-dibrompropanamidu (Obr. 73) chybí molekulární ion (229 m/z). Pro kvantifikaci tedy byly zvoleny ionty 150 nebo 152 m/z (retenční čas 12,86 min), který vznikl odštěpením ⁷⁹Br nebo ⁸¹Br. Jelikož jsou intenzity těchto píků přibližně v poměru 1 : 1 (100 : 97,3), lze v rekonstruovaném iontovém chromatogramu pro ionty 150 a 152 m/z bromovaný derivát snadno identifikovat a stanovit (Obr. 74).



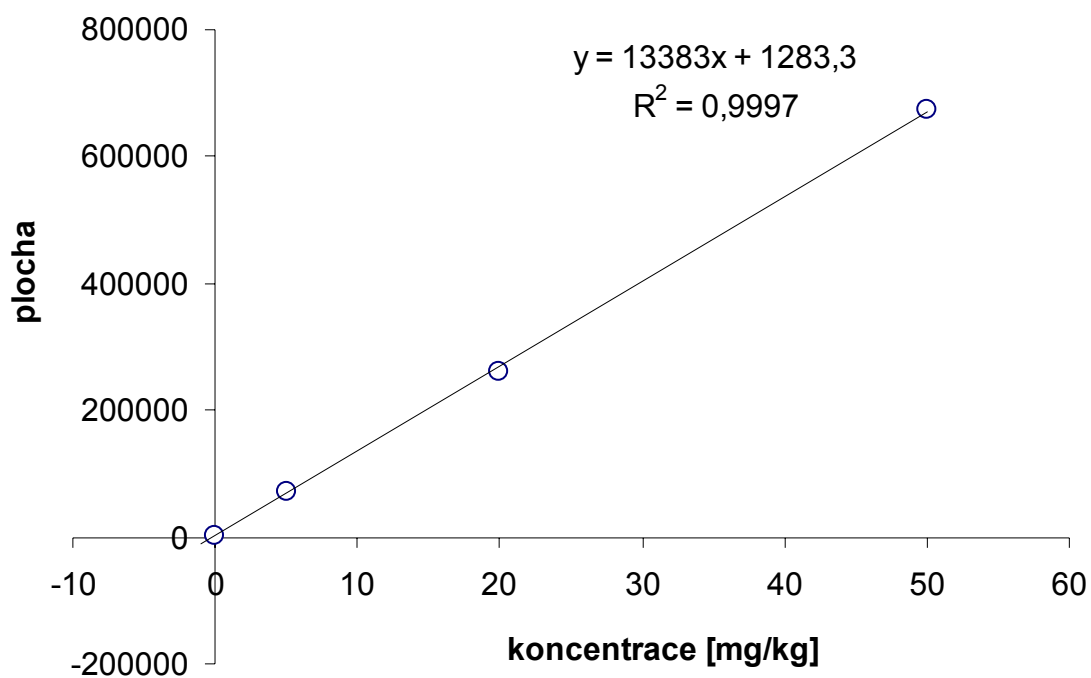
Obr. 73: Hmotnostní spektrum 2,3-dibromopropanamidu

4.5.1 Analýza akrylamidu v brambůrkách

Pro stanovení přirozené koncentrace akrylamidu v bramborových lupínkách byla aplikována metoda standardního přidavku v rozmezí koncentrací 0 - 50 mg/kg. Brambůrky byly homogenizovány a extrahovány vodou. Přidáním hexanu k extrahovanému vzorku byly odstraněny tuky z vodné fáze. Kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním akrylamidu ve vodném extraktu. Dále následovala derivatizace směsí KBr a KBrO₃ v přítomnosti 10 % H₂SO₄ a analýza GC-MS. Pro kvantifikaci akrylamidu byly zvoleny ionty 150 a 152 m/z (retenční čas 12,86 min). Kalibrační přímka vykazovala lineární průběh (Obr. 75). Z nejnižšího přidavku byla stanovena přirozená koncentrace akrylamidu v brambůrkách, která činila 53,59 µg/kg.



Obr. 74: Rekonstruovaný iontový chromatogram pro ionty 150 a 152 m/z (derivát akrylamidu); reálná analýza v brambůrkách



Obr. 75: Kalibrační závislost pro stanovení akrylamidu ve vzorku s využitím derivatizace

5 ZÁVĚR

Cílem studie bylo navrhnout netradiční derivatizační postupy v plynové chromatografii. Výběr analytů (karbonylové sloučeniny, aminokyseliny, kyselina pyrohroznová a sotolon) byl realizován z hlediska potřeb pro další výzkumy. Pro vybrané látky je typické, že jejich analýza plynovou chromatografií je bez předchozí derivatizace obtížná, v některých případech dokonce nemožná. Jako matrice bylo zvoleno víno, v němž se všechny studované látky přirozeně vyskytují. Studium bylo dále doplněno o vstupní experiment směřující k analýze akrylamidu v potravinách.

Převedením nízkomolekulárních karbonylových sloučenin na méně těkavé deriváty se zamezí jak jejich koeluci s rozpouštědlem na počátku analýzy, tak ztrátám během manipulace. Těmito vlastnostmi se vyznačují thiazolidinové deriváty, které vznikají kondenzací cysteaminu s karbonylovými sloučeninami. Karbonylové sloučeniny ve víně byly derivatizovány vodným roztokem cysteaminu o pH 8 (výsledné pH reakčního roztoku bylo 7,3 – 7,7). Prostřednictvím plynové chromatografie byly zjištěny teploty varu jednotlivých thiazolidinových derivátů. Stanovení vycházelo z poznatku, že při separaci na nepolární koloně je eluční pořadí dané pořadím posloupnosti teplot varu. Experimentem bylo zjištěno, že se teploty varu po derivatizaci karbonylových sloučenin výrazně zvýší, což vede k dostatečnému zvýšení retence pro selektivní stanovení (např. pro acetaldehyd je tabelovaná t. v. 21 °C, pro 2-methylthiazolidin je tabelovaná t. v. 160-163 °C [141] a změřená t. v. 155, 85 °C).

Dále bylo zjištěno, že pH prostředí významně ovlivňuje jak tvorbu derivátů, tak jejich extrakci. V případě alifatických aldehydů je třeba, aby hodnota pH reakční směsi byla nad 7, kdy je zajištěn kvantitativní průběh derivatizace a extrakce. Největších výtěžků u aromatických aldehydů bylo dosaženo při pH~7 a při dalším zvyšování pH výtěžky klesaly. Metoda může být tedy využita jak pro alifatické, tak aromatické aldehydy. Je také vhodná i pro některé ketony. V rámci této studie byl sledován aceton, u něhož byl pozorován nárůst výtěžku derivatizační reakce až do pH 10. Pomocí připraveného standardu 2-fenylthiazolidinu byla pro benzaldehyd stanovena výtěžnost extrakce 99,97 % a výtěžnost celkového postupu (derivatizace a extrakce) 79,68 %.

Navržená metoda byla dále aplikována pro stanovení acetaldehydu, 4-hydroxybenzaldehydu a acetonu ve vzorku červeného vína, přičemž výsledky analýzy byly dále

uplatněny ve studiu anthokyaninů. Jako srovnávací metoda byla zvolena analýza využívající SPME bez předchozí derivatizace. V případě acetaldehydu a 4-hydroxybenzaldehydu vedla derivatizace k výrazně lepší symetrii píku a ve všech případech bylo derivatizací dosaženo mnohonásobně vyšší účinnosti separace a tedy i nižších limitů detekce.

Kyselina pyrohroznová ve víně byla nejprve kondenzací s o-fenylendiaminem převedena na 2-hydroxy-3-methylchinoxalin, který byl dále podroben silylační reakci s BSTFA. Bylo zjištěno, že v případě kyseliny pyrohroznové je dvoukroková derivatizace příznivější než derivatizace jednoduchá. Navzdory časové náročnosti provedení, je dvoukrokovou derivatizací dosaženo vyšší těkavosti analytu, lepší symetrie píku a účinnosti separace, a tedy i nižších limitů detekce. Metoda byla rovněž uplatněna při stanovení kyseliny pyrohroznové ve vzorcích vína, přičemž výsledky byly opět uplatněny ve studiu anthokyaninů.

Pro derivatizaci sotolonu byla zvolena silylace pomocí BSTFA. Reakce se vyznačovala rychlostí a jednoduchostí. Metoda derivatizace byla porovnávána s metodou přímého nástřiku a bylo zjištěno, že derivatizací je dosaženo mnohonásobně vyšší symetrie píku, účinnosti chromatografické separace a vyšší citlivosti stanovení. Pro reálnou analýzu byla zvolena vína s vysokým obsahem zbytkového cukru. Stanovené koncentrace sotolonu byly v rozmezí 18,99 - 82,59 $\mu\text{g/l}$ a zjištěný limit detekce a kvantifikace byl 3,985 $\mu\text{g/l}$ a 5,905 $\mu\text{g/l}$. Jako alternativní metoda byla zvolena derivatizace činidlem TBDMSCl, které oproti BSTFA poskytuje hydrolyticky stabilnější deriváty. Analýzou předložených vzorků vín se dospělo k podobným výsledkům jako v případě derivatizace s BSTFA. Jednou z nevýhod silylačních postupů je citlivost činidel vůči vlhkosti.

Aminokyseliny ve víně byly derivatizovány ethylchloroformiátem ve vodně-organickém prostředí. Reakce se vyznačovala jednoduchostí a rychlostí provedení. Metody bylo využito při sledování přirozeného zastoupení aminokyselin ve vínech lišící se technologií výroby. Ve víně Mistelle de Muscat, v němž bylo nalezeno stopové množství sotolonu, byla zaznamenána také přítomnost threoninu. Na druhé straně ve víně Veltlínském zeleném nebyl přítomen ani sotolon, ani threonin. Výsledky této práce se přiklánějí k hypotéze, že by threonin mohl být jedním z prekurzorů sotolonu.

Bromace je zcela odlišný typ derivatizace, který může mít charakter jak elektrofilní adice, tak elektrofilní substituce. Bromace, založená na adici bromu na dvojnou vazbu analytu, byla využita při stanovení akrylamidu v bramborových lupínkách, ve kterých

akrylamid vzniká při smažení. Jako derivatizační činidlo byl zvolen bromid a bromičnan draselný, reagující s analytem v kyselém prostředí. Zjištěný obsah akrylamidu v bramborových lupínkách byl 53,59 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Výzkum v této oblasti je nadále předmětem dalšího studia.

