

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Identifikace vonných látek v bylinných likérech

B1407 Chemie

2010

Vypracoval: Pavel Kufa

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Petr Barták Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci psal zcela samostatně pod odborným vedením Doc.RNDr. Petra Bartáka Ph.D.a za použití pramenů uvedených v seznamu literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne __ . __ . 2010

.....

Chtěl bych tímto upřímně poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Doc. RNDr. Petru Bartákovi Ph.D. za vedení mé práce, užitečné rady, za ochotu a čas.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 4 |
| I. TEORETICKÁ ČÁST | 6 |
| 1 VŮNĚ LIKÉRŮ | 6 |
| 2 ZÁKLADY POUŽITÉ INSTRUMENTACE | 10 |
| 2.1 SPME | 10 |
| 2.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE..... | 11 |
| 2.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE..... | 13 |
| 2.4 GC-MS | 16 |
| II. PRAKTICKÁ ČÁST | 19 |
| 3 PRACOVNÍ POSTUP A INSTRUMENTACE | 19 |
| 3.1 CHEMIKÁLIE A MATERIÁL..... | 19 |
| 3.2 INSTRUMENTACE | 19 |
| 3.3 POSTUP PRÁCE | 20 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 22 |
| 4.1 ANALÝZA SMĚSI N-ALKANŮ | 22 |
| 4.2 ANALÝZA VZORKŮ LIKÉRŮ | 23 |
| ZÁVĚR | 34 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 35 |
| PŘÍLOHY | 37 |

ÚVOD

Mnohé likéry, alkoholické nápoje vyráběné luhováním bylin a koření v lihu, mají staletou tradici a byly inzerovány a užívány jako domácí medicína (nostrum remedium). V průběhu 19.století se právě na těchto produktech vyvinulo mnoho nových reklamních a obchodních technik. Zde uvádím úryvek z herbáře vyjadřující se k tehdejší situaci:

„V novější době vyskytlo se tolik léků tajných, zázračných, jež vychvalují se proti všem nemocím, že to povinností lékaře a lidumila, varovati obecnstvo před kupováním léků těchto. Hlavní okolností, která zasluhuje uvážení, jest, že vyrábitelé těchto léků jsou obyčejně osoby, jež o lékařství nemají ani zdání, a výrobky své, úplně nečinné nebo nejisté, ba i nebezpečné prodávají za přílišné ceny na újmu obecnstva. Jsou to vesměs látky známé a smíšeniny. Mnohé z léků těch jsou prostředky počišťovací, a sice takové, jež nyní lékaři neradi předpisují, jež si však obecnstvo přeje; mnohé slibují účinek proti neduhům, jež lékař obyčejně vyléčiti nedovede, jako jsou: padoucnice, soucotě, dna, cholera, následky hejření a tajných hříchů, pokousání od psa vzteklého atd. ... Nelze popřít, že prudké léky, jestli se nerozumně upotřebí, účinkují jako jedy, že způsobí nemoci nebezpečné, chřadnutí a také smrt. ... Dryáčníci pak a mastičkáři, švindlíři, vychvalujíce tajné léky, radí je a posílají každému, nezkoumajíce dříve, zdali se proň hodí čili nic. Nikde se nepracuje tak na škodu a záhubu lidstva a jeho zdraví, ani při falšování potravin a nápojů, proti čemuž policie zakročuje, jako v oboru tomto. ... Veškeren švindl s tajnými léky zasluhuje odsouzení, nejen z ohledů lékařských, nýbrž proto, že se obecnstvo podvádí; s lehkověrností nemocných ubožáků provozuje se hanebná hra ošemetná, a zároveň jeví se snaha lidi ohlupiti. Podvod provozovaný v tomto odboru jest tak veliký, že v žádném jiném odvětví průmyslu neděje se cos podobného. ... Švindlíři tito vydělají nesmírné peníze; proto věnují tolik na inserty. Velmi často upotřebí se k hotovení léků těch zkažených a nečistých věcí, na př. zkažené víno, plesnivé staré soli a byliny atd. ... Dryáčnictví jest článkem důležitým v řetězu, jež tvoří různé prostředky klamné, jimiž mastičkáři, hádači, magnetisérové a pod. podvodníci otočiti se snaží národy, by v prospěch svůj je drancovali. Každý, komu záleží na tom, by člověčenstvo pokročilo, musí počítí zápas proti tomu, jako vůbec proti všelikému podvádění.“ [1]

Technologie přípravy likérů je založena na docela primitivních principech, proto byla také receptura (poměr jednotlivých bylin a koření) vždy střežena jako nejdůležitější část výrobního tajemství. S rozvojem instrumentálních technik analytické chemie je možno identifikovat vonné (těkavé) látky a z nich usuzovat na ingredience použité při výrobě.

K extrakci vonných látek byla vybrána HS-SPME, metoda vyvinuta před dvaceti lety Pawliszynem a kolektivem na University of Waterloo v Kanadském Ontariu. K separaci a detekci extrahovaných těkavých sloučenin byla zvolena multidimenzionální technika GC-MS.

Zmíněná kombinace analytických metod (HS-SPME-GC-MS) již byla v minulosti použita v oblasti analýzy potravin (kávy [2], coly [3], whisky [4], pálenky [5]), vůni květin [6], esenciálních olejů [7 – 10], pesticidů [11]. Cílem práce je identifikovat těkavé látky v bylinných likérech.

I. TEORETICKÁ ČÁST

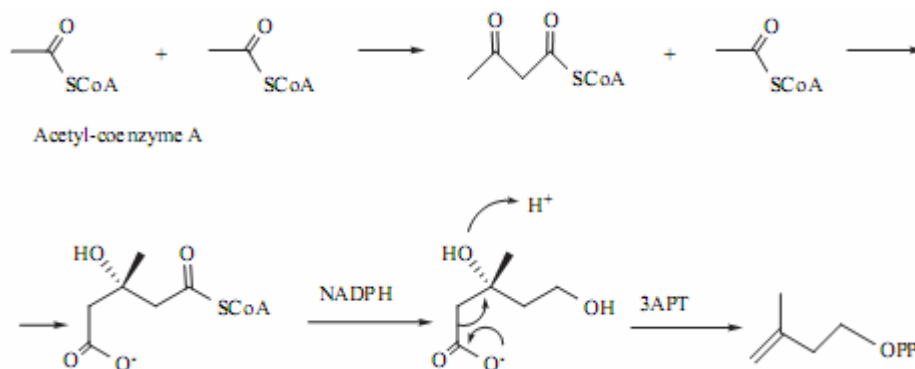
1 VŮNĚ LIKÉRŮ

Vůně (olfaktorický vjem) likérů je způsobena podrážděním čichových receptorů specifickými těkavými látkami v malé koncentraci, jež mají původ v rostlinném materiálu (drogách), který je vyluhován potravinářským lihem, jenž sám o sobě voní sladce.

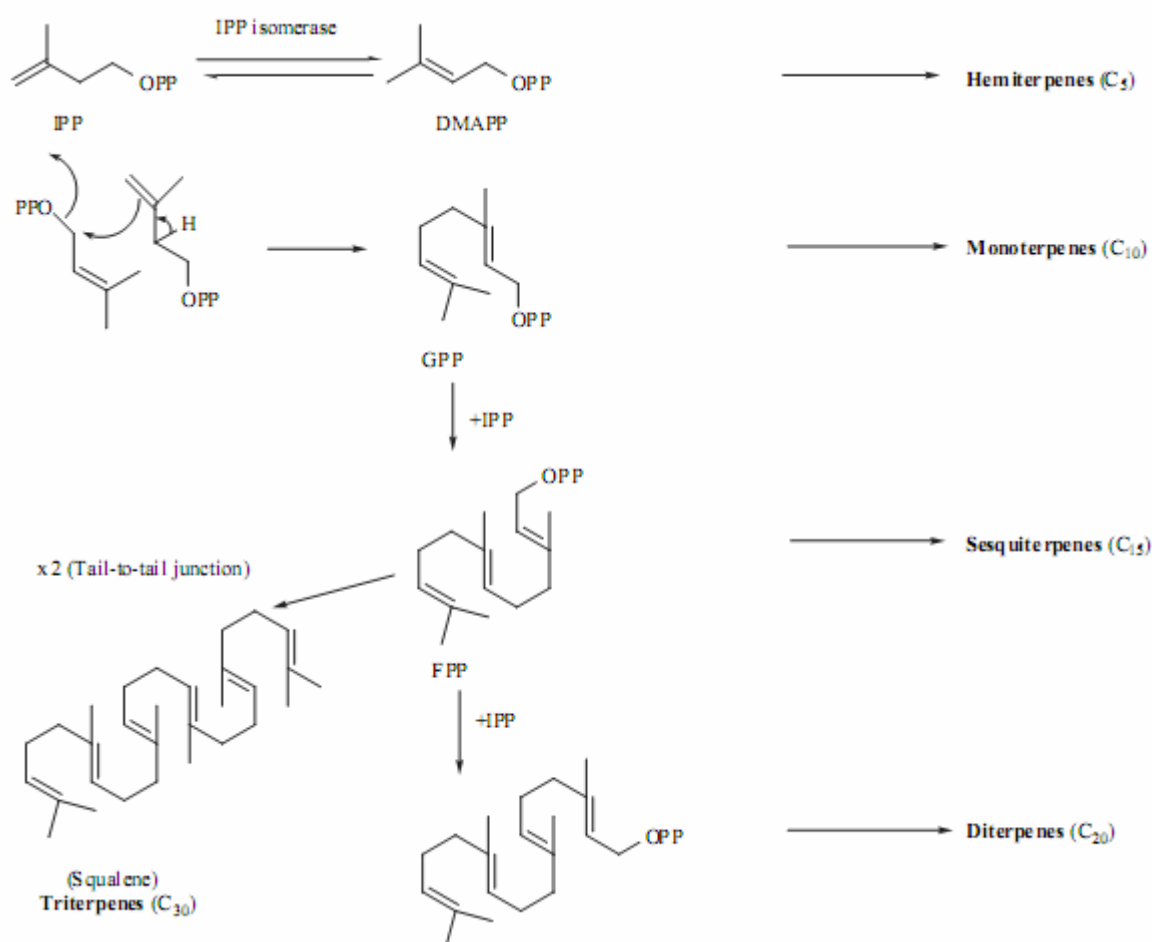
Vyluhování (extrakce) se provádí několikerým způsobem, buď za studena (macerace, perkolace) nebo za tepla (digesce). Při maceraci se droga zaplaví rozpouštědlem, nechá se určitou dobu vyluhovat a pak se macerát stáhne. Perkolace se provádí ve válcovitém perkolátoru napěchovaném drogou, přes kterou se prolévá rozpouštědlo. Digerace je extrakcí za mírně zvýšené teploty (do 50 °C), používá se pro tvrdé části drog (kořeny, stonky) [12].

Arómata mají svůj původ v rostlinných silicích, olejovitých směsích hydrofobních látek, které jsou nejčastěji tvořeny terpeny, terpenoidy (terpenové deriváty), aldehydy, estery a dalšími. Většinou se jedná o produkty sekundárního metabolismu, nepodílejí se na růstu a vývoji organismu (jsou neesenciální pro život, ačkoliv pro organismus důležité). Často mají neznámou funkci, ale mohou působit například jako signální sloučeniny, pro obranu nebo zdokonalují některé z funkcí organismu. Pro různé organismy se tyto látky liší ačkoli se syntetizují pouze z malého množství primárních metabolitů, což je podkladem pro jejich obecnou klasifikaci – terpenoidy, alkaloidy, fenolické sloučeniny apod.

Struktura terpenů je postavena z jednotek isoprenu, podle počtu isoprenových jednotek podílejících se na molekule je dělíme na: 1 – hemiterpeny, 2 – monoterpeny, 3 – seskviterpeny, 4 – diterpeny atd. . Aromatické využití mají především mono- a seskviterpeny. V biosyntéze terpenů nedochází k jejich výstavbě z jednotek isoprenu, ale kondenzací tří jednotek Acetyl-CoA za vzniku prekurzoru (obr. 1) , který se dále spojuje s dalšími (obr. 2). [13].

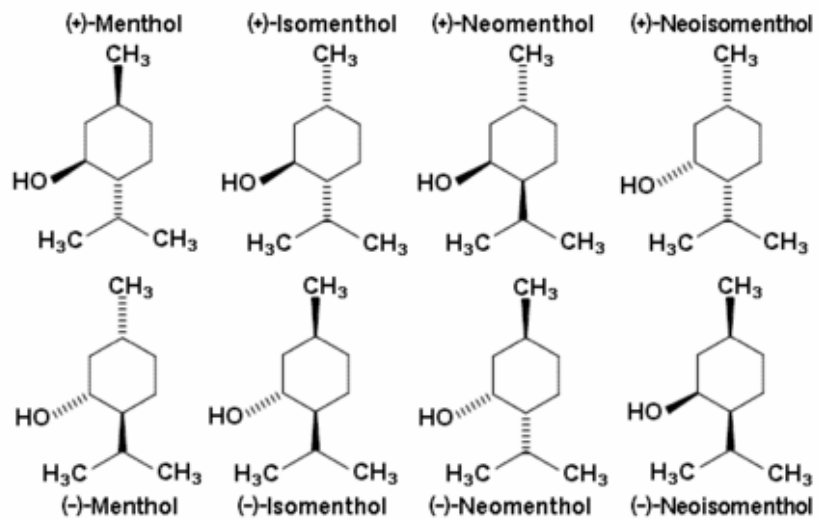


Obr. 1. Biosyntéza prekursoru (isopentenyl pyrofosfátu), upraveno podle [14]

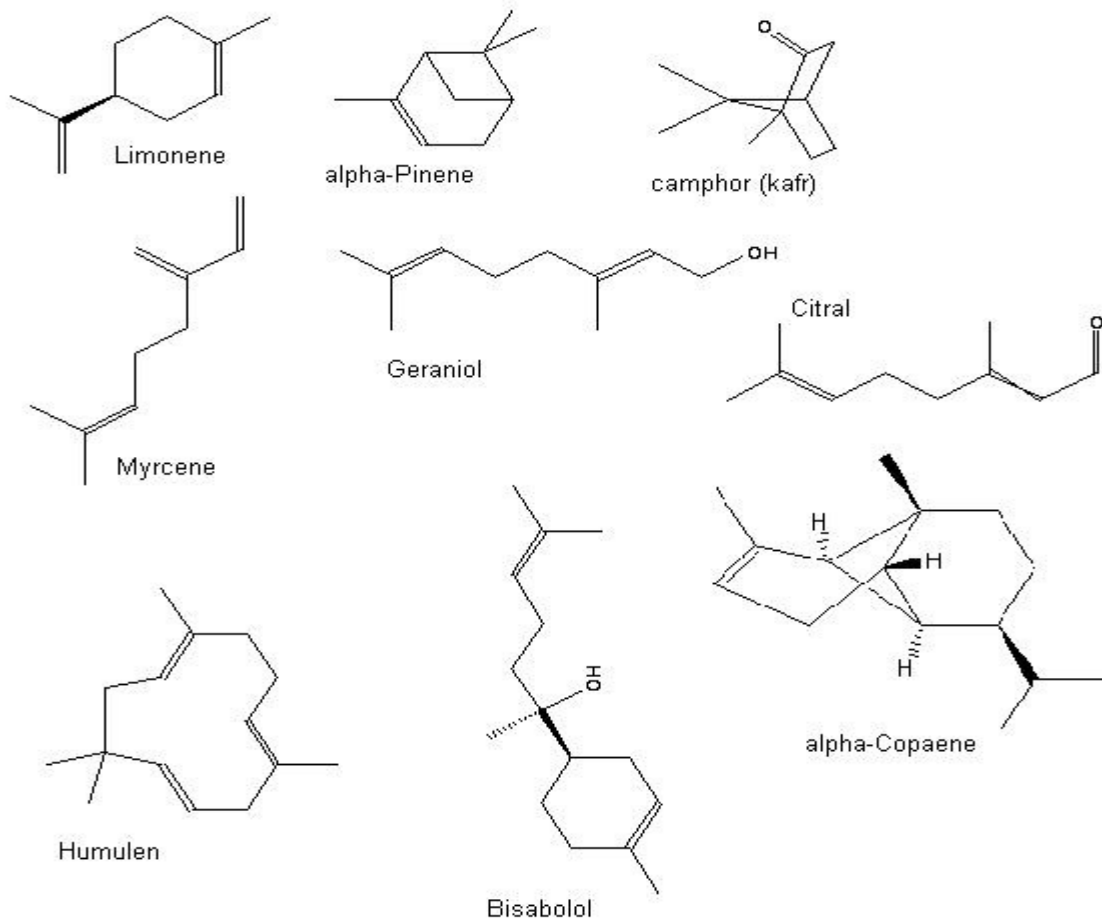


Obr. 2. Biosyntéza terpenů, upraveno podle [14]

Monoterpeny ($C_{10}H_{16}$) a jejich deriváty (obr. 3) mohou být alifatické, monocyklické i bicyklické, seskviterpeny ($C_{15}H_{24}$) mívají i tři cykly, nesou vžitá triviální pojmenování, přičemž se mohou vyskytovat ve více geometrických i optických isomerických formách. Kupříkladu menthol se svými třemi asymetrickými uhlíky existuje v osmi (2^3) stereoisomerech (obr. 4) [15].

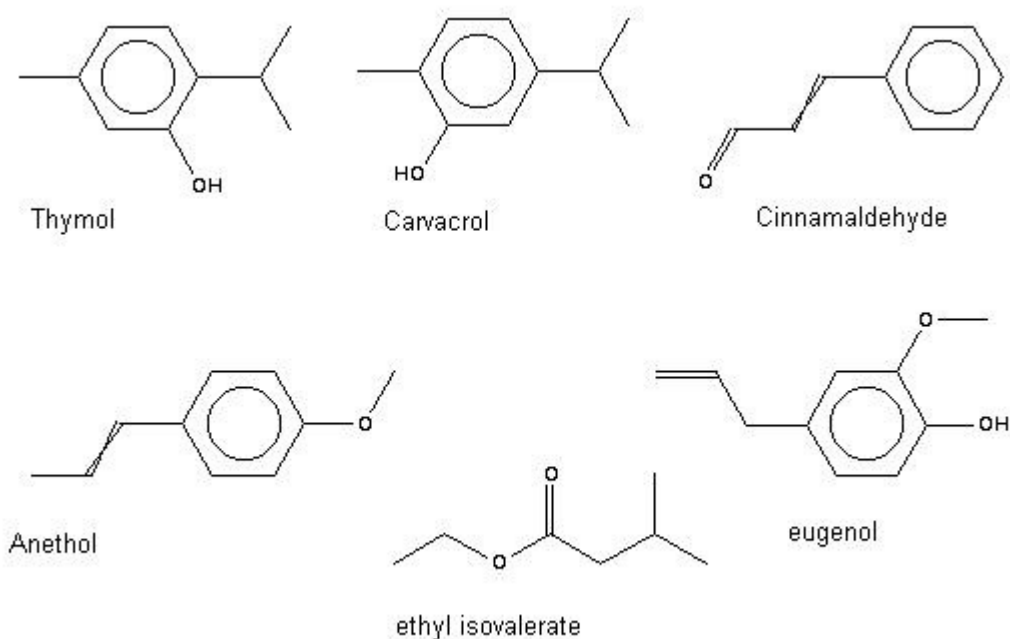


Obr. 4. Stereoisomery mentholu



Obr. 3. Příklady mono- a seskviterpenů a terpenoidů

Vůni drogy charakterizují těkavé látky, jež jsou charakteristické pro daný druh, zároveň složení a podíl vonných látek se liší v jednotlivých částech rostliny. Kupříkladu citronovou vůni má citral, citronellol, limonene a geraniol; mátovou (menthol, eucalyptol, carvone), dřevěnou (humulene, aromadendrene...), anýzovou (anisol, anethol), skořicovou (cinnamaldehyde), hřebíčkovou (eugenol, β -caryophyllene), oregánovou (thymol). Estery voní po ovoci, mnoho formátů voní po švestkách, isovaleráty mají jablečnou vůni apod.[12, 16]



Obr. 5. Příklady několika neterpenoidních vonných látek

2 ZÁKLADY POUŽITÉ INSTRUMENTACE

2.1 SPME

SPME metoda (solid phase microextraction) je jednoduchá, propracovaná a rychlá sorpčně/desorpční technika pro přípravu vzorku (zakoncentrování analytu). Jedná se o sorpci na tuhou fázi. Lze ji použít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Oproti extrakci kapalinou odpadá používání rozpouštědel, což snižuje náklady na čas a rozpouštědla o vysoké čistotě .

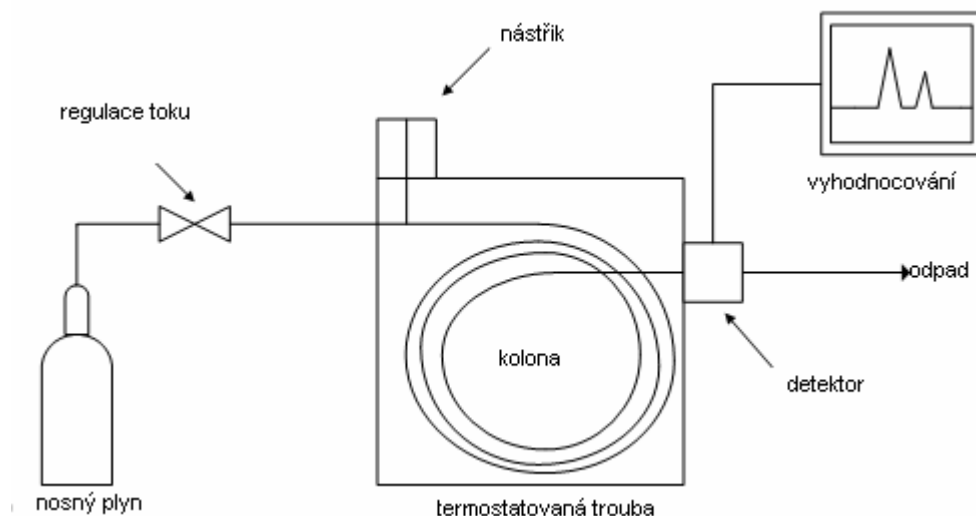
Princip je shodný s klasickou extrakcí na tuhou fázi (SPE), liší se jen technika provedení. Základem je tenké vlákno z taveného křemene umístěné v duté ocelové jehle. Vlákno bývá pokryto různými typy stacionárních fází, které se od sebe liší rozdílnou polaritou a tloušťkou vrstvy tedy sorpčními vlastnostmi, což do značné míry ovlivňuje faktor selektivity. Polymery na pokrytí vlákna se používají buď jednodruhové nebo směsné – polyakrylát (PA), polydimethylsiloxan (PDMS), carbowax (CW) a divinylbenzen (DVB).

Základní provedení sorpčního (adsorpce + absorpce) stupně experimentu spočívá v umístění vlákna do prostoru par nad kapalinou (head-space, HS-SPME) nebo přímé ponoření do kapaliny (direct immersing, DI-SPME) na určitou dobu. Dalším stupněm je analytická separace, což bývá plynová nebo kapalinová chromatografie (s adapterem pro SPME-HPLC). V dávkovači přístroje GC je vlákno zahřáto na teplotu 250 – 300 °C, při níž proběhne tepelná desorpce analytů z vlákna, které pak vstupují do separačního systému.

HS-SPME se od klasických extrakčních metod liší tím, že analyt není extrahován ze vzorku v co největším množství, ale pouze v koncentraci odpovídající rovnovážnému stavu mezi dvěma druhy rovnováh. Výtěžek závisí především na hodnotě rozdělovacího koeficientu rovnováhy L-G a G-S. Mez detekce je srovnatelná s extrakcí kapalinou, přestože se sorbuje jen část analytu, tak všechn extrahovaný je nastříknut do přístroje na rozdíl od extrakce rozpouštědlem.[17 – 19]

2.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Plynová chromatografie (gas chromatography, GC) je metoda instrumentální chemické analýzy pro separaci a stanovení především plyných a těkavých kapalných látek. Své označení nese podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. Princip metody jako takové spočívá v rovnovážném rozdělení analytu mezi mobilní a stacionární fázi na základě adsorpce a rozpouštění. Látky se dělí dle rozdílů v těkavosti a ve struktuře. Jako mobilní fáze se užívají permanentní plyny, například vodík, helium, dusík nebo argon. Zdrojem jejího pohybu je tlakový spád. Stacionární fáze má rozhodující vliv na selektivitu separace. V principu existují dvě možná uspořádání kolon, podle převládající významnosti mechanismu retence. Jako sorbenty se používají například různé formy grafitizovaného uhlíku, uhlíková i zeolitová molekulová síta, různé polymery či látky na bázi silikagelu nebo oxidu hlinitého. Pro rozpouštěcí mechanismus retence jsou to alifatické uhlovodíky a polymery na bázi dimethylsiloxanu (nepolární stacionární fáze) nebo ethylenglykolu (polární stacionární fáze). Další možností jsou směsné fáze, které však slouží spíše pro speciální účely.