6 LITERATURA

- [1] Komárek K., Franc J., Churáček J.: *Reakční chromatografie v organické analýze*, SNTL Praha 1989, 288 s.
- [2] Churáček J. a kol.: *Analytická separace látek*, SNTL Praha 1990, 384 s.
- [3] Knapp. D. R.: *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley & sons 1979, 741 s.
- [4] Zaikin V., Halket J.: *A Handbook of derivatives for mass spectrometry*, IM Publications 2009, 513 s.
- [5] Blau K., Halket J. M.: *Handbook of derivatives for chromatography*, 2. vydání, John Wiley & Sons 1993, 392 s.
- [6] Subramanian G.: *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, Second, completely revised and updated edition, Wiley-VCH 2001, 342 s.
- [7] Šimek P.: *Derivatizace v hmotnostní spektrometrii, škola hmotnostní spektrometrie* [online], dostupné z WWW: <http://www.bclab.eu/pdf/E3.2-MSSchool_Y08_Sec.pdf>, [2010-07-06].
- [8] W. M. Thorburn: *Mind*, 24, 287-288 (1915).
- [9] Wilson I., Poole C., Cooke M.: *Encyclopedia of separation science*, Academic Press 2000, 4502 s.
- [10] Moldoveanu S. C, David V.: *Sample preparation in Chromatography*, *J.Chromatogr. Library*, 65, 942 s.
- [11] Segura J., Ventura R., Jurado C.: *J. Chromatogr. B*, 713, 61-90 (1998).
- [12] Wells R. J.: *J. Chromatogr. A*, 843, 1-18 (1991).
- [13] Sigma - Aldrich: *Guide to derivatization reagents*, Bulletin 909A, 1997 [online], dostupné z WWW: [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/ Application_Notes/4537.Par.0001.File.tmp/4537.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application_Notes/4537.Par.0001.File.tmp/4537.pdf)., [cit. 2010-10-03].
- [14] Regis Technologies, *GC derivatization*, 2000 [online], dostupné z WWW: <<http://www.registech.com/Library/gcderrev.pdf>>, [cit. 2010-11-05].
- [15] Schmidt T. C., Haas R., Löw E., Steinbach K.: *Chromatographia*, 48, 436-442 (1998).
- [16] Schmidt T. C., Haas R., Löw E., Steinbach K.: *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357, 335-341 (1997).
- [17] Dados A. E., Stalikas C. D., Pilidis G. A.: *Chromatographia*, 59, 335-341 (2004).

- [18] Gutenman W. H., Lisk D. J.: *J. Agric. Food Chem.*, *11*, 468-470 (1963).
- [19] Trigg D. P., Simmonds P. G., Nickless G.: *J. Chromatogr. A*, *690*, 197-206 (1995).
- [20] Cao X.-L., Hewitt C. N.: *J. Chromatogr. A*, *690*, 187-195 (1995).
- [21] Volka K. a kol.: *Analytická chemie II*, VŠCHT Praha 1995, 236 s.
- [22] Critchfield F. E.: *Anal. Chem.*, *31*, 1406-1408 (1959).
- [23] Chriestensen B. E., Hansen E., Cheldelin V. H.: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, *11*, 114-116 (1939).
- [24] Bruno T. J., Svoronos P. D. N.: *Handbook of basic tables for chemical analysis*, 2.vydání, CRC press 2004, 672 s.
- [25] Sigma - Aldrich [online], dostupné z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>>, [cit. 2010-11-08].
- [26] Svoboda J. a kol.: *Organická chemie 1*, VŠCHT Praha, 1. vydání, 310 s.
- [27] Červinka O., Dědek V. Ferles M.: *Organická chemie*, SNTL Praha 1969, 1. vydání, 792 s.
- [28] Motyka K., Mikuška P.: *Chem. Listy*, *99*, 13-20 (2005).
- [29] Dabrowska A., Świetlik J., Nawrocki J.: *Wat. Res.*, *37*, 1161-1169 (2003).
- [30] Dong J. Z., Moldovean S. C.: *J. Chromatogr. A*, *1027*, 25-35 (2004).
- [31] Sigma - Aldrich: *Alternative Analysis of Formaldehyde-DNPH and Other Carbonyl-DNPH Derivatives by Capillary GC*, Application 107, 1998 [online], dostupné z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4700/4650.pdf>>, [cit. 2010-11-10].
- [32] Nishikawa H., Sakai T.: *J. Chromatogr. A*, *710*, 159-165 (1995).
- [33] Saito T., Takashina T., Yanagisawa S., Shirai T.: *Bunseki Kagaku*, *32*, 33-38 (1983).
- [34] Vogel M., Büldt A., Karst U.: *Fresenius J. Anal. Chem.*, *366*, 781-791 (2000).
- [35] Lehmpuhl D. W., Birks J. W.: *J. Chromatogr. A*, *740*, 71-81 (1996).
- [36] *Methods for determining aldehydes in air*, University of Pretoria [online], dostupné z WWW: <<http://upetd.up.ac.za/thesis/submitted/etd-11212005-091558/unrestricted/02chapter2.pdf>>, [cit. 2010-11-08].
- [37] Stashenko E. E., Ferrexra M. C., Sequeda L. G., Martínez J. R., Won J. V.: *J. Chromatogr. A*, *779*, 360-369 (1997).
- [38] Nishikawa H., Sakai T.: *J. Chromatogr. A*, *710*, 159-165 (1995).
- [39] Jain V., Thielen D.: *J. Chromatogr. A*, *709*, 387-392 (1995).

- [40] Magin D. F.: *J. Chromatogr.*, *202*, 255-261 (1980).
- [41] Nambara T., Kigasawa K., Iwata T., Ibuki M.: *J. Chromatogr. A*, *114*, 81-86 (1975).
- [42] Kobayashi K., Tanaka M. and Kawai S.: *J. Chromatogr.*, *187*, 413-417 (1980).
- [43] Nishikawa H., Takahara Y., Mori H., Hayakawa T.: *J. Jpn. Soc. Air Pollut.*, *19*, 387-391 (1984).
- [44] Nishikawa H., Hayakawa T., Sakai T.: *Bunseki Kagaku*, *36*, 311-315 (1987).
- [45] Glaze W. H., Koga M., Cancilla D.: *Environ. Sci. Technol.*, *23*, 838-847 (1989).
- [46] Nawrocki J., Dabrowska A., Borcz A.: *Wat. Res.*, *36*, 4893-4901 (2002).
- [47] Ojala M., Kotiaho T., Siirilä J., Sihvonen M.-L.: *Talanta*, *41*, 1297-1309 (1994).
- [48] Ferreira V., Culleré L., Loscos N., Cac J.: *J. Chromatogr. A*, *1122*, 255-265 (2006).
- [49] Vidal J. P., Estreguil S., Cantagrel R.: *Chromatographia*, *36*, 183-186 (1993).
- [50] Kobayashi K., Narita N., Kawai S., Kouchi S.: *Anal. Sci.*, *1*, 377-379 (1985).
- [51] Breckenridge S. M., Yin X., Rosenfeld J. M., Yu Y. H.: *J. Chromatogr. B*, *694*, 289-296 (1997).
- [52] Nawrocki J., Kalkowska I., Dabrowska A.: *J. Chromatogr. A*, *749*, 157-163 (1996).
- [53] Saison D., Schutter D. P. D, Delvaux F., Delvaux F.: *J. Chromatogr. A*, *1216*, 561-568 (2009).
- [54] Cancho B., Ventura F., Galceran M-T.: *J. Chromatogr. A*, *943*, 1-13 (2001).
- [55] Flamini R., Vedova A. D., Panighel A., Perchiazzi N., Ongarato S.: *J. Mass. Spectrom.*, *40*, 1558-1564 (2005).
- [56] Chmelová Š., Tríska J., Růžičková K., Kalač P.: *Anim. Feed Sci. Technol.*, *152*, 152-160 (2009).
- [57] Iglesias J., Gallardo J. M., Medina I.: *Food Chem.*, *123*, 771-778 (2010).
- [58] Miyake T., Shibamoto T.: *J. Agric. Food Chem.*, *41*, 1968-1970 (1993).
- [59] Hayashi T., Shibamoto T.: *J. Agric. Food Chem.*, *33*, 1090-1093 (1985).
- [60] Yasuhara A.: *J. Chromatogr.*, *547*, 291-298, 1991.
- [61] Umamo K., Shibamoto T.: *J. Agric. Food Chem.*, *35*, 14-18 (1987).
- [62] Yasuhara A., Shibamoto T.: *Food Chem.*, *37*, 13-20 (1990).
- [63] Yasuhara A., Shibamoto T.: *J. Agric. Food Chem.*, *43*, 94-97 (1995).
- [64] Miyake T., Shibamoto T.: *J. Chromatogr. A*, *693*, 376-381 (1995).
- [65] Yasuhara A., Shibamoto T.: *J. Chromatogr. A*, *672*, 261-266 (1994).