Obr. 6. Schéma plynového chromatografu

Popsaný děj je sledován na konci kolony měřicím zařízením, jehož signál je úměrný množství analytu a citlivosti (ideálním výstupem by byla křivka – pík – odpovídající normálnímu Gaussovu rozdělení). Jako detektory lze použít například tepelně vodivostní, plamenově ionizační, detektor elektronového záchytu, ale také hmotnostní či infračervený spektrometr.

Separaci je možno charakterizovat několika veličinami. Retenční čas (t_R) je doba, za kterou látka od nástřiku doputuje kolonou k detektoru. Mrtvý čas (t_M) je doba, za kterou doputuje k detektoru látka, která se na koloně vůbec nezadržuje. Redukovaný retenční čas (t'_R) je pak doba, kterou látka stráví během putování kolonou ve stacionární fázi (lze ji vyjádřit rozdílem předchozích). K popsaným časům jsou dále definovány příslušné objemy (odpovídají objemům mobilní fáze proteklé kolonou za daný čas).

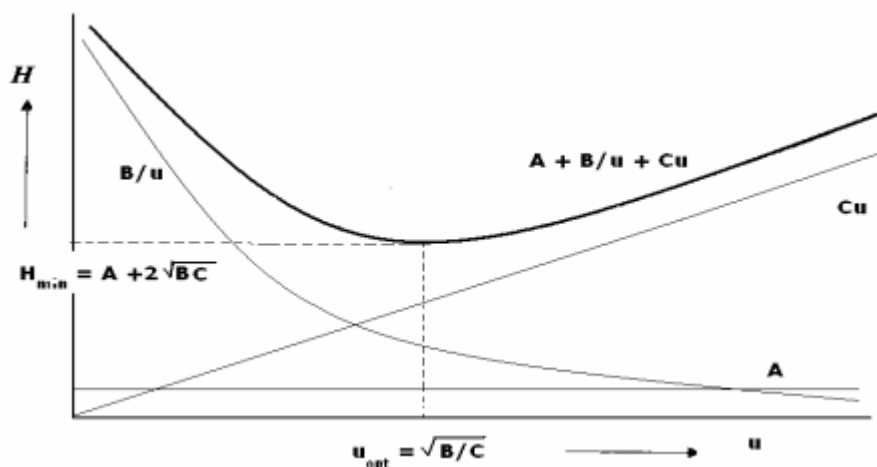
Důležitým měřítkem pro porovnání retence jednotlivých látek je kapacitní faktor (k), jenž je dán poměrem t'_R/t_M . Čím je jeho hodnota vyšší, tím je látka stacionární fází silněji zachycována. Jinou charakteristikou systému je selektivita (α) – schopnost separace dvou látek, závisí na specifických interakcích analyt-stacionární fáze určených jejich funkčními skupinami. Je dána poměrem kapacitních faktorů (retenčních časů), neinformuje však o kvalitě rozdělení. Ta je dána rozlišením (R), zahrnujícím mimo retenční čas i šířku píků (w_h – šířka píku v polovině jeho výšky, w_b – šířka píku na základní linii) – rovnice (1). Za dostatečně rozdělené považujeme analyty, jejichž rozlišení je větší nebo rovno 1,5.

$$R = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (1)$$

Kinetické aspekty analýzy vyjadřuje tzv. van Deemterova rovnice (2), kde H je výškový ekvivalent teoretického patra (délka kolony/počet teoretických pater), u lineární rychlost mobilní fáze, A koeficient odpovídající vířivé difuzi v mobilní fázi, B koeficient odpovídající axiální molekulární difuzi v mobilní fázi a C koeficient příspěvků odporu proti přenosu hmoty v mobilní i stacionární fázi.

$$H = A + \frac{B}{u} + C\bar{u} \quad (2)$$

Vířivá difuze souvisí především s nehomogenitami ve stacionární fázi, v případě dnes převážně používaných kapilárních kolon ji lze zanedbat. Molekulární difuzi lze charakterizovat pomocí Fickových zákonů a má souvislost s koncentračními gradienty v koloně. Odpor proti přenosu hmoty je určován difuzí analytu přes fázové rozhraní a závisí pro kapilární kolony na tloušťce stacionární fáze a kapacitním faktoru. Význam jednotlivých veličin je zřejmý z obr. 3, z praktického hlediska se však často volí průtoky o málo vyšší, než je optimální hodnota [20].



Obr. 7. Závislost výšky teoretického patra (H) na lineární průtokové rychlosti (u), upraveno podle [20]

2.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) je fyzikálně chemická metoda instrumentální analýzy sloužící k identifikování látek. Molekuly analyzované látky jsou nejprve ionizovány, čímž dochází k jejich rozpadu na fragmenty, které jsou pak rozděleny podle poměru hmotnost/náboj (m/z) a následně detekovány. Molekuly se stejným sumárním vzorcem lišící se strukturou také jinak fragmentují a mají tedy i rozdílná hmotnostní spektra. Při vhodné interpretaci spektra má metoda dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzované látky.

Iontový zdroj

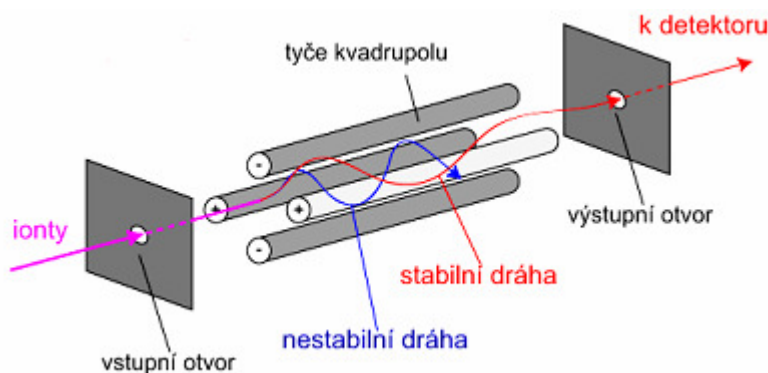
Prvním krokem hmotnostní analýzy je ionizace molekul, k čemuž dochází v iontovém zdroji. Existuje mnoho různých metod ionizace (dle účelu analýzy, velikosti molekuly, předřazené separační techniky, ...); pro běžnou strukturní analýzu malých organických molekul je zřejmě nejužívanější ionizace elektronem (electron ionization, EI). Elektrony emitované žhaveným kovovým vláknem, které proletí dostatečně blízko sledované molekuly jí předají část své energie, což způsobí vznik tzv. molekulárního iontu v podobě kation-radikálu (3). Vzhledem k přebytku předané energie (nejčastěji používaná energie elektronů je 70 eV) se tento molekulární iont ihned rozpadá na fragmenty (energie organických vazeb se pohybuje okolo 10 eV), ty mohou dále fragmentovat. Navíc může docházet k různým přesmykům, či ztrátám neutrálních částic (4, 5). Výhodou je, že pro

použité parametry dochází téměř výhradně ke tvorbě jednou nabitých částic, čímž se značně snižuje složitost interpretace spektra.



Analyzátory iontů

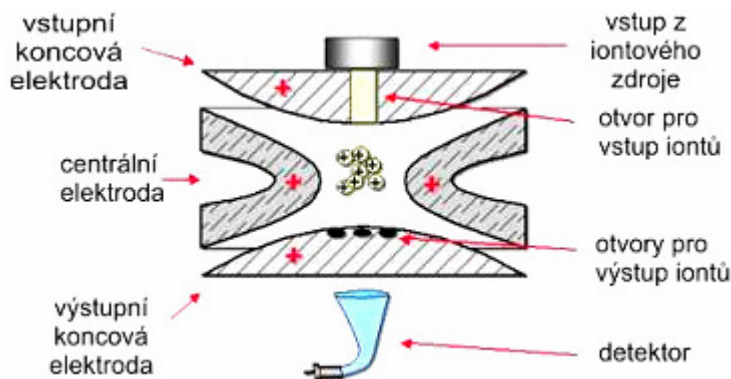
Z prostředí iontového zdroje jsou vzniklé ionty nejčastěji pomocnou elektrodou (repelerem) vypuzeny do separátoru (analyzátoru) iontů. Ten má za úkol ionty rozdělit podle poměru m/z . Jestliže použitá technika ionizace rozhoduje o citlivosti analýzy, technika separace pak o její přesnosti. I zde existuje několik různých metod, převážně založených na chování elektricky nabitých částic v elektromagnetickém poli. Nejstarší tzv. sektorové přístroje využívaly zakřivení dráhy letící částice ve stacionárním poli. Dnes běžně užívaný separátor kvadrupól (quadrupole, Q) využívá rychle se měnícího elektromagnetického pole tvořeného mezi čtyřmi tyčemi. Pole obsahuje střídavou a stejnosměrnou složku. Při vhodném nastavení procházejí analyzátozem pouze ionty o přesné hodnotě m/z , dráhy ostatních jsou nestabilní a jsou pohlceny na tyčích kvadrupólu (tj. chová se jako filtr). Pro záznam spektra tedy probíhá sken, kdy kvadrupólový filtr postupně propouští ionty o definované hodnotě m/z (viz obr. 8).



Obr. 8. Schéma kvadrupólového analyzátoru, upraveno podle [21]

Mezi další používané analyzátory patří iontová past. Konstrukčně se skládá ze dvou koncových (vstupní a výstupní) a jedné středové prstencové elektrody (viz obr. 9). Ionty jsou zde pomocí elektromagnetického pole zachyceny uvnitř pasti a poté s měnícím se polem postupně podle své hodnoty m/z vypuzeny k detektoru. Oproti kvadrupólu má o málo větší

rozlišení i skenovací rychlost a může analyzovat větší rozsah hodnot m/z . Analyzátor je použitelný pro tandemovou MSⁿ, avšak je dražší, proto se pro spojení se separačními technikami používá méně často.

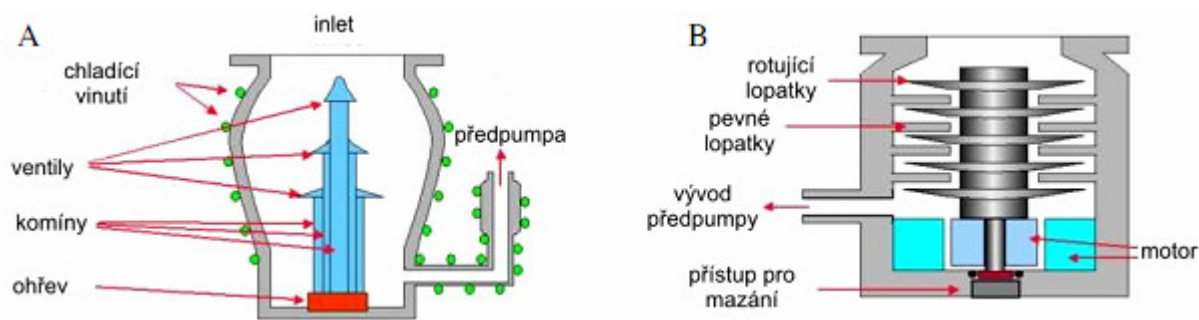


Obr. 9. Schéma řezu iontovou pastí, upraveno podle [22]

Poslední součástí hmotnostního spektrometru je detektor pro záznam iontového proudu. K tomu slouží elektronový násobič s diskretními nebo kontinuální dynodou, eventuálně scintilační fotonásobič. Pro sektorové přístroje je možno použít i detektoru diodového pole [20].

Vakuový systém

Aby nedocházelo v prostorách iontového zdroje a analyzátoru k nežádoucím srážkám iontů, je nutno tyto prostory dokonale evakuovat. Z tohoto hlediska se jako nejnáročnější jeví sektorové přístroje, průletový analyzátor a orbitální past. Nejčastěji používané jsou olejová difusní pumpa a turbomolekulární pumpa. V difusní pumpě (obr. 10A) zahříváný olej stoupá komíny a ventily je rozstříkovan. Strhává s sebou molekuly plynu, které jsou odsáty předpumpou. Je bezúdržbová a tichá, dosažení pracovního tlaku však trvá několik hodin existuje také možnost vniknutí oleje do přístroje. Turbomolekulární pumpa (obr. 10B) je tvořena sérií vhodně tvarovaných pevných a otočných lopatek. Rychlost až 90000 ot/min odvádí molekuly plynu až k předpumpě. Její výhodou je rychlejší dosažení ještě nižšího pracovního tlaku (až 10^{-6} Pa), avšak má vyšší pořizovací náklady, kratší životnost a hlučnější provoz [20].

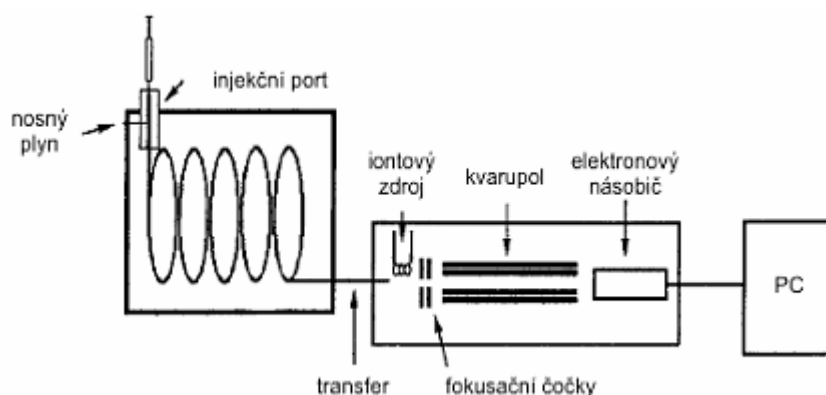


Obr. 10. Schéma olejové pumpy difusní (A) a turbomolekulární (B), upraveno podle [22]

2.4 GC-MS

Spojení obou metod

Spojení plynové chromatografie jako separační techniky s hmotnostní spektrometrií jako detektorem (obr. 11) je dnes rutinně používáno pro kvalitativní identifikaci i kvantitativní stanovení neznámých sloučenin ve vzorcích z nejrůznějších odvětví od klinických aplikací po analýzu životního prostředí (omezení plynové chromatografie na těkavé, málo polární a teplotně stabilní látky lze kompenzovat vhodnou derivatizací).

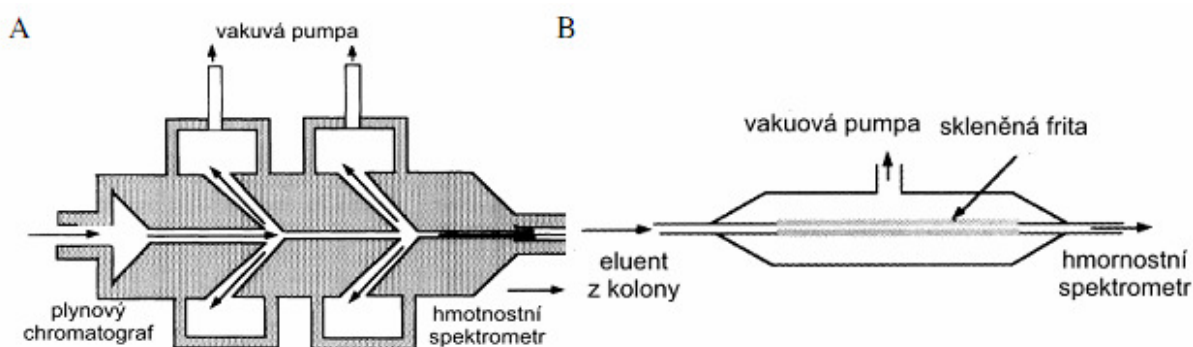


Obr. 11. Schéma GC/MS

Úskalí metody spočívá ve vlastním propojení obou přístrojů: problém je v rozdílu tlaků a velkém přebytku nosného plynu, který je nutno před zavedením do hmotnostního spektrometru odstranit. Jako řešení byla navržena množství rozhraní tzv. koncentrátorů, například Ryhageův (proudový koncentrátor, jet, obr. 12A), pracující na principu odsátí helia jako lehkého nosného plynu přímo za použití postupně se zužujících otvorů, zatímco se předpokládá, že těžší analyty pokračují dále do hmotnostního spektrometru. Tento koncentrátor je spolehlivý, ale vykazuje nízké výtěžky (okolo 25 %), přesto je stále používán

ve spojení s náplňovými kolonami, kde jsou vyžadovány vyšší průtoky. Jiný koncentrátor (Biemanův, obr. 12B) pracuje na podobném principu. I současné využití je obdobné: nosný plyn je odčerpáván přes skleněnou fritu nebo polytetrafluorethylenovou folii. Toto řešení je schopno pracovat s většími výtěžky, protože zde nedochází k tak velké ztrátě analytů, pracuje však s o něco menšími průtoky nosných plynů.

Většina přístrojů v dnešní době však používá již kapilární kolony (běžné pro GC/MS jsou nepolární o průměru 0,25 mm a délce 30 m) s nižšími průtoky (okolo 1 ml/min). V tomto případě za použití výkonného vakuového systému není nutné zařazovat žádný koncentrátor, kapilární kolona ústí přímo do iontového zdroje. Přechod je nutno vyhřívat, aby v jeho prostoru nedocházelo ke kondenzaci analytů a je také nutno zajistit jeho teplotní stabilitu [23].



Obr. 12. Konstrukční řešení Ryhageova (A) a Biemanova (B) koncentrátoru, upraveno podle [23]

Hodnocení výsledků analýzy

Pro kvalitativní určení látky pomocí plynové chromatografie lze použít několik postupů. V principu se jedná o metody založené na retenci a metody využívající vlastností samotných analytů. Pro retenci (zadržení) jsou to nejčastěji retenční čas (t_R , doba, po níž se po injekci analyt eluuje), korigovaný retenční čas (t'_R , retenční čas zkrácený o dobu eluce látky, jež se při daných podmínkách na analytické koloně nezadržuje), či nejlépe retenční indexy. Retenční index (RI, Kovats, 1958) je charakteristika dané látky (retenční čas normalizovaný dle vztahu (6), kde n značí počet uhlíkových atomů příslušného n -alkanu), která celkově zhodnocuje procesy probíhající při separaci, je proto reprodukovatelnější a je za daných podmínek pro danou látku konstantou, využívá se pro isotermální GC. Při analýzách s teplotním programem (konstantní rychlosti změny teploty) se počítá index podle vzorce (7).

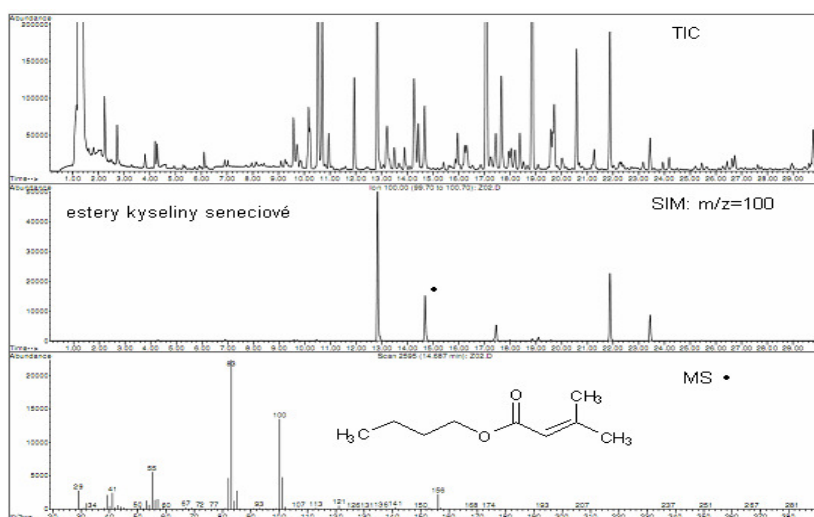
Jako standard pro určování retenčních indexů se nejčastěji používají po sobě jdoucí homology n-alkanů. [24, 25]

$$RI = 100 \cdot \frac{\log t_{Rx} - \log t_{Rn}}{\log t_{Rn+1} - \log t_{Rn}} + 100 \cdot n \quad (6)$$

$$RI = 100 \cdot \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{Rn+1} - t_{Rn}} + 100 \cdot n \quad (7)$$

Pro identifikaci pomocí MS se používá tzv. full scan mód, kdy jsou zaznamenávány všechny ionty ve vybraném rozsahu m/z. Z něj obdržíme TIC (total ion chromatogram). Ze záznamu hmotnostního spektra lze srovnáním s knihovnou spekter přímo určit, o jaký analyt se jedná. Tyto aplikace bývají součástí ovládacího softwaru. Pokud se však daná látka v databázi nenachází (procentuální shoda je jen velmi nízká a difference mezi hodnotami m/z nezanedbatelné), musíme přistoupit k interpretaci spektra.

V rutinních analýzách v laboratořích, které analyzují vzorky stejných typů látek a zejména pak pro kvantifikaci, lze s výhodou použít tzv. SIM mód (selected ion monitoring), kdy nesnímáme celé spektrum, ale jen vybrané hodnoty m/z charakteristické pro analyzované látky, čímž lze dosáhnout poklesu limitu detekce a také zvýšení selektivity analýzy pro velmi složité směsi [20].



Obr. 13. Výstup z vyhodnocovacího softwaru (TIC, SIM, MS)

Pro kvantitativní vyhodnocení analýzy se užívá metod vnitřní normalizace, interního a externího standardu, standardního přídatku. Kvantita látky je úměrná ploše příslušného píku.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 PRACOVNÍ POSTUP A INSTRUMENTACE

3.1 CHEMIKÁLIE A MATERIÁL

Ze standardů použitých n-alkanů ($C_7 - C_{22}$) byl připraven roztok v acetonu (koncentrace 3 mg/ml), z něhož byl naředěním ethanolem připraven zásobní roztok (koncentrace 30 $\mu\text{g/ml}$). Rovněž byl přichystán nasycený zásobní roztok NaCl.

Tab. 1. Vzorky bylinných likérů

| Likér | Výrobce | Objem l | EtOH (V/V) % | Složení |
|------------------------|---|------------|-----------------|--|
| Fernet | STOCK Plzeň a.s. | 0,5 | 40 | Láh, směs bylin, cukr, E 150a |
| Squash Cannabis | GRANETTE a.s. Ústí nad Labem | 0,5 | 16 | Láh, cukr, E 330, aroma z konopí a bylin, E 102, E 131 |
| Becherovka | Jan Becher - Karlovarská Becherovka, a.s. | 0,5 | 38 | Láh, cukr, směs bylin a koření |
| Bylinná hořká | Palírna u Zeleného stromu - Starorežná Prostějov a.s. | 0,5 | 35 | Láh, cukr, směs bylin a koření, E 150a, E 102, E 132 |
| Jägermeister | Mast-Jägermeister AG, Wolfenbüttel, Germany | 0,7 | 35 | Láh, cukr, směs bylin |
| Magister | STOCK Plzeň a.s. | 0,5 | 28 | Láh, cukr, směs bylin, E 150a |

3.2 INSTRUMENTACE

Analýza vzorků byla prováděna na plynovém chromatografu Agilent Technologies 7890A (Agilent, Palo Alto, CA, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 5975C (EI/CI). Nosným plynem bylo helium (99,998 %, SIAD, Bergamo, IT). Separace byly uskutečněny na kapilární koloně HP-5MS (30 m x ID 0,25 mm, df 0,25 μm).

Injektor byl nastaven na pulsní splittless mod, teplota nástřiku na 250 °C, Teplotní program na koloně byl 50 °C po 0 min pak 3 °C/min do 188 °C, pak 10 °C/min do 250 °C po 2 min. Dále byl nastaven počáteční tlakový pulz 0.9 ml/min po 0 min pak 15 ml/min do 2 ml/min po 0.2 min pak 15 ml/min do 0.9 ml/min po 0 min, posléze byl udržován konstantní průtok 0.9 ml/min.

MS skeny (TIC) byly zaznamenávány v rozmezí 29 – 520 m/z s frekvencí 3 Hz, teploty spojení (Aux 2), iontového zdroje a kvadrupólu byly nastaveny na 280 °C, 230 °C a 150 °C v daném pořadí. Bylo použito elektronové ionizace (70 eV).

Pro SPME bylo použito 50/30 µm DVB/Carboxen/PDMS StableFlex™ extrakční vlákno délky 2 cm (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA) v držáku bez pružinky, dále 30 ml standardní, válcové HS vialky se závitem uzavřené silikonovým septem, míchadlo, skleněné i pístové mikropipety.

Ke zpracování výsledků GC/MS byl použit software Enhanced ChemStation verze G1701CA s knihovnou hmotnostních spekter NIST 2002.

3.3 POSTUP PRÁCE

Kapalný vzorek (5 ml likéru) byl napipetován skleněnou pipetou do 30 ml HS vialky s magnetickým míchadélkem, bylo přidáno 5 ml koncentrovaného roztoku NaCl, vialka byla uzavřena víčkem se silikonovým septem a byla položena na míchadlo, míchání (300 rpm) bylo zapnuto, pak byla přes septum zavedena jehla z níž bylo vysunuto extrakční vlákno (2 cm) do HS. Extrakce probíhala 60 minut při laboratorní teplotě (cca 25 °C), poté bylo vlákno zasunuto do jehly, která byla vyndána z vialky, okamžitě byla přenesena k GC, kde byla zavedena do injektoru, bylo vysunuto vlákno a zahájil se sběr dat. V injektoru (250 °C) bylo ponecháno 5 minut k vyčištění.