- [66] Kataoka H., Sumida A., Nishihata N., Makita M.: *J. Chromatogr. A*, *709*, 303-311 (1995).
- [67] Kataoka H., Kondo T., Sumida A.: *Anal. Chim. Acta*, *358*, 269-275 (1998).
- [68] Lau M. N., Ebeler J. D., Ebeler S. E.: *Am. J. Enol. Vitic.*, *50*, 324-333 (1999).
- [69] Kennedy E. R., Hili R. H.: *Anal. Chem.*, *54*, 1739-1742 (1982).
- [70] Kennedy E. R., O'Connor P. F., Gagnon Y. T.: *Anal. Chem.*, *56*, 2120-2123 (1984).
- [71] Velíšek J., Davídek J.: *Chem. Listy*, *67*, 513-524 (1973).
- [72] Šípál Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I.: *biochemie, Praha 1992*, 480 s.
- [73] Klouda P.: *Základy biochemie, Ostrava 2000*, 1. vydání 155 s.
- [74] Pyruvic acid, Megazyme, 2007 [online], dostupné z WWW: <<http://www.megazyme.com/downloads/en/data/K-PYRUV.pdf>>[cit. 2011-03-03].
- [75] Mellouki A., Mu Y.: *J. Photochem. Photobiol. A*, *157*, 295-300 (2003).
- [76] Lee S. H., Kim S. O., Chung B. Ch.: *J. Chromatogr. B*, *719*, 1-7 (1998).
- [77] Kimura M., Yamamoto T., Yamaguchi S.: *Tohoku J. Exp. Med.*, *188*, 317-334 (1999).
- [78] Fu X., Kimura M., Iga M., Yamaguchi S.: *J. Chromatogr. B*, *758*, 87-94 (2001).
- [79] Rocchiccioli F., Leroux J. P., Cartier P.: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, *8*, 160-164 (1981).
- [80] Langenbeck U., Hoinowski A., Mantel K., Möhring H. U.: *J. Chromatogr., B* *143*, 39-50 (1977).
- [81] Fernandes A. A., Kalhan S. C., Njoroge F. G., Matousek G. S.: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, *13*, 569-581 (1986).
- [82] Kawamura K.: *Anal. Chem.*, *65*, 3505-3511 (1993).
- [83] Matsukura M., Takahashi K., Kawamoto M., Ishig S.: *Agric. Biol. Chem.*, *49*, 3335-3337 (1985).
- [84] Mebazaa R., Mahmoudi A., Fouchet M., Santos M. D., Kamissoko F., Nafti A., Cheikh R. B., Rega B., Camel V.: *Food Chem.*, *115*, 1326-1336 (2009).
- [85] Martin B., Etiévant P. X., Quéré J. L. L., Schlich P.: *J. Agric. Food Chem.*, *40*, 475-478 (1992).
- [86] Rapior S., Fons F., Bessière J. M.: *Mycologia*, *92*, 305-308 (2000).
- [87] Rezemini A. L., Vaz J. M., Carvalho L. R. F.: *J. Chromatogr. A*, *972*, 259-267 (2002).
- [88] Kubwabo C., Stewart B., Gauthier S. A., Gauthier B. R.: *Anal. Chim. Acta*, *972*, 222-229 (2009).

- [89] Nawrocki J., Andrzejewski P., Kronberg L., Jelen' H.: *J. Chromatogr. A*, *790*, 242-247 (1997).
- [90] Nawrocki J., Andrzejewski P., Jelen' H., Wasowicz E.: *Wat. Res.*, *35*, 1891-1896 (2001).
- [91] Ogawa S., Kita H., Hanasaki Y., Fukui S.: *J. Chromatogr.*, *643*, 221-226 (1993).
- [92] Onstad O. G., Weinberg H. S.: *Anal. Chim. Acta*, *534*, 281-292 (2005).
- [93] Benda V., Babůrek I., Kotrba P.: *Základy biologie*, VŠCHT Praha 2006, 1. vydání, 167 s.
- [94] Liu J. H., Ku W. W.: *Anal. Chem.*, *53*, 2180-2184 (1981).
- [95] Zahradníčková H.: *Disertační práce - Vývoj analytických metod pro výzkum biologicky aktivních látek, Nové metody pro chirální analýzu aminokyselí*, PŘF MU Brno 2007, 91 s.
- [96] Davídek J. a kol.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, SNTL Praha 1977, 718 s.
- [97] Zomzely C., Marco G., Emery E.: *Anal. Chem.*, *34*, 1414-1417 (1962).
- [98] Lamkin W. M., Gehrke Ch. W.: *Anal. Chem.*, *37*, 383-389 (1965).
- [99] Roach D., Gehrke Ch. W.: *J. Chromatogr. A*, *44*, 269-278 (1969).
- [100] Deng Ch., Shang Ch., Hu Y., Zhang X.: *J. Chromatogr. B*, *775*, 115-120 (2002).
- [101] Fu X-W., Iga M., Kimura M., Yamaguchi S.: *Early Hum. Dev.*, *58*, 41-55 (2000).
- [102] Kuhara T., Shinka T., Inoue Y., Ohse M., Zhen-wei X., Yoshida I., Inokuchi T., Yamaguchi S., Takayanagi M., Matsumoto I.: *J. Chromatogr. B*, *731*, 141-147 (1999).
- [103] Hušek P., Felt V., Matucha M.: *J. Chromatogr.*, *180*, 53-68 (1979).
- [104] Hušek P.: *J. Chromatogr. A*, *552*, 289-299 (1991).
- [105] Namera A., Yashiki M., Nishida M., Kojima T.: *J. Chromatogr. B*, *776*, 49-55 (2002).
- [106] Sobolevsky T. G., Revelsky A. I., Miller B., Oriedo V., Chernetsova E. S., Revelsky I. A.: *J. Sep. Sci.*, *26*, 1474-1478 (2003).
- [107] Hušek P., Liebich H. M.: *J. Chromatogr.*, *656*, 37-43 (1994).
- [108] Deng Ch., Li N., Zhang X.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, *18*, 2558-2564 (2004).
- [109] Eriksson S.: *Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology*, Univerzita Stockholm, Švédsko 2005, 83 s.
- [110] Friedman M.: *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 4504-4526 (2003).
- [111] Smith C. J., Perfetti T. A., Rumple M. A., Rodgman A., Doolittle D. J.: *Food Chem. Toxicol.*, *38*, 371-383 (2000).

- [112] Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M.: *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 4998-5006 (2002).
- [113] Ciesarová Z.: *Chem. Listy*, *99*, 483-491 (2005).
- [114] Zhang Y., Zhang G., Zhang Y.: *J. Chromatogr. A*, *1075*, 1-21 (2005).
- [115] Hashimoto A.: *Analyst*, *101*, 932-938 (1976).
- [116] Bologna L. S., Andrawes F. F., Barvenik F. W., Lentz R. D., Sojka R. E.: *J. Chrom. Sci.*, *37*, 240-244 (1999).
- [117] Pittet A., Périsset A., Oberson J.-M.: *J. Chromatogr. A*, *1035*, 123-130 (2004).
- [118] Castle L.: *J. Agric. Food Chem.*, *41*, 1261-1263 (1993).
- [119] Ölmez H., Tuncay F., Özcan N., Demirel S.: *J. Food Compos. Anal.*, *21*, 564-568 (2008).
- [120] Nemoto S., Takatsuki S., Sasaki K., Maitani T.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, *43*, 371-376 (2002).
- [121] Zhang Y., Ren Y., Zhao H., Zhang Y.: *Anal. Chim. Acta*, *584*, 322-332 (2007).
- [122] Zhang Y., Dong Y., Ren Y., Zhang Y.: *J. Chromatogr. A*, *1116*, 209-216 (2006).
- [123] Lagalante A. F., Felter M. A.: *J. Agric. Food Chem.*, *52*, 3744-3748 (2004).
- [124] Yasuhara A., Shibamoto T.: *Agric. Biol. Chem.*, *53*, 2273-2274 (1989).
- [125] Dubs P. a kol.: United States Patent 3944561 [online], dostupný z WWW: <<http://www.freepatentsonline.com/3944561.html>>, [cit. 2011-03-01].
- [126] Pavloušek P.: *Výroba vína u malovinařů*, 2., aktualizované a rozšířené vydání, Grada Publishing, a.s., Praha 2010, s. 120.
- [127] Stávek J., Balík J., Bednář P., Barták P., Lemr K.: *Reakce anthokyanů - stabilizace a změny barvy vína* [online], dostupné z WWW: <http://www.enolog.cz/reakce-antokyanu-stabilizace-a-zmeny-barvy-vina>, [cit. 2011-03-05].
- [128] Barbas C., Adeva N., Aguilar R., Rosillo M., Rubio T., Castro M.: *Clin. Chem.*, *44*, 1340-1342 (1998).
- [129] Oefner P.J., Bonn G., Bartsch G.: *Fresen. J. Anal. Chem*, *320*, 175-178 (1985).
- [130] Koike K., Koike M.: *Anal. Biochem.* *141*, 481-487 (1984).
- [131] Hayashia T., Todorikia H., Narusea H.: *224*, 197-204 (1981).
- [132] Dubois P., Rigaud J., Dekimpe J.: *Lebensm. Wiss. Technol.*, *9*, 366-368 (1976).
- [133] Ferreira A. C. S., Barbe J. Ch., Bertrand A.: *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 4356-4363 (2003).

- [134] Cutzach I., Chatonnet P., Dubourdieu D.: *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2340-2345 (2000).
- [135] Camara J. S., Marques J. C., Alves M. A., Ferreira A., C., S.: *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6765-6769 (2004).
- [136] Stávek J.: Aminokyseliny, víno a jeho senzoricke vlastnosti [online], dostupné z WWW: <http://www.enolog.cz/aminokyseliny-vino-a-jeho-senzoricke-vlastnosti>, [cit. 2011-03-01].
- [137] Stávek J.: Maillardova reakce-fenomén zrajících vín [online], dostupné z WWW: <<http://www.enolog.cz/maillardova-reakce-fenomen-zrajicich-vin>>, [cit. 2011-01-11].
- [138] Slaughter J. C.: *Biol. Rev.*, 74, 259-276 (1999).
- [139] IARC. Acrylamide. TA: IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans PG 1994; 60.
- [140] Čajka T., Dunovská L., Hajšlová J.: Úskalí při kvantifikaci akrylamidu v potravinách, Trendy v SPME a GC: strategie pro široké spektrum aplikací v různých oborech, VŠCHT Praha, 2005 [online], dostupné z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/18540/101.pdf>>, [cit. 2011-03-15].
- [141] 2-methylthiazolidine, copyright © 1980 - 2011 [online], dostupné z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/18540/101.pdf>>, [cit. 2011-03-05].