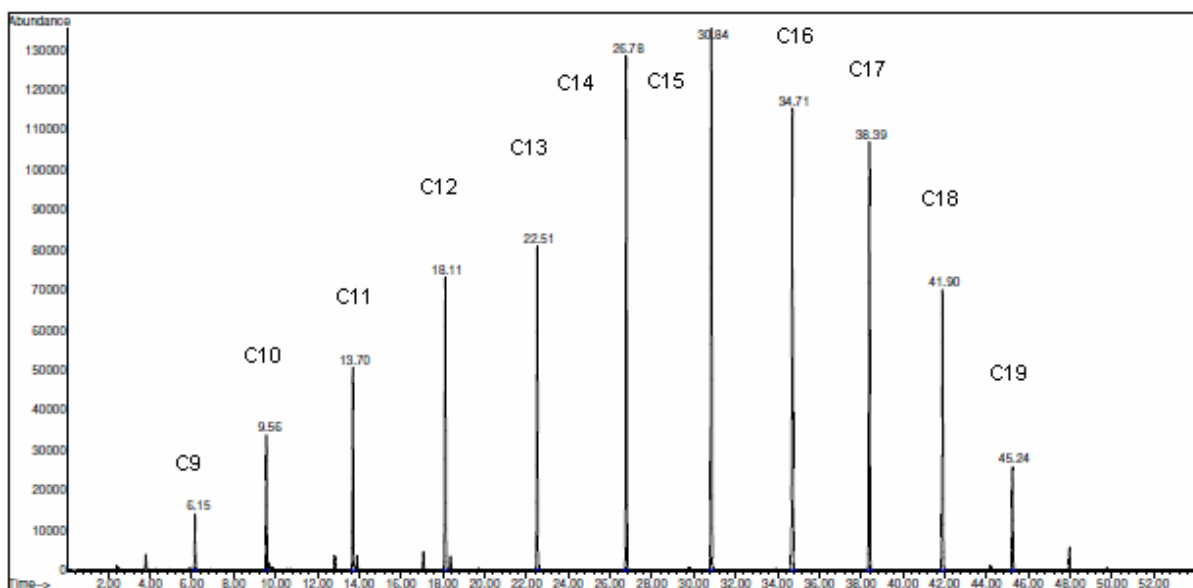
Vialky stejně jako míchadélko byly vyvařené vodou a opláchnuté ethanolem. Zároveň s analýzou vzorků byla provedena analýza s přídávkem standardů n-alkanů (C₇ – C₂₂), přičemž se ke stejnému vzorku přidalo 10 µl ze zásobního roztoku standardů (30 µg/ml), tudíž jejich koncentrace v roztoku ve vialce odpovídala 30 ng/ml. Postupovalo se obdobně jako u analýzy bez standardů. Všechna měření proběhla se stejnou instrumentací během 3 dnů.

Identifikace byla provedena na základě srovnání MS spekter s knihovnou NIST 2002 a především s MS spektry a vyhodnocenými RI podle [25] na <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [26], v menší míře s [27], retenční indexy byly rovněž srovnávány s časopiseckými články [7 – 10]. Metodou „selected ions chromatogram“ byly lokalizovány „bleed“ signály (m/z: 193, 207, 267, 355...), jež byly vyjmuty z integrace.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 ANALÝZA SMĚSI N-ALKANŮ

Pro výpočet RI bylo třeba znát retenční časy n-alkanů ($C_7 - C_{22}$), k vyhledání jejich signálů ve směsi se vzorkem bylo využito „selected ion monitoring (SIM)“ pro ion 57.



Obr. 14. Chromatogram SIM modu ($m/z = 57$) měření směsi alkanů se vzorkem

Ze záznamu je patrné, že nejlépe se extrahovaly z HS alkanů $C_{14} - C_{17}$, přičemž alkanů $C_7 - C_8$ a $C_{20} - C_{22}$ se extrahovaly v malé míře, což u prvních bylo zapříčiněno nejspíše adsorpční rovnováhou a u druhých fázovou rovnováhou (c_g/c_l). Retenční časy alkanů naměřené v různých vzorcích si vzájemně odpovídaly.

Tab. 2. Shrnutí vlastností vybraných použitých n-alkanů

| C | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Mr | 128,2 | 142,3 | 156,3 | 170,3 | 184,3 | 198,4 | 212,4 | 226,4 | 254,5 | 268,5 |
| t. v. (°C) | 151 | 174 | 195 | 216 | 234 | 252 | 270 | 287 | 295 | 317 |
| t_R (min) | 6,15 | 9,56 | 13,70 | 18,11 | 22,51 | 26,78 | 32,84 | 34,71 | 38,39 | 41,30 |
| RI | 900 | 1000 | 1100 | 1200 | 1300 | 1400 | 1500 | 1600 | 1700 | 1800 |

C – počet uhlíků; Mr – relativní molekulová hmotnost; t. v. – bod varu; t_R – retenční čas; RI – retenční index

4.2 ANALÝZA VZORKŮ LIKÉRŮ

Záznam TIC (total ion chromatogram), byl integrován nástrojem ChemStation Integrator se stejnými parametry pro každý vzorek, integrační práh byl nastaven na 16.0 a čas integrace od 7,15 do 38,40. Signály příslušející degradačním produktům stacionární fáze byly rozpoznány a lokalizovány přes SIM (ionty 207, 267...) a následně vyjmuty z integrace. Některé solitérní píky s hodnotou těsně pod prahem integrace byly integrovány manuálně. Manuálně byly opraveny i píky nesprávně integrované automatickou integrací, což bylo ověřováno zobrazením jednotlivých skenů MS nebo funkcí Peak Purity.

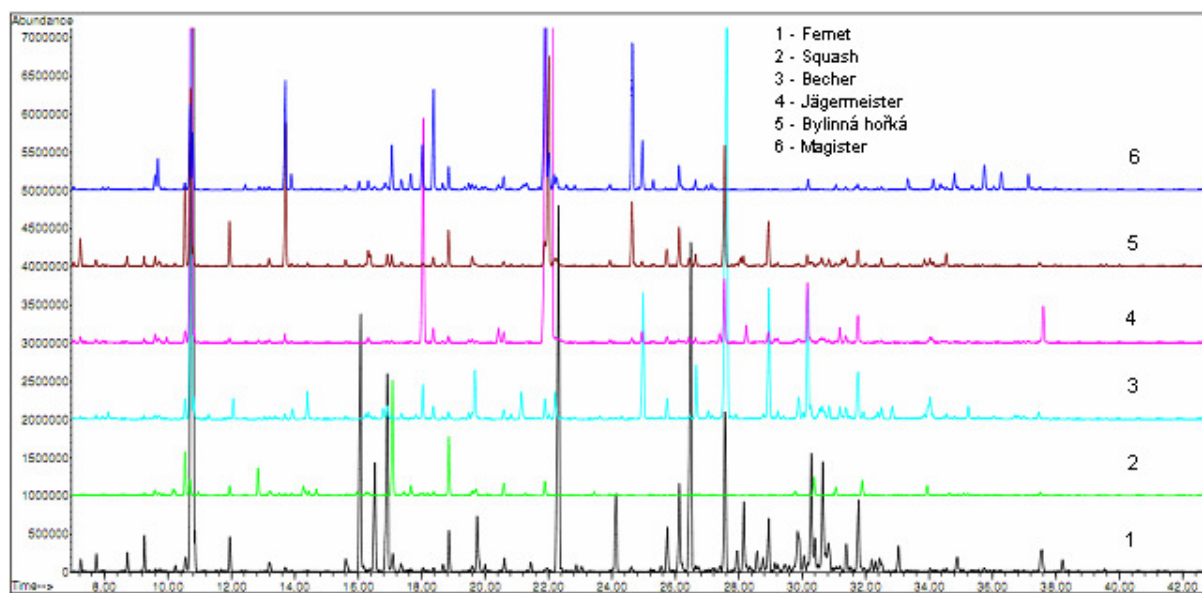
Integrace byla započata s prvním monoterpenem a byla skončena s posledním seskviterpenoidem, před integračním časem se nacházel obrovský pík rozpouštědla (ethanol) a několik zanedbatelných (ethylacetát, butylacetát...), po 39 min se u pár vzorků vyskytovaly nad integračním prahem látky nepřírodního původu (ftaláty).

U jednotlivých vzorků bylo po integraci srovnáno relativní zastoupení (v %) příslušných sloučenin na základě srovnání plochy píku s celkovou plochou.

Tab. 3. Srovnání relativního množství těkavých látek

| Likér | Celková plocha píků (zaokrouhleno na 2 platné číslíce) | Srovnání (% max.) |
|---------------|--|-------------------|
| Fernet | $2,0 \cdot 10^9$ | 100 |
| Squash | $1,4 \cdot 10^7$ | 0,7 |
| Becherovka | $1,1 \cdot 10^9$ | 55 |
| Bylinná hořká | $6,1 \cdot 10^8$ | 31 |
| Jägermeister | $1,8 \cdot 10^9$ | 90 |
| Magister | $6,3 \cdot 10^8$ | 32 |

Obr. 15. Srovnání chromatogramů všech šesti vzorků



Tab. 4. Relativní zastoupení těkavých látek ve vzorcích bylinných likérů v %.

| Sloučenina | RI | Fernet | Squash | Becher | Byl. hořk. | Jägermeister | Magister |
|------------------------------|------|--------|--------|--------|------------|--------------|----------|
| α -Pinene | 932 | 0,23 | - | 0,07 | 1,87 | 0,12 | - |
| Camphene | 947 | 0,34 | - | 0,14 | 0,45 | 0,07 | - |
| 1,1-dimethoxy-2-methylbutane | 952 | - | - | 0,07 | - | - | - |
| Benzaldehyde | 957 | - | - | 0,24 | - | - | 0,14 |
| β -Pinene | 975 | 0,37 | - | - | 0,69 | - | - |
| β -Myrcene | 991 | 0,68 | - | 0,11 | 0,65 | 0,07 | - |
| Ethyl hexanoate | 1000 | - | 1,16 | 0,16 | - | - | - |
| Octanal | 1003 | - | - | 0,13 | - | - | 2,12 |
| Phelandrene | 1004 | 0,09 | - | 0,11 | 0,44 | - | - |
| 3-Carene | 1010 | - | - | - | - | 0,11 | - |
| 1,4-Cineol | 1015 | - | 1,66 | - | - | - | - |
| α -Terpinene | 1016 | 0,14 | 1,32 | - | 0,22 | - | - |
| o-Cymene | 1024 | 0,39 | 12,81 | 0,81 | 5,63 | 0,31 | 0,45 |
| Limonene | 1028 | 25,98 | 4,94 | 16,90 | 13,31 | 18,10 | 6,02 |
| Eucalyptol (=1,8-Cineol) | 1030 | 0,56 | - | 0,80 | 1,08 | 0,22 | 3,84 |
| Indane | 1034 | - | 1,09 | - | 0,09 | 0,02 | - |
| 2-heptyl acetate | 1042 | - | - | 0,17 | - | - | - |
| trans-Ocimene | 1047 | 0,03 | - | - | - | - | - |
| γ -Terpinene | 1058 | 0,69 | 2,79 | - | 3,04 | 0,10 | - |
| Artemisia ketone | 1060 | - | - | 0,76 | - | - | - |
| 1-Octanol | 1069 | - | - | - | - | - | 0,36 |
| 2-methylpropyl senecioate | 1079 | - | 8,44 | - | - | - | - |
| Terpinolen | 1087 | 0,18 | 1,00 | 0,04 | 0,37 | 0,08 | 0,17 |
| p-Cymene | 1087 | 0,07 | 0,92 | 0,04 | 0,19 | - | 0,05 |
| 2-Nonanone | 1092 | - | - | 0,09 | - | - | - |
| 6-Camphenone | 1095 | - | 0,76 | - | - | - | - |
| Linalool | 1100 | 0,11 | - | 0,20 | 10,68 | 0,19 | 7,74 |
| Nonanal | 1105 | 0,03 | 0,66 | 0,49 | 0,17 | 0,04 | 1,11 |

| Sloučenina | RI | Fernet | Squash | Becher | Byl. hořk. | Jägmeist. | Magister |
|---------------------------|-----------|---------------|---------------|---------------|-------------------|------------------|-----------------|
| p-Ethylanisole | 1113 | - | 3,76 | - | - | - | - |
| (E)-Thujone (=β-Thujone) | 1116 | 0,03 | - | 1,17 | 0,23 | - | - |
| Butyl senecioate | 1122 | - | 2,58 | - | - | - | - |
| Camphor | 1143 | 0,27 | - | 0,13 | 0,52 | - | 0,34 |
| Isopulegol | 1144 | 0,13 | - | - | - | - | - |
| trans-Menthone | 1153 | 6,69 | - | - | - | - | 0,61 |
| Isoborneol | 1156 | 0,15 | - | - | - | - | - |
| Pinocamphone | 1159 | - | - | 0,24 | - | - | - |
| cis-Menthone | 1164 | 2,82 | - | - | - | - | - |
| Borneol | 1164 | - | - | 0,09 | - | - | 0,38 |
| Ethyl benzoate | 1170 | - | - | 0,51 | - | 0,03 | 0,11 |
| Menthol | 1172 | 5,35 | - | 0,60 | - | - | 0,57 |
| Isopinocamphone | 1173 | - | - | - | 0,90 | - | 0,18 |
| 4-Terpineol | 1176 | 0,50 | 39,74 | 0,17 | 0,83 | 0,05 | 3,18 |
| Neoisomenthol | 1183 | 0,20 | - | - | - | - | - |
| Verbenyl ethyl ether | 1183 | - | - | 0,23 | - | - | 0,55 |
| Pentyl senecioate | 1185 | - | 1,30 | - | - | - | - |
| α-Terpineol | 1190 | 0,06 | 3,63 | 0,07 | 0,12 | 0,04 | 1,18 |
| Methyl salicylate | 1193 | - | - | 0,23 | - | - | - |
| Ethyl octanoate | 1198 | 0,09 | 0,69 | 1,50 | 0,22 | - | - |
| Estragol | 1199 | - | - | - | - | 6,23 | 3,58 |
| Decanal | 1206 | 0,10 | 1,31 | 0,53 | 0,54 | 0,35 | 7,30 |
| Octyl acetate | 1213 | 0,18 | - | 0,09 | - | - | 0,43 |
| Cinnamaldehyde (Z) | 1218 | - | - | 0,06 | - | - | - |
| Citronellol | 1228 | - | - | - | - | - | 0,24 |
| Thymol methyl ether | 1235 | - | 1,46 | - | - | - | - |
| cis-hex-3-enyl valerate | 1236 | 1,30 | - | - | - | - | - |
| Chrysanthenyl acetate (E) | 1236 | - | - | 2,04 | - | - | - |
| Pulegone | 1239 | 0,16 | - | - | - | - | - |
| Neral (=cis-Citral) | 1241 | - | - | - | - | - | 0,16 |
| 3-methylhexyl crotonate | 1243 | 0,15 | - | - | - | - | - |
| Carvone | 1243 | - | - | - | - | - | 0,22 |
| Anethol (Z) | 1252 | - | - | - | - | 0,44 | 0,43 |
| Piperitone | 1253 | 0,04 | - | - | - | - | - |
| Geraniol | 1255 | - | - | - | - | - | 0,23 |
| Linalyl acetate | 1257 | 0,32 | - | - | - | - | - |
| Chrysanthenyl acetate (Z) | 1261 | - | - | 0,22 | - | - | - |
| Cinnamaldehyde (E) | 1269 | - | - | 1,50 | - | - | 0,28 |
| Geranial (=trans-Citral) | 1270 | - | - | - | - | - | 0,42 |
| Perillaldehyd | 1273 | - | - | - | - | - | 0,64 |
| Neomenthyl acetate | 1276 | 0,22 | - | - | - | - | - |
| Anethol (E) | 1285 | - | - | - | 2,15 | 64,55 | 23,65 |
| Hexyl senecioate | 1286 | - | 4,84 | - | - | - | - |
| Bornyl acetate | 1287 | 0,13 | - | 0,90 | - | - | - |
| Safrol | 1288 | - | - | - | 18,52 | - | 3,05 |
| Thymol | 1292 | - | - | - | 0,16 | - | 1,15 |
| 2-Undecanone | 1294 | - | - | 0,34 | - | 0,24 | 1,08 |
| Menthyl acetate | 1295 | 10,10 | - | - | 0,45 | - | - |
| Ethyl nonanoate | 1298 | 0,10 | - | 0,10 | - | 0,12 | - |
| Carvacrol | 1301 | - | - | - | - | - | 0,48 |
| Undecanal | 1308 | - | - | - | - | 0,02 | 0,31 |

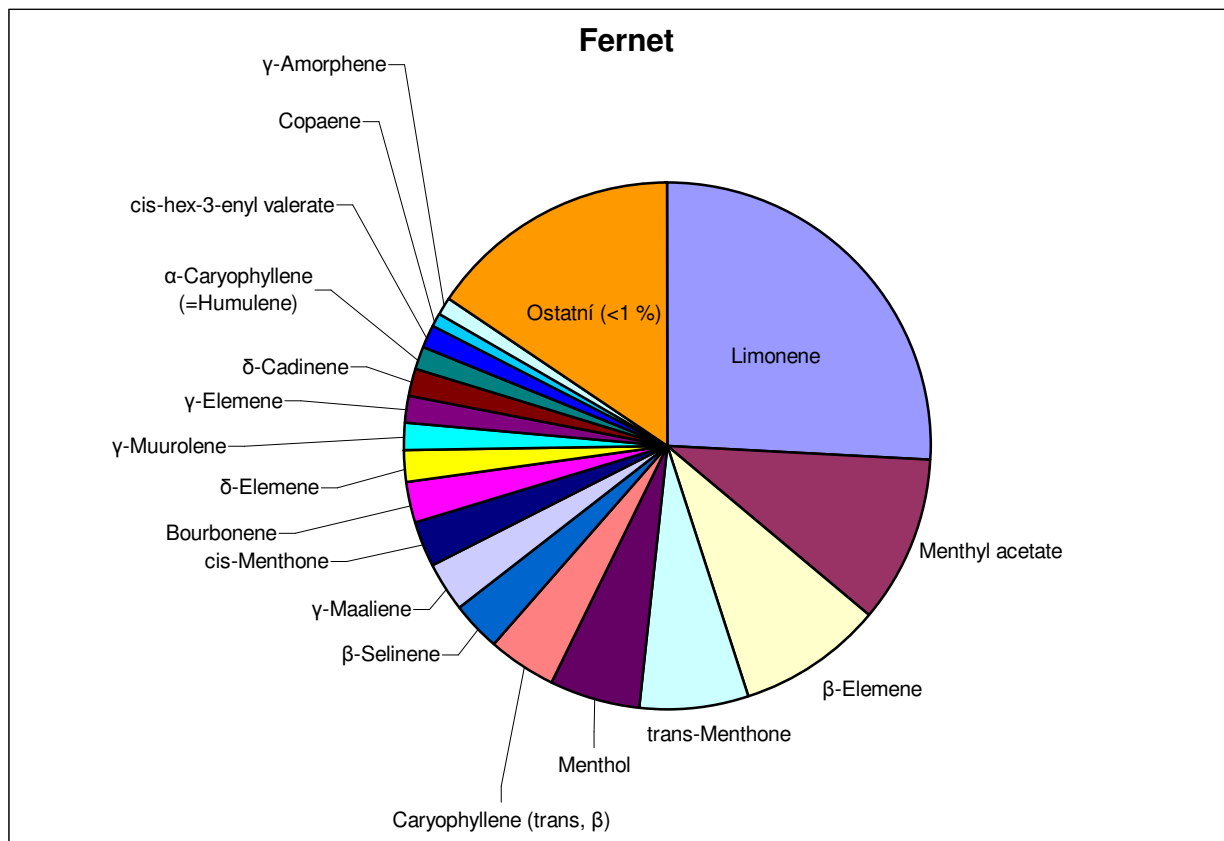
| Sloučenina | RI | Fernet | Squash | Becher | Byl. hořk. | Jägmeist. | Magister |
|-------------------------------|------|--------|--------|--------|------------|-----------|----------|
| Neoisomenthyl acetate | 1309 | 0,15 | - | - | - | - | - |
| Nonyl acetate | 1312 | 0,15 | - | - | - | - | - |
| Heptyl senecioate | 1321 | - | 1,06 | - | - | - | - |
| δ-Elemene | 1338 | 1,96 | - | - | - | - | - |
| Ethyl hydrocinnamate | 1349 | 0,11 | - | - | - | - | - |
| α-Terpenyl acetate | 1349 | - | - | - | 4,87 | 0,11 | 11,42 |
| α-Cubebene | 1350 | 0,03 | - | - | - | - | - |
| Citronellyl acetate | 1354 | - | - | - | - | - | 0,20 |
| Eugenol | 1357 | - | - | 6,16 | 0,38 | 0,27 | 3,71 |
| Neryl acetate | 1365 | - | - | - | 0,13 | 0,03 | 0,68 |
| Ylangene | 1371 | 0,14 | - | 0,11 | - | - | - |
| Isosafrol | 1371 | - | - | - | - | - | 0,15 |
| Copaene | 1375 | 1,06 | - | 0,90 | 1,42 | 0,16 | - |
| Bourbonene | 1384 | 2,35 | - | - | - | - | - |
| Geranyl acetate | 1384 | - | - | - | 2,81 | 0,05 | 1,76 |
| β-Elemene | 1391 | 9,04 | - | 0,17 | 0,53 | 0,14 | - |
| Ethyl decanoate | 1397 | 0,15 | 0,30 | 2,36 | 0,82 | 0,10 | 0,65 |
| Diphenyl ether | 1398 | - | 0,48 | - | - | - | - |
| Cyperene | 1399 | 0,13 | - | - | - | - | - |
| Eugenol methyl ether | 1405 | - | - | - | - | - | 0,29 |
| γ-Caryophyllene | 1407 | 0,04 | - | 0,44 | - | - | - |
| Dodecanal | 1408 | - | - | 0,15 | - | - | 0,35 |
| α-Gurjunene | 1409 | 0,08 | - | - | - | - | - |
| Decyl acetate | 1411 | 0,08 | - | - | - | - | - |
| (Z)-α-Bergamotene | 1416 | 0,14 | - | - | - | 0,22 | - |
| Caryophyllene (trans, β) | 1418 | 4,27 | - | 33,72 | 9,97 | 1,72 | - |
| neidentifikovaný seskviterpen | 1429 | 0,53 | - | - | 0,29 | - | - |
| Calarene | 1431 | - | - | - | 0,65 | - | - |
| γ-Elemene | 1433 | 1,71 | - | - | 0,77 | - | - |
| (E)-α-Bergamotene | 1436 | 0,13 | - | - | 0,16 | 0,42 | - |
| Aromadendrene | 1438 | 0,14 | - | - | - | - | - |
| Isogermacrene D | 1444 | 0,54 | - | - | - | - | - |
| α-Caryophyllene (=Humulene) | 1453 | 1,38 | - | 6,27 | 3,58 | 0,29 | - |
| β-Farnesene (E) | 1458 | 0,22 | - | - | - | 0,10 | - |
| Alloaromadendrene | 1460 | 0,17 | - | 0,39 | 0,28 | 0,12 | - |
| Ethyl cinnamate (E) | 1465 | 0,12 | - | - | - | - | - |
| neidentifikovaný seskviterpen | 1466 | 0,12 | - | - | - | - | - |
| Aristolene | 1469 | 0,15 | - | - | - | - | - |
| 1-Dodecanol | 1474 | - | 1,63 | - | - | - | - |
| γ-Muurolene | 1476 | 1,72 | - | 1,18 | 0,25 | 0,15 | - |
| α-Amorphene | 1480 | 0,44 | - | 0,31 | - | - | - |
| α-Curcumene | 1484 | 0,19 | - | 6,07 | 0,86 | 1,58 | - |
| β-Selinene | 1486 | 3,16 | - | 0,66 | 0,34 | 0,08 | - |
| Eremophilene | 1487 | - | - | - | 0,30 | - | - |
| δ-Selinene | 1491 | 0,17 | - | - | 0,19 | - | - |
| γ-Maaliene | 1493 | 3,07 | - | 0,61 | - | 0,10 | - |
| α-Selinene | 1494 | 0,33 | - | 0,65 | 0,69 | 0,12 | - |
| γ-Amorphene | 1496 | 1,04 | - | 0,35 | - | 0,10 | - |
| α-Muurolene | 1499 | 0,08 | - | 0,63 | 0,69 | 0,06 | - |
| α-Bisabolene (Z) | 1503 | 0,14 | - | - | - | - | - |
| β-Bisabolene | 1509 | 0,18 | - | 0,50 | 0,20 | 0,37 | - |