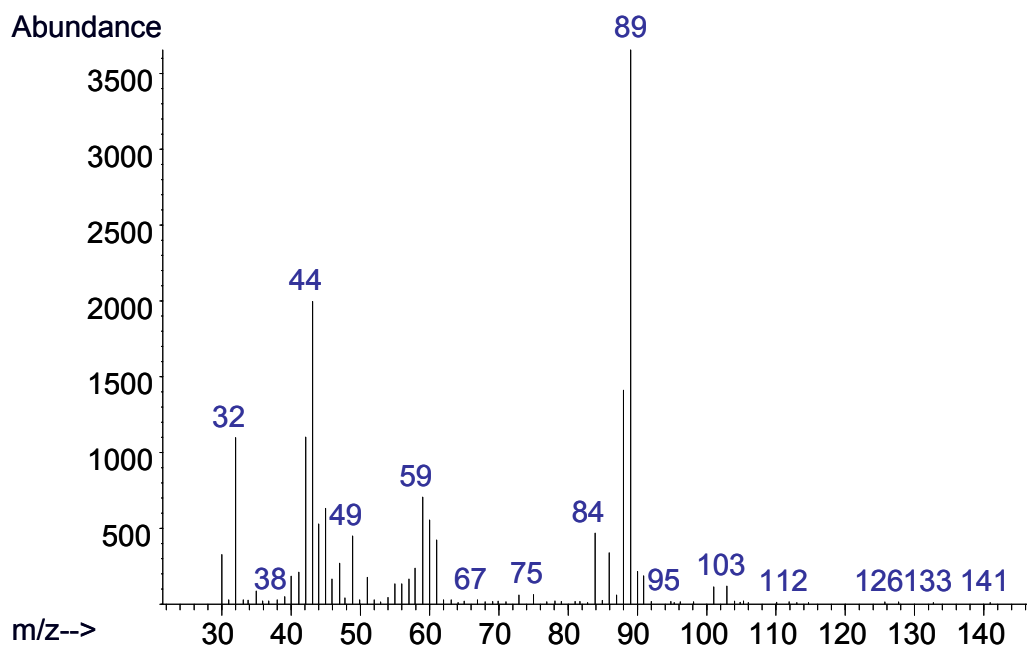
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AA	anhydrid kyseliny octové
ACN	acetonitril
ADP	adenosindifosfát
Ala	alanin
As	asymetrický faktor
ATP	adenosintrifosfát
BEA	2-N-benzylethanolamin
BHA	benzylhydroxylamin
BSA	bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
DCTFA	1,3-dichlortetrafluoroaceton
DCTFA	1,3-dichlortetrafluoroaceton
DKS	derivát karbonylové sloučeniny
DMDAS	dimethyldiacetoxysilan
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazon
DVB	divinylbenzen
ECD	detektor elektronového záchytu
EI+	pozitivní elektronová ionizace
FFAP	volná nasycená kyselá fáze
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
Gly	glycin
HFBA	anhydrid kyseliny heptafluormásečné
HFBI	heptafluorobutyrylimidazol
His	histidin
HMDS	hexamethyldisilazan
HMP	2-(hydroxymethyl)-piperidin
HPLC	kapalinová chromatografie
HS	head-space
Ile	isoleucin
KS	karbonylová sloučenina
Leu	leucin
L-L	extrakce kapalina-kapalina
Lys	lysin
M	molární hmotnost
MBTFA	N-methyl-bis(trifluoroacetamid)

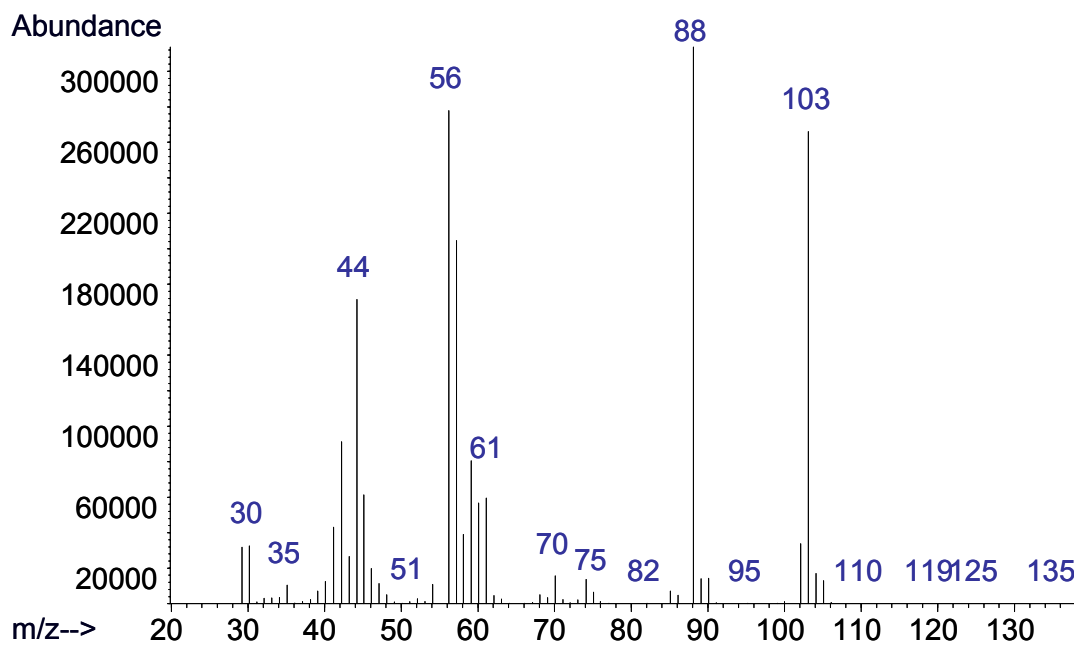
methyl-8-reagent	N,N-dimethylformamid dimethylacetal
MS	hmotnostní spektrometrie
MSA	N-methyl-N-trimethylsilylacetamid
MSTFA	N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamin
MTBSTFA	N-methyl-N-t-butyldimethylsilyltrifluoroacetamid
MX	3-chloro-4-(dichlormethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanon
N	počet teoretických pater
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaná nikotinamidadenindinukleotid
NCI	negativní chemická ionizace
NPD	dusíkofosforový detektor
OPDA	o-fenylendiamin
PDMS	polydimethylsiloxan
PEPOH	pentafluorpropanol
PFBBr	pentafluorbenzyl bromid
PFBCl	pentafluorbenzylchlorid
PFBHA	O-pentafluorbenzylhydroxylamin
PFBO	O-pentafluorbenzyloxim
PFPA	anhydrid kyseliny pentafluorpropionové
PFPH	pentafluorfenylhydrazin
PFPI	pentafluorpropionylimidazol
Phe	fenylalanin
Pi	monofosfát (PO_4^{3-})
Pro	prolin
SIM	selektivní iontová hmota
SPE	extrakce tuhou fází
TBDMS	t-butyldimethylsilylová skupina
TCPH	2,4,6-trichlorfenylhydrazin
TFAA	anhydrid kyseliny trifluoroctové
TFAI	trifluoracetylimidazol
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonin
TMAH	trimethylanilinium hydroxid
TMCS	trimethylchlorsilan
TMS	trimethylsilylová skupina
TMSDEA	N,N-diethyl-N-trimethylsilylamin
TMSDMA	N,N-dimethyl-N-trimethylsilylamin
TMSIM	trimethylsilylimidazol
Tyr	tyrosin
Val	valin

8 PŘÍLOHY

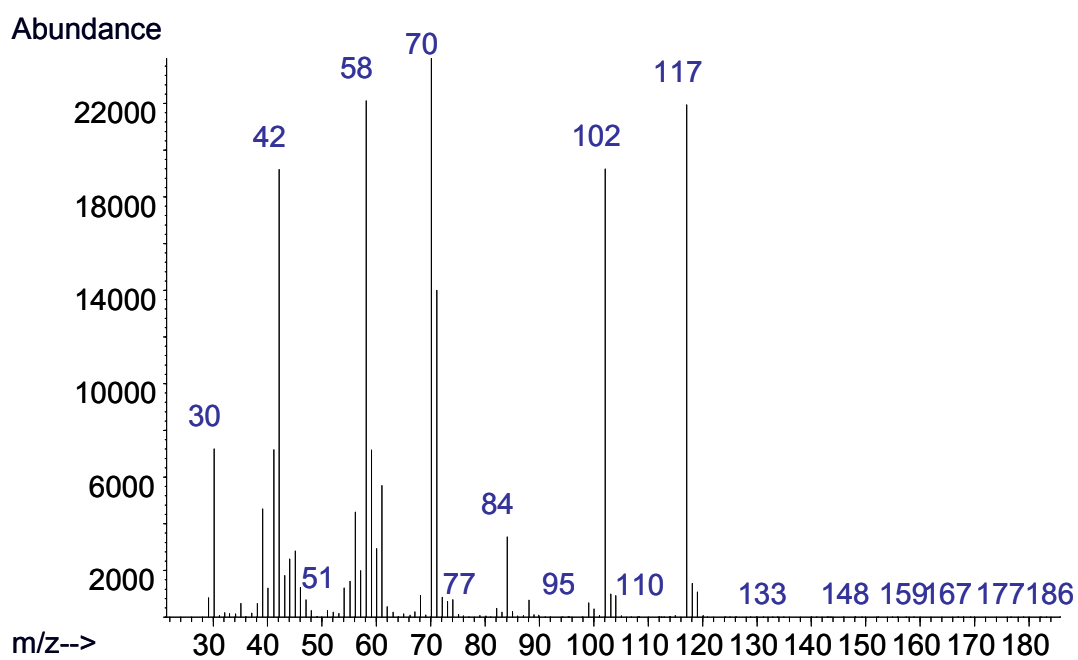
8.1 Hmotnostní spektra derivátů karbonylových sloučenin



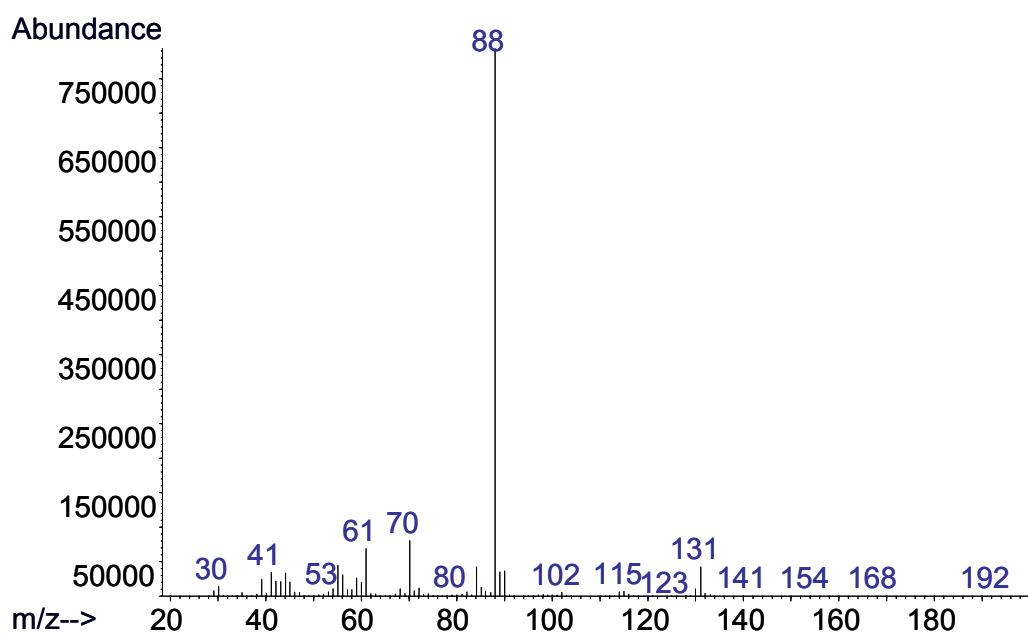
Obr. 76: Thiazolidin



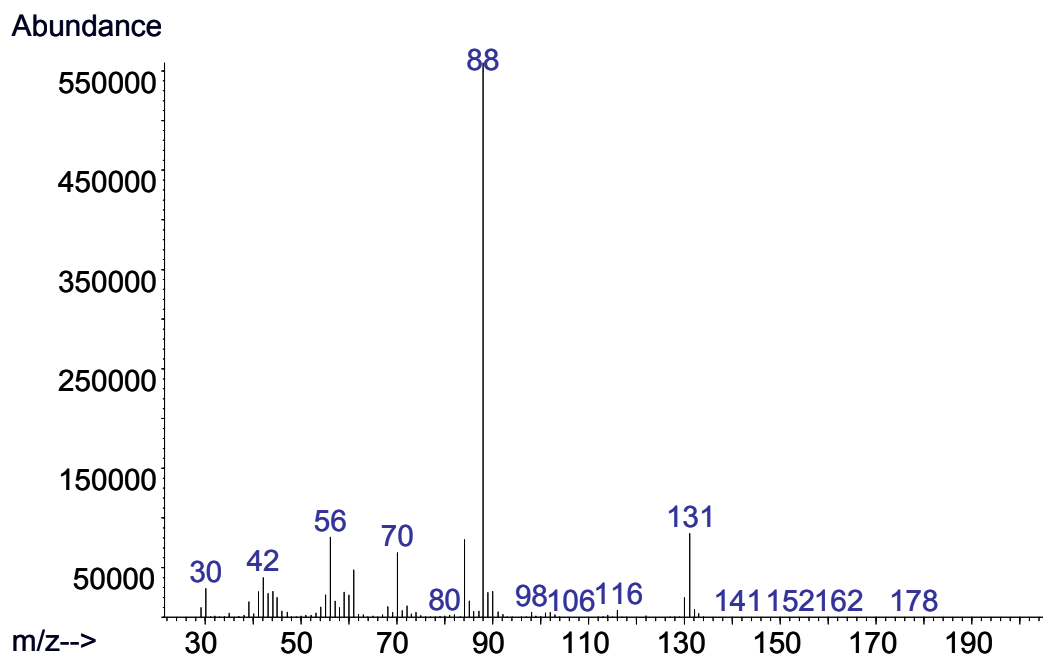
Obr. 77: 2-methylthiazolidin



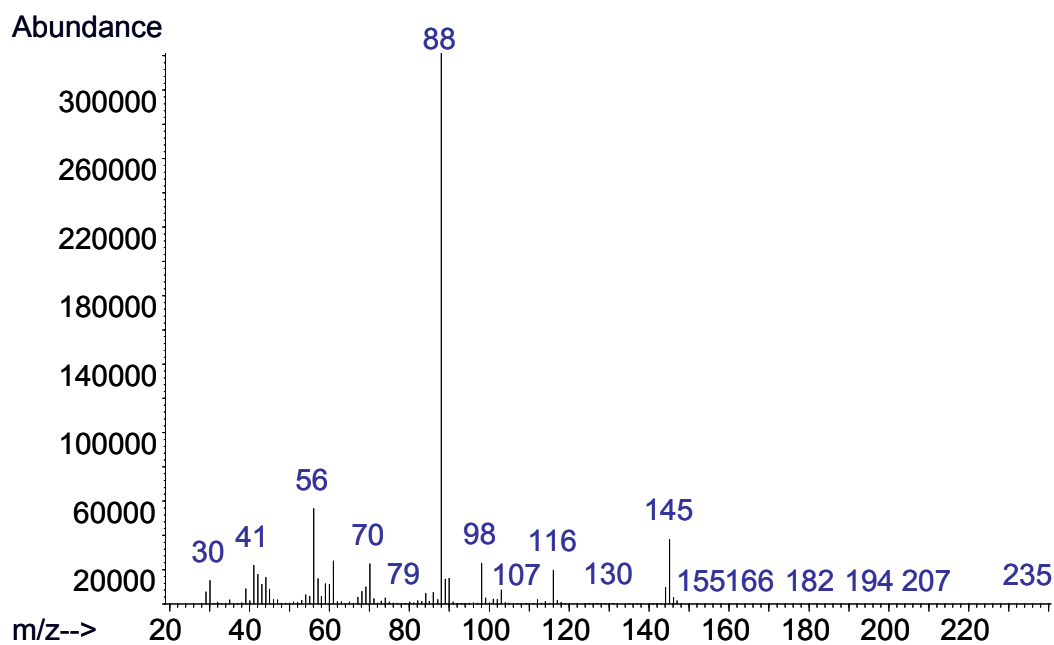
Obr. 78: 2,2-dimethylthiazolidin



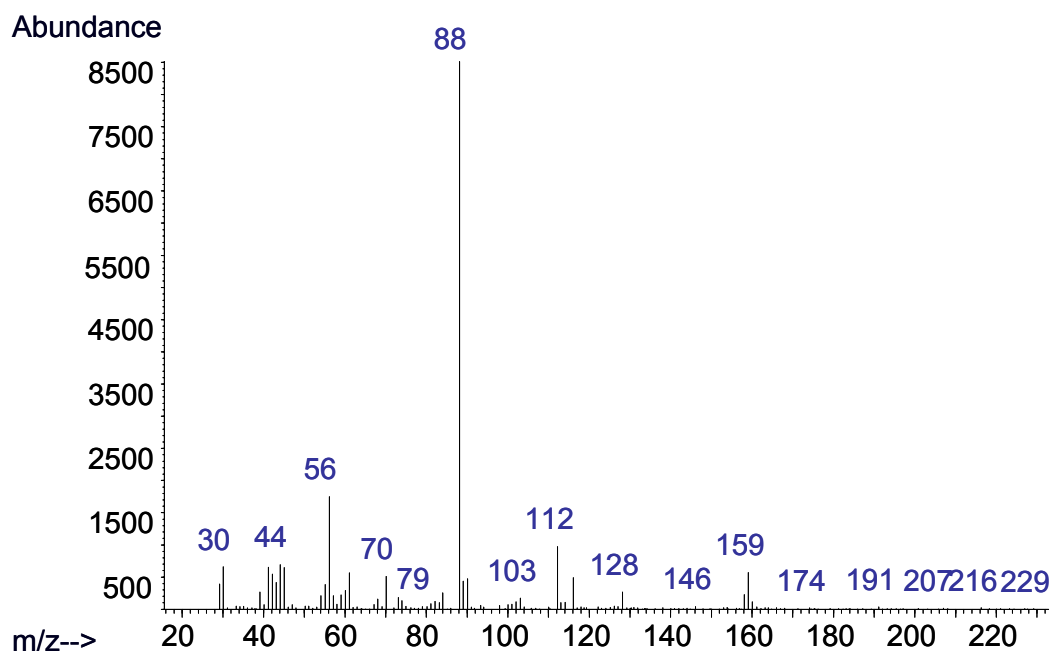
Obr. 79: 2-isopropylthiazolidin



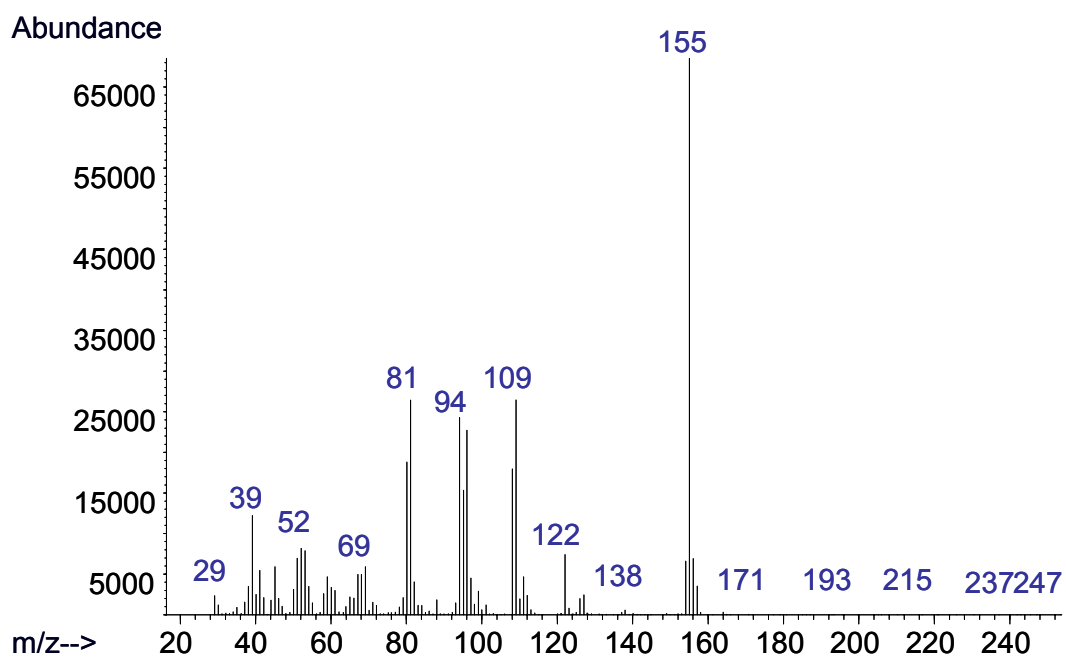
Obr. 80: 2-propylthiazolidin



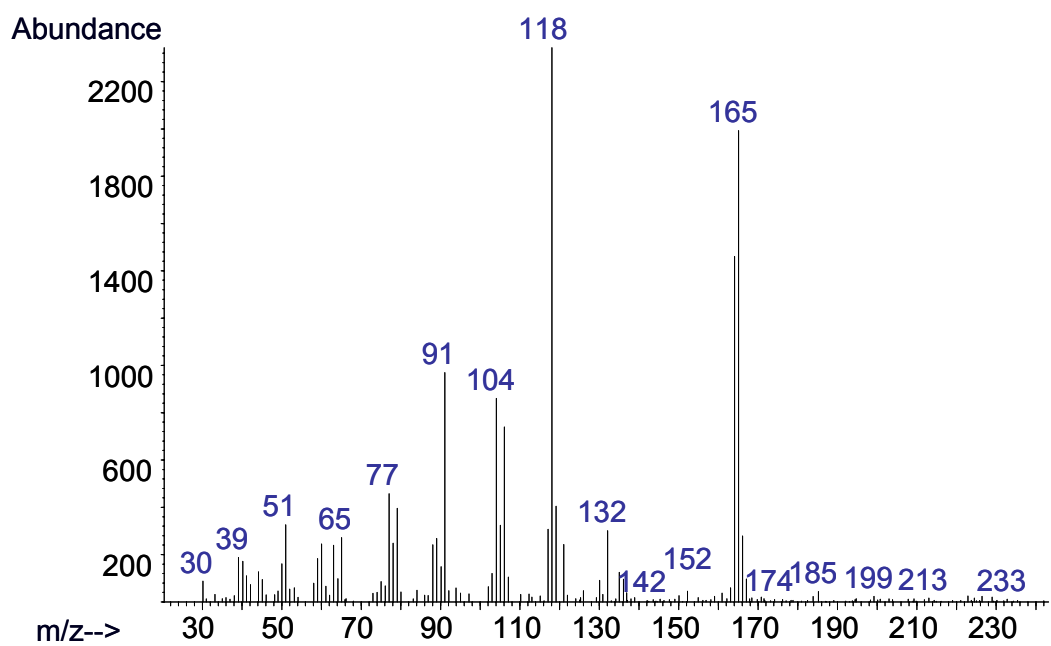