| Sloučenina | RI | Fernet | Squash | Becher | Byl. hořk. | Jägmeist. | Magister |
|-----------------------------------|------|--------|--------|--------|------------|-----------|----------|
| Linalyl valerate | 1511 | - | - | 0,08 | 0,53 | - | - |
| Ionol (=Butylated hydroxytoluene) | 1513 | - | - | - | - | - | 0,23 |
| γ -Cadinene | 1514 | 0,66 | - | 0,59 | 0,89 | 0,17 | - |
| α -Panasinsene | 1517 | 0,12 | - | 0,16 | - | - | - |
| Myristicin | 1521 | - | - | - | - | - | 0,15 |
| Calamene | 1522 | 0,15 | - | 1,86 | 0,57 | 0,28 | 0,41 |
| δ -Cadinene | 1523 | 1,60 | - | 0,55 | 0,67 | 0,45 | 0,11 |
| Eugenyl acetate | 1528 | - | - | 0,31 | - | - | - |
| Cadine-1,4-diene | 1532 | 0,05 | - | - | - | - | - |
| β -Panasinsene | 1535 | 0,25 | - | - | - | - | - |
| Selina-3,7(11)-diene | 1541 | 0,34 | - | - | - | - | - |
| α -Calacorene | 1543 | 0,16 | - | 0,62 | 0,69 | 0,06 | 0,24 |
| neidentifikovaný ox. seskviterpen | 1552 | - | - | 0,67 | - | - | - |
| Germacrene B | 1557 | 0,63 | - | - | 0,22 | - | - |
| Nerolidol (E) | 1564 | - | - | - | - | - | 0,71 |
| β -Calacorene | 1564 | 0,05 | - | - | - | - | - |
| Neryl isovalerate | 1578 | - | - | 0,10 | 0,60 | - | - |
| Caryophyllene oxide | 1582 | 0,07 | - | 0,89 | 0,73 | 0,12 | - |
| Foeniculin (Z) | 1584 | - | - | - | - | 0,13 | - |
| Neryl 2-methylbutanoate | 1585 | - | - | - | 0,36 | - | - |
| Ethyl dodecanoate | 1595 | 0,07 | - | 0,16 | 0,92 | 0,04 | - |
| neidentifikovaný ox. seskviterpen | 1602 | - | - | - | - | - | 1,34 |
| β -Elemenone | 1603 | 0,19 | - | - | - | - | - |
| neidentifikovaný ox. seskviterpen | 1628 | 0,10 | - | - | - | - | 2,20 |
| α -Muurolol | 1643 | - | - | - | - | - | 1,41 |
| ar-Turmerone | 1666 | - | - | - | - | 0,05 | 1,17 |
| Cadalene | 1675 | - | - | 0,35 | 0,17 | - | - |
| Foeniculin (E) | 1678 | - | - | - | - | 0,95 | - |
| neidentifikovaný ox. seskviterpen | 1678 | 0,80 | - | - | - | - | - |
| Germacron (E,E) | 1695 | 0,30 | - | - | - | - | - |

RI (retenční index) byl spočten ze zaznamenaných retenčních časů podle [25]

Fernet

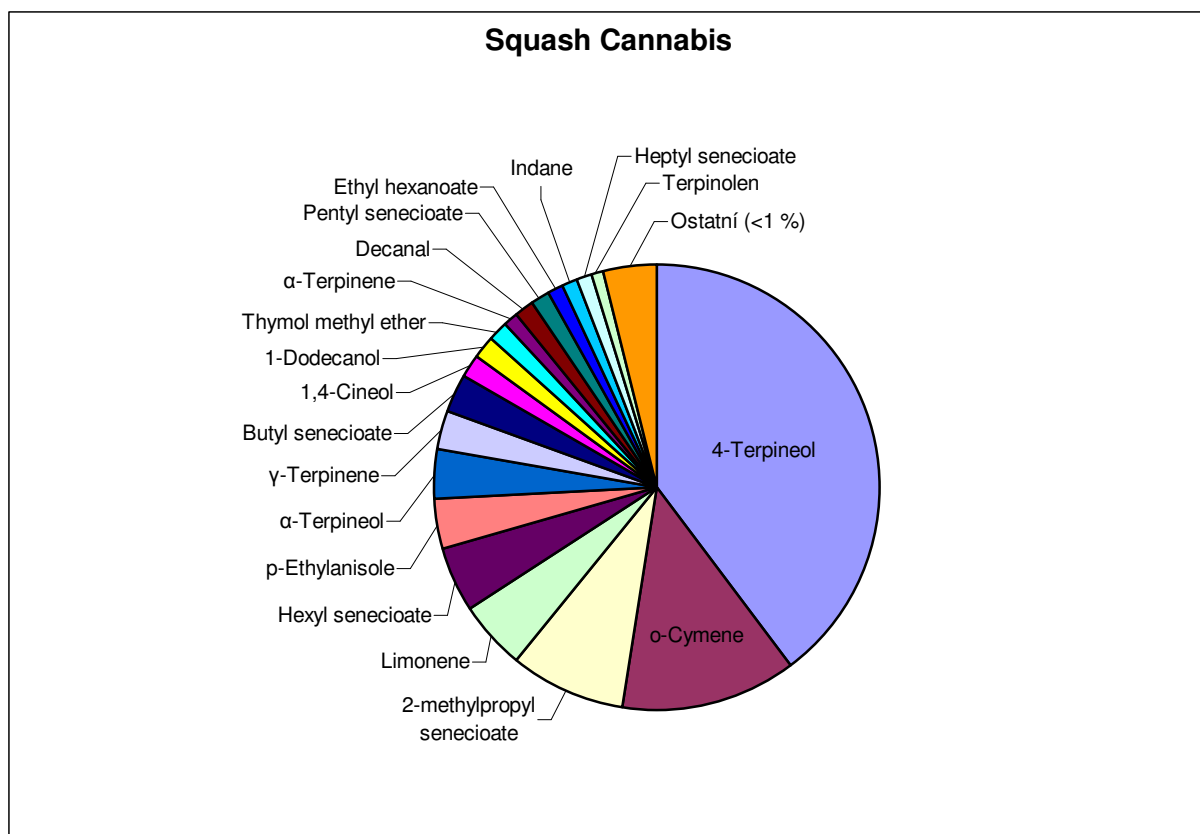
V aróma bylo nalezeno 90 látek (18 s obsahem nad 1 %). Z monoterpenických látek byl nejvíc zastoupen limonene, menthyl acetate, cis- a trans-menthone, menthol. Nejzastoupenějšími seskviterpeny byly β -elemene a β -caryophyllene. Srovnáním sum ploch po integraci bylo zjištěno, že největší celkové zastoupení těkavých látek ze všech šesti vzorků přísluší právě fernetu, proto mu byla přidělena srovnávací hodnota 100 %.



Obr. 16. Aroma Fernetu

Squash

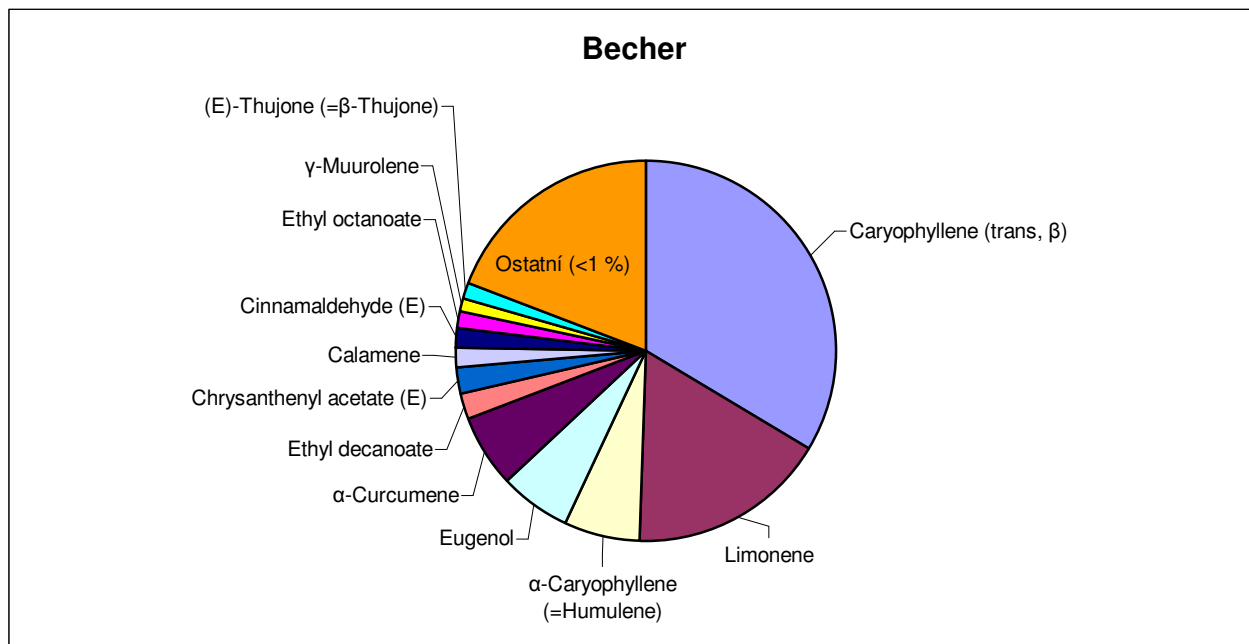
V aróma bylo nalezeno 25 látek (19 s obsahem nad 1 %), monoterpenický 4-terpineol, limonene, aromatický o-cymene a několik esterů kyseliny seneciové (3-methylbut-2-enoic acid). Vzorek měl nejmenší obsah těkavých látek v porovnání s fernetem pouze 0,7 % jeho hodnoty.



Obr. 17. *Aroma Squashe Cannabis*

Becherovka

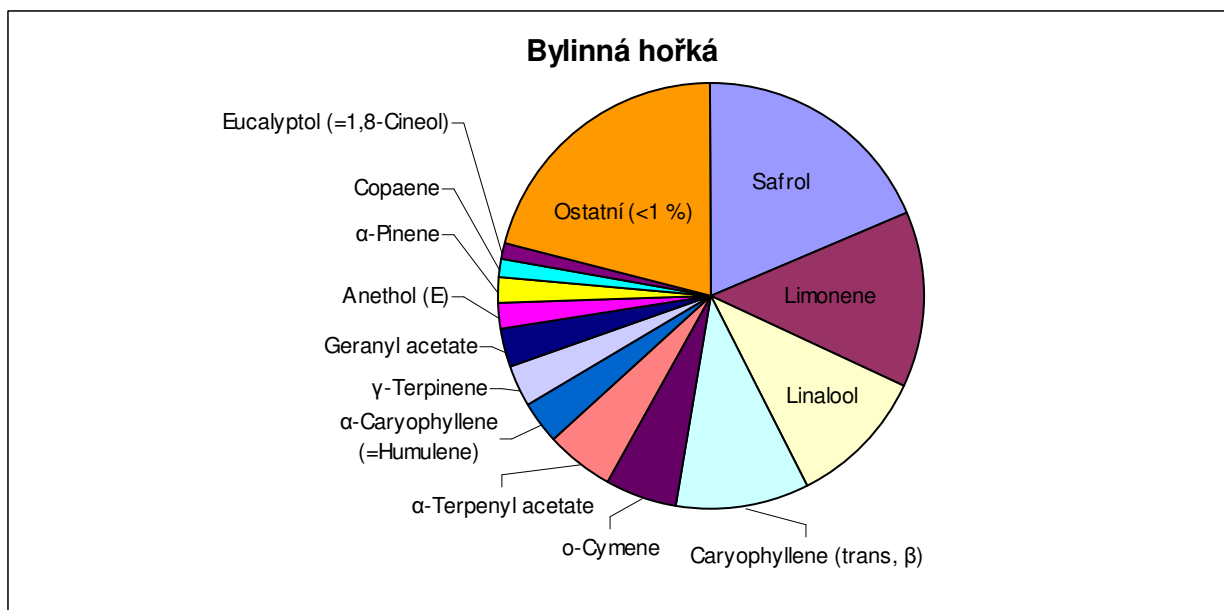
V aróma bylo nalezeno 69 látek (12 s obsahem nad 1 %). Velké zastoupení β -caryophyllenu a eugenolu napovídá na jednu z ingrediencí (hřebíček), dále byl hojně zastoupen limonene, humulone a α -curcumene. Zajímavostí je přítomnost β -thujonu (původem z pelyňku), jehož koncentrace je limitovaná podle lékopisu. Množství těkavých látek bylo 55 % hodnoty fernetu.