Obr. 81: 2-butylthiazolidin



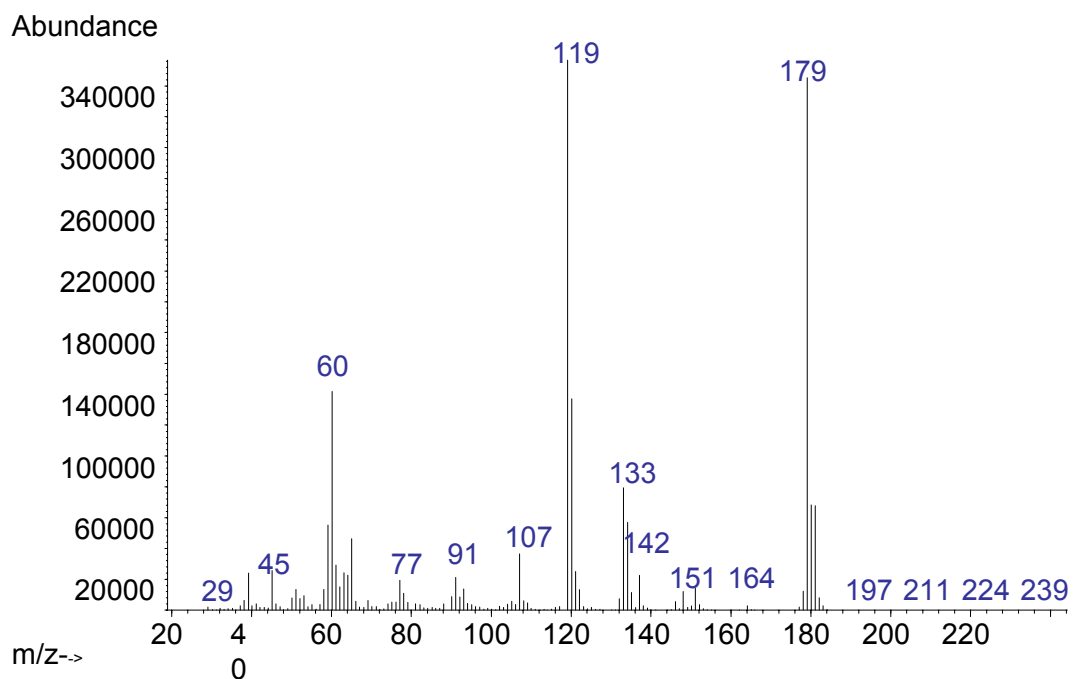
Obr. 82: 2-pentylthiazolidin



Obr. 83: 2-(2-furyl)thiazolidin

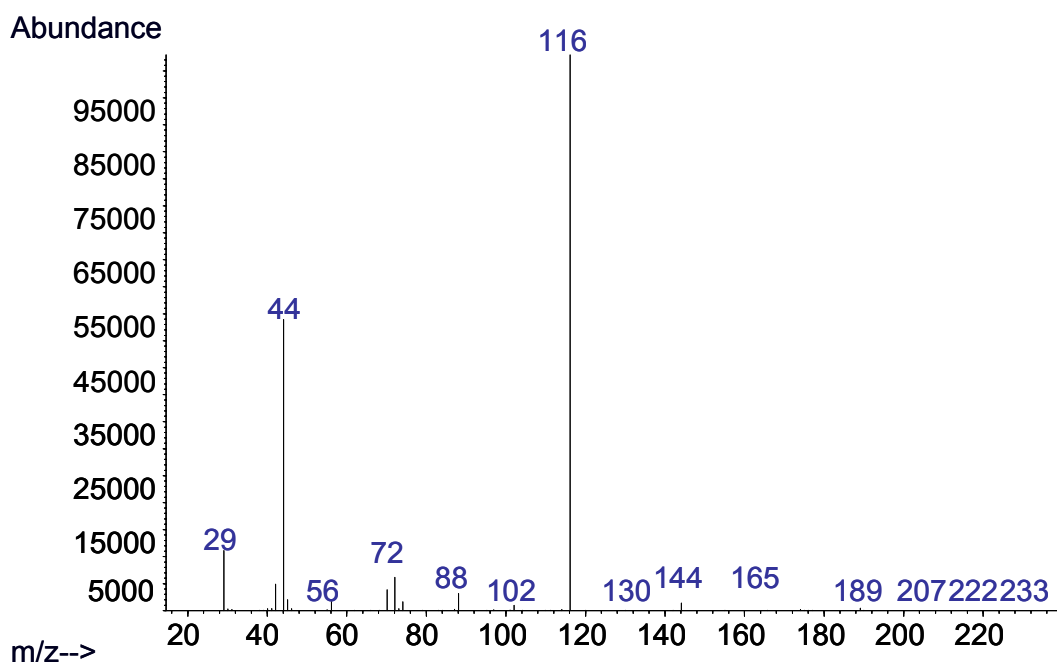


Obr. 84: 2-fenylthiazolidin

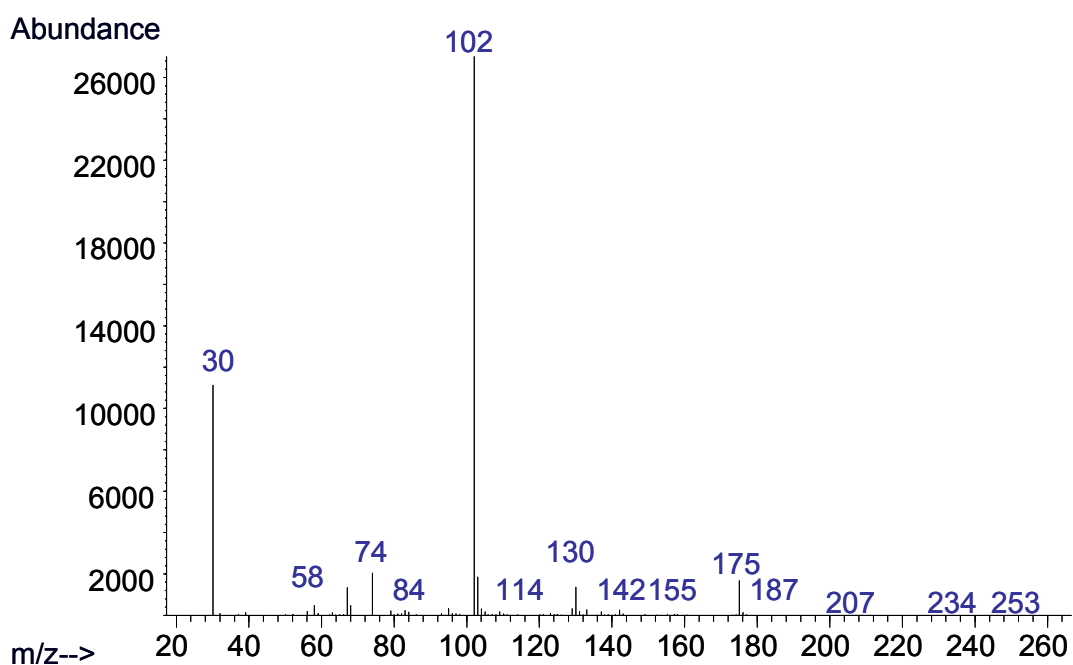


Obr. 85: 2-(4-hydroxy)-fenylthiazolidin

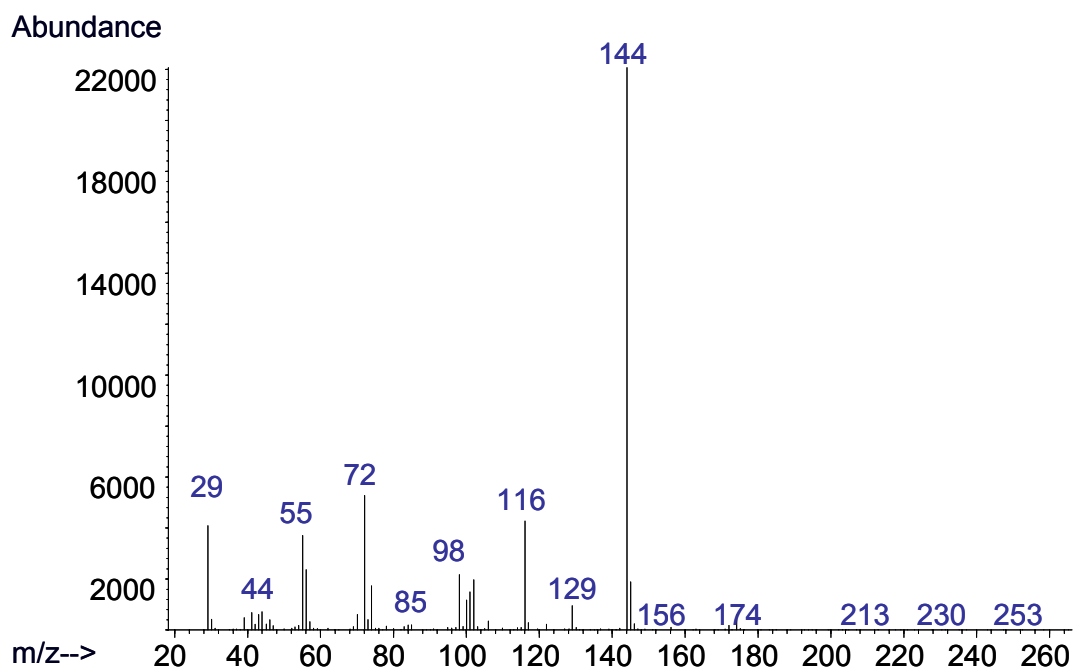
8.2 Hmotnostní spektra derivátů aminokyselin



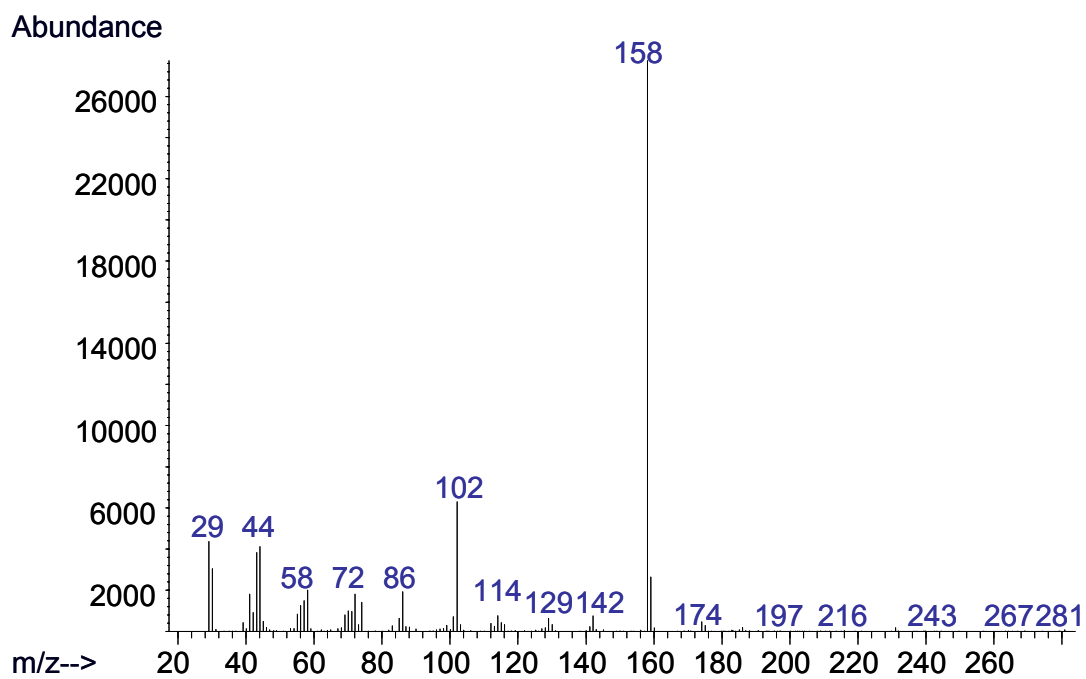
Obr 86: ethylester N-(ethoxykarbonyl) alaninu



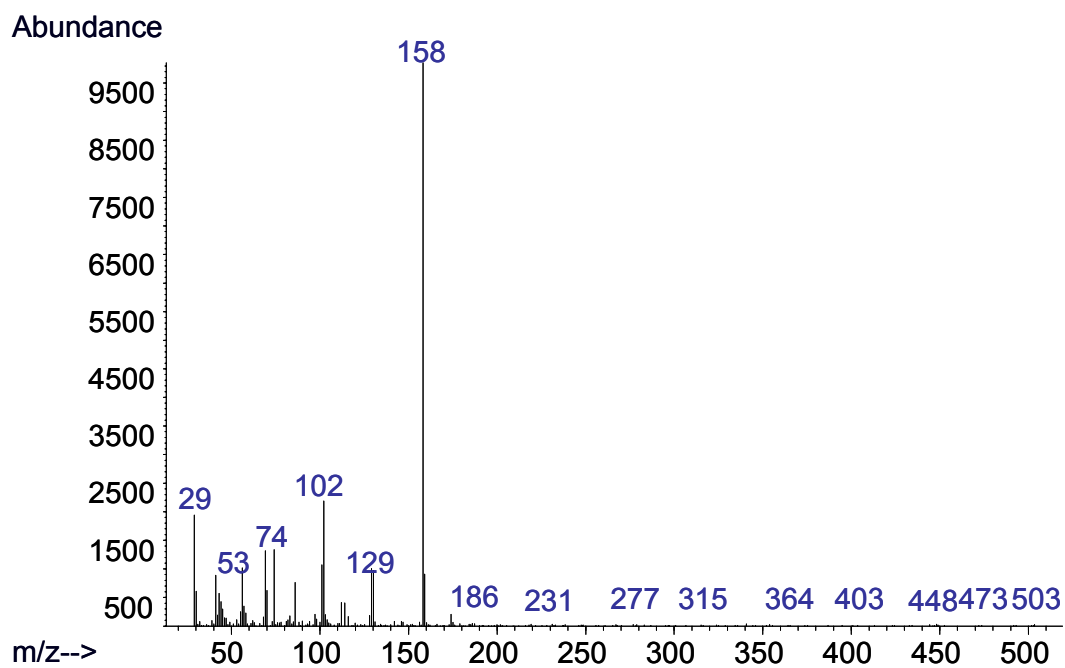
Obr. 87: ethylester N-(ethoxykarbonyl) glycinu



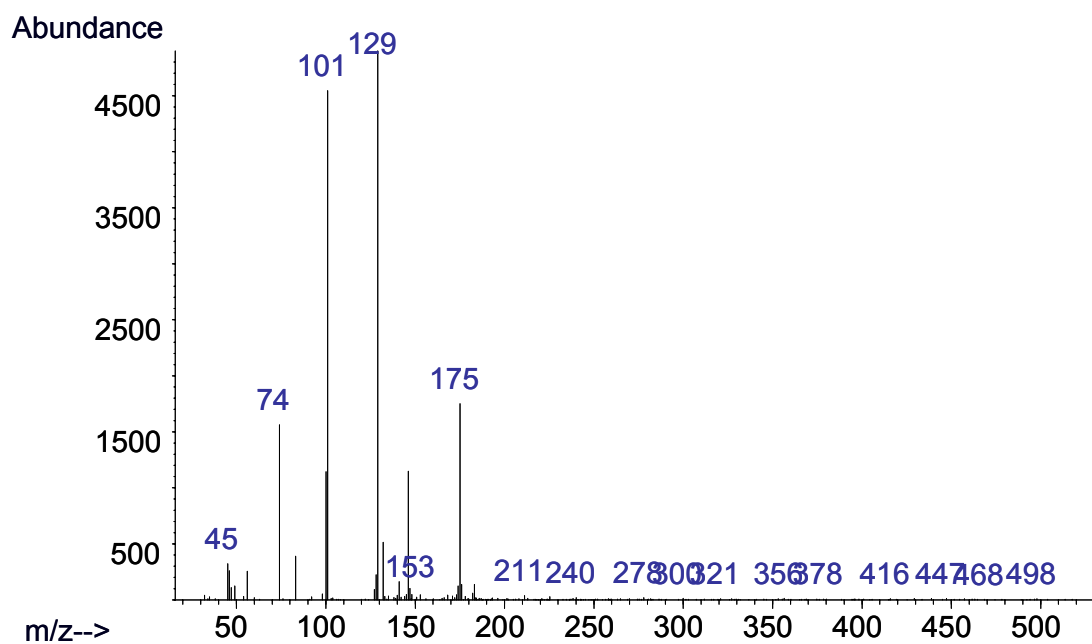
Obr. 88: ethylester N-(ethoxykarbonyl) valinu



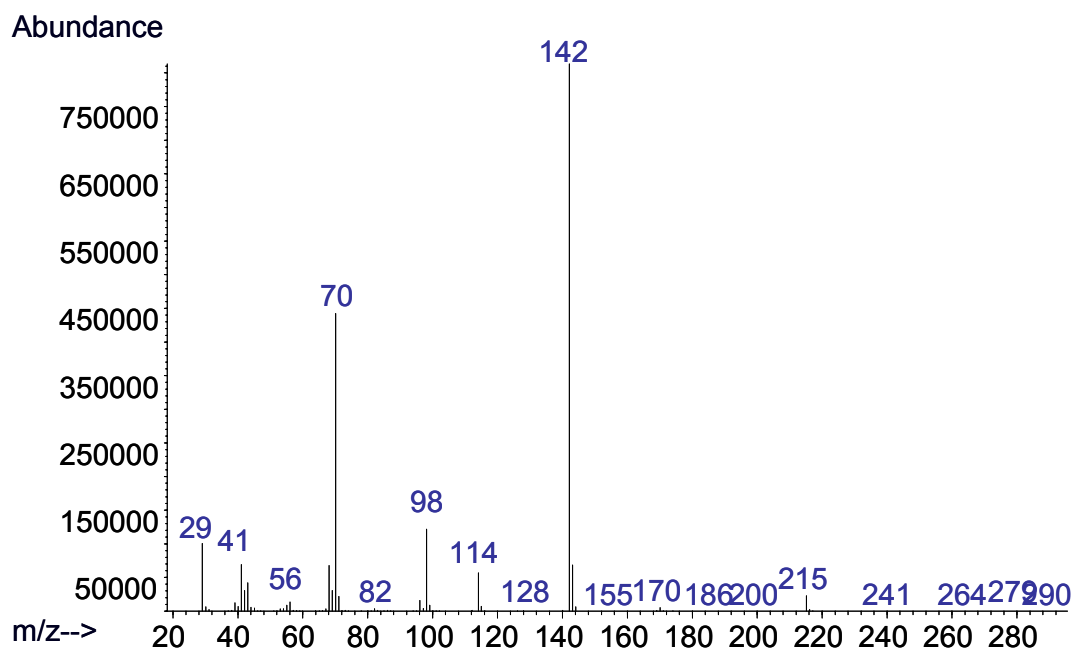
Obr. 89: ethylester N-(ethoxykarbonyl) leucinu



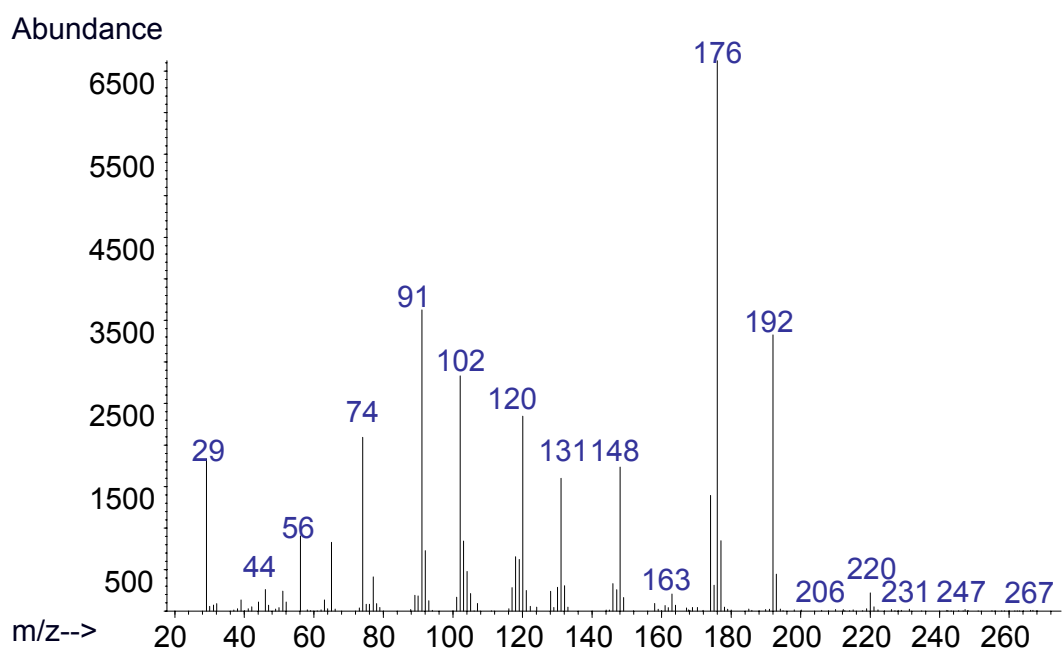
Obr. 90: ethylester N-(ethoxykarbonyl) isoleucinu



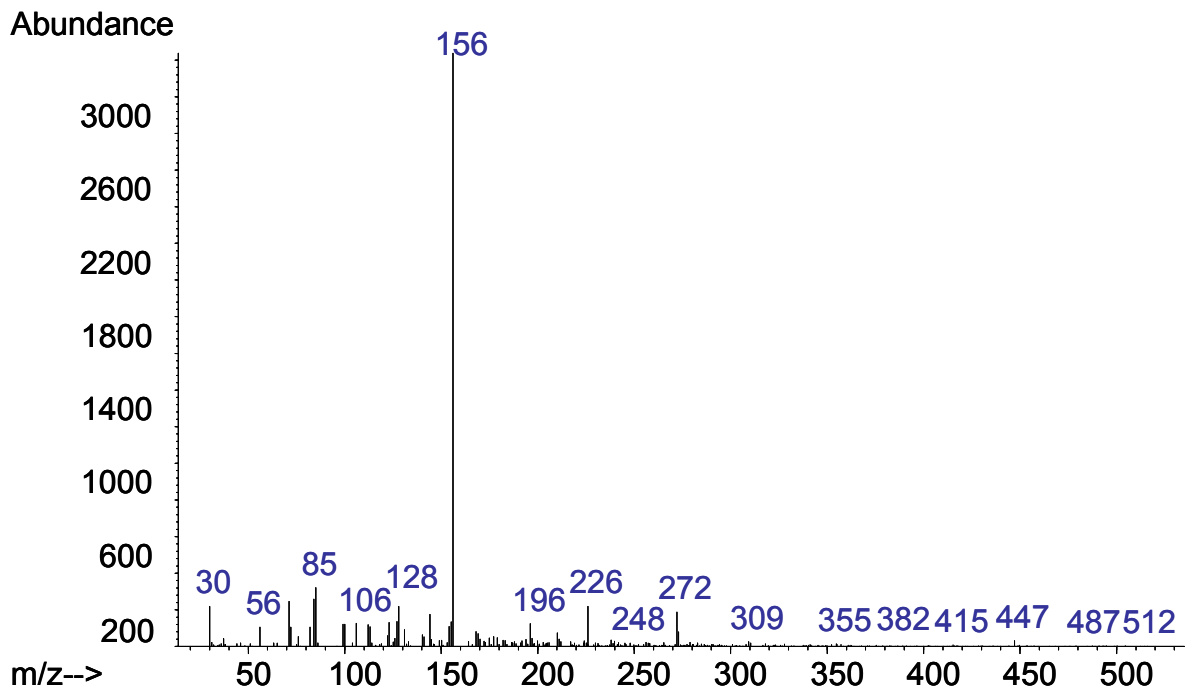
Obr. 91: ethylester N-(ethoxykarbonyl) threoninu



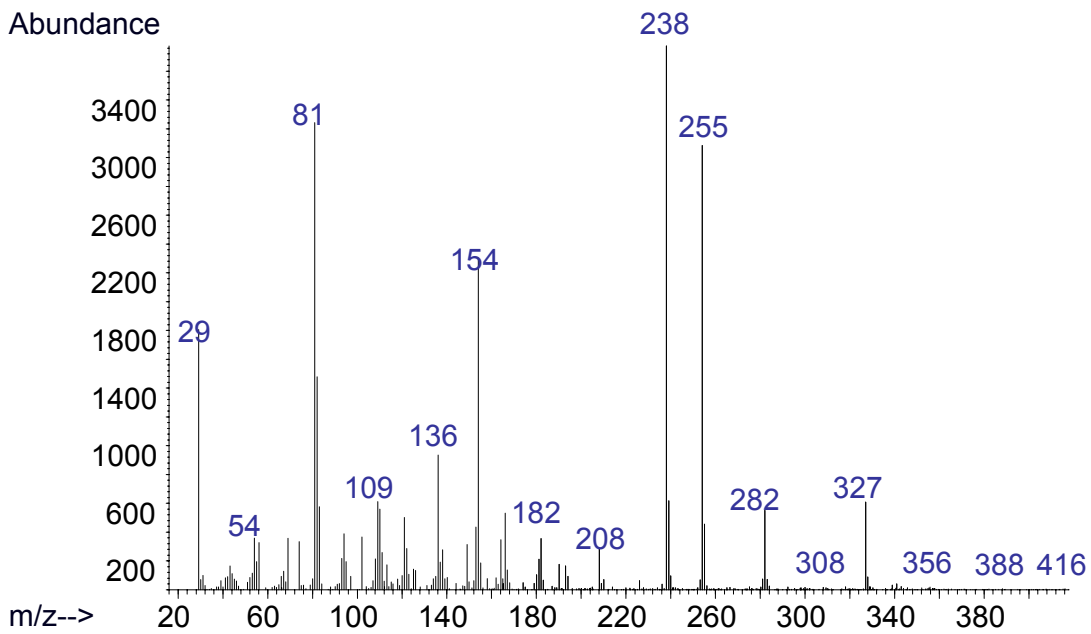
Obr. 92: ethylester N-(ethoxykarbonyl) prolinu



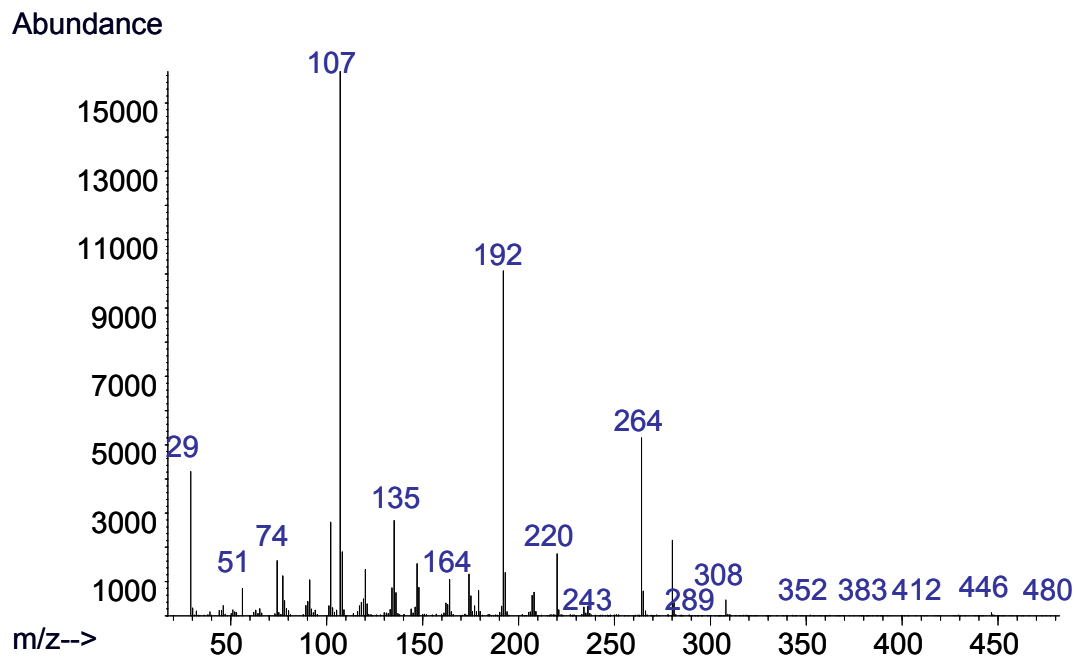
Obr. 93: ethylester N-(ethoxykarbonyl) fenylalaninu



Obr. 94: ethylester N-(ethoxykarbonyl) lysinu



Obr. 95: ethylester N-(ethoxykarbonyl) histidinu



Obr. 96: ethylester N-(ethoxykarbonyl) tyrosinu