Obr. 18. Aroma Becherovky

Bylinná hořká

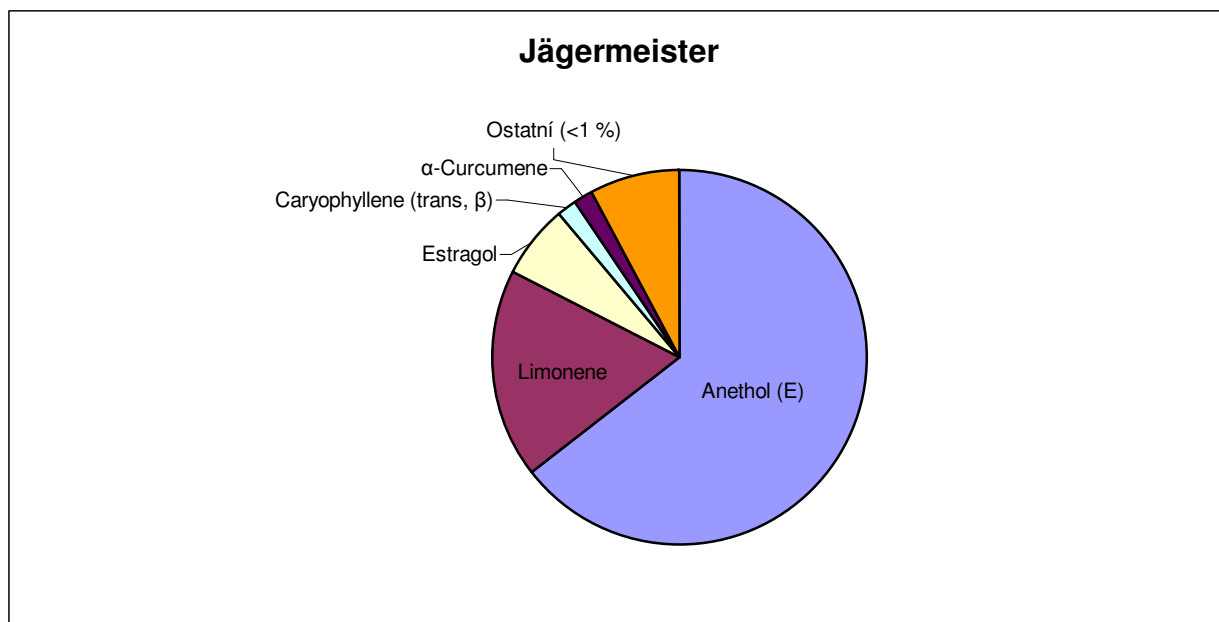
V aróma bylo nalezeno 59 látek (13 s obsahem nad 1 %). Největší zastoupení měl safrol (rostlinný pesticid) obsažený převážně v rostlinách z rodu *sassafras*, monoterpenické látky (limonene, linalool, α -terpenyl acetate), aromatický o-cymene a seskviterpen β -caryophyllene. Množství těkavých látek bylo 31 % hodnoty fernetu.



Obr. 19. Aroma Bylinné hořké

Jägermeister

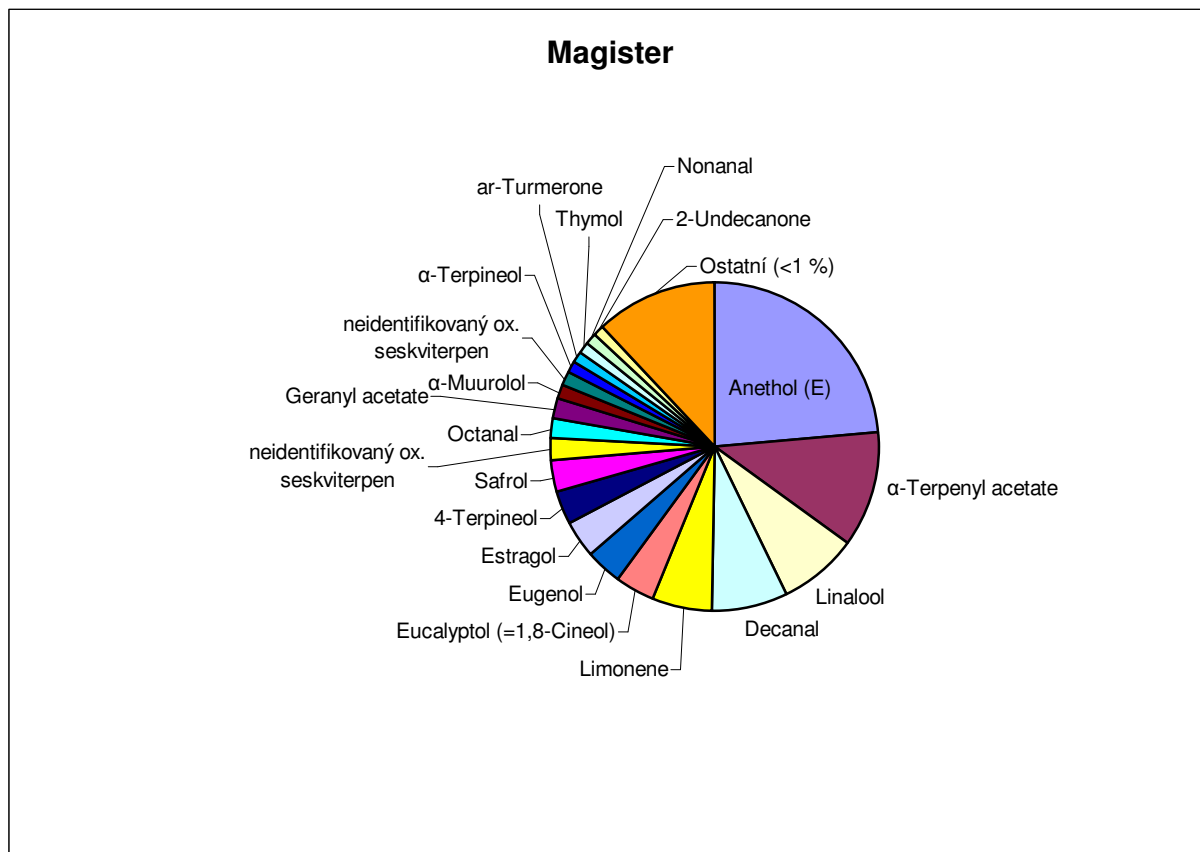
V aróma bylo nalezeno 52 látek (5 s obsahem nad 1 %). Nejzastoupenějším byl cis-anethol (vyskytující se v silici anýzu), dále limonene a estragol (polohový izomer anetholu). Množství těkavých látek bylo 90 % hodnoty fernetu.



Obr. 20. Aroma Jägermeistera

Magister

V aróma bylo nalezeno 55 látek (20 s obsahem nad 1 %). Mezi identifikovanými látkami se nacházelo několik fenyylpropanoidů (anethol, eugenol, estragol, safrol, isosafrol, myristicin), monoterpenických látek (α -terpenyl acetate, linalool, limonene, eucalyptol), aldehydů (decanal, octanal). Seskviterpeny byly zastoupeny v malé míře a spíše v oxidované formě). Množství těkavých látek bylo 32 % hodnoty fernetu.



Obr. 21. Aroma Magistra

Přílohy na konci práce obsahují vzájemné grafické srovnání obsahu těkavých látek všech vzorků v jednom prstencovém diagramu.

ZÁVĚR

Metodou HS-SPME-GC-MS bylo v aróma šesti bylinných likérů při zvolených integračních parametrech nalezeno celkem 160 převážně terpenických látek. Srovnáním MS spekter a retenčních indexů [25] podle rok od roku se rozrůstající chemické databáze NIST [26] bylo identifikováno 154 látek, zbylých 6 se podařilo alespoň klasifikovat podle charakteristických hodnot m/z. Proti jiným metodám zkoncentrování má metoda HS-SPME výhodu v rychlosti a jednoduchosti, oproti metodě HS-GC podstatně zvyšuje citlivost k méně těkavým látkám na úkor těkavých (ethanol).

Porovnání procentuálních zastoupení jednotlivých látek proběhlo pouze srovnáním ploch píků bez jakýchkoli korekčních faktorů, proto výsledky neodpovídají skutečnému obsahu. Metoda by mohla mít využití k srovnávání jednotlivých šarží výrobku, odhalování falsifikátů nebo naopak k rozklíčování receptury.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

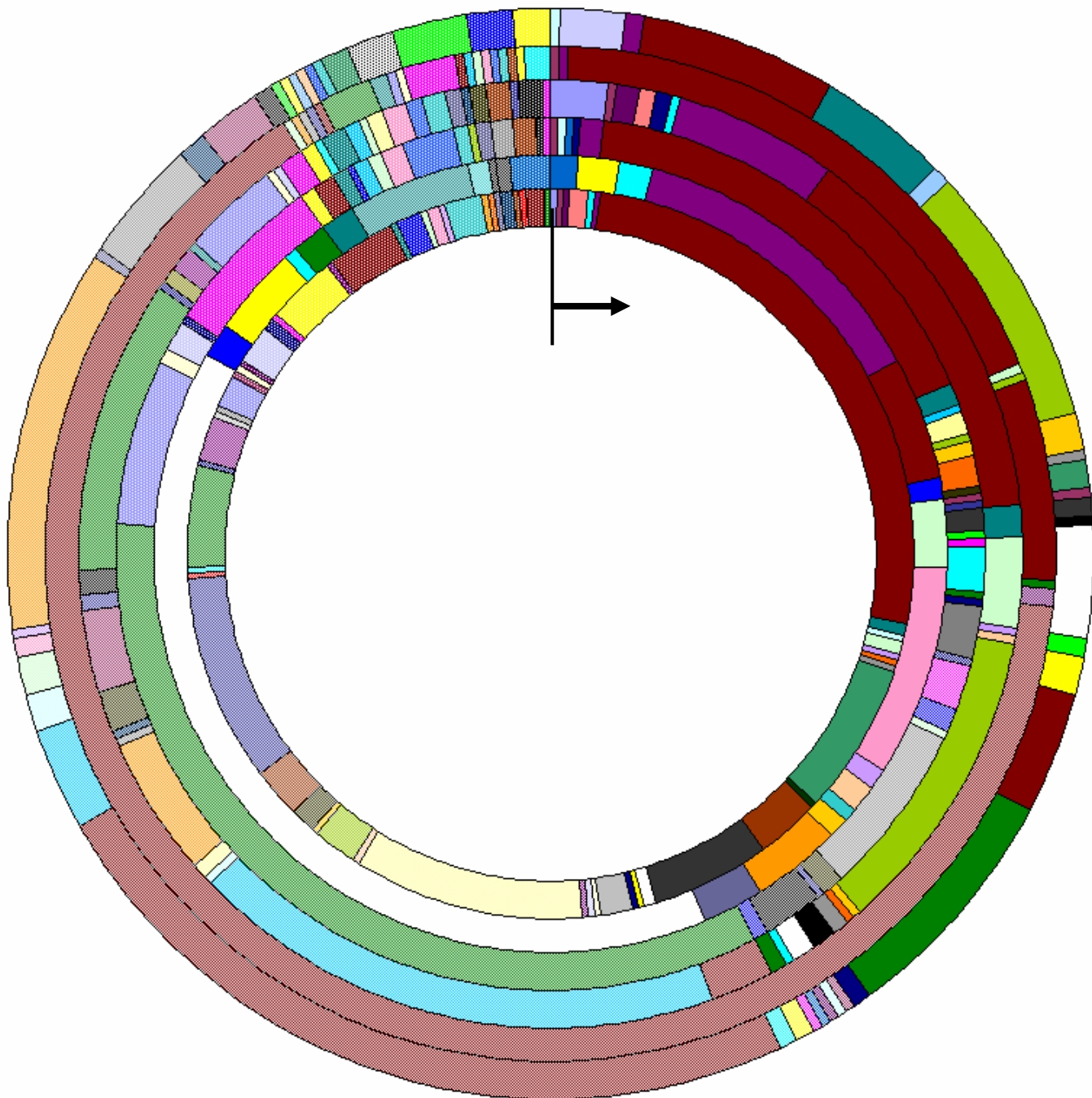
- [1] Dr. V. K.: *Český herbář*. nakl. Alois Hynek, Praha 1899.
- [2] Korhoňová M., et al.: *Chem. Listy* 101, 217–219 (2007).
- [3] Elmore J.S., Erbahadir M.A., Mottram D.S.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 2638–2641 (1997).
- [4] Fitzgerald G., et al.: *J. Chromatogr. A* 896, 351–359 (2000).
- [5] Korhoňová M., et al.: *Talanta* 80, 710–715 (2009).
- [6] Barták P., et al.: *J. Sep. Sci.* 26, 715–721 (2003).
- [7] Gauvin A., Ravaomanarivo H., Smadja J.: *J. Chromatogr. A* 1029, 279–282 (2004).
- [8] Sajjadi S.E., Mehregan I.: *Iran. J. Pharm. Res.* , 57-58 (2003).
- [9] Jirovetz L., et al.: *Acta Pharm.* 53, 73–81 (2003).
- [10] Krauze-Baranowska M.: *Z. Naturforsch.* 57c, 478–482 (2002)
- [11] Iwasaki Y., et al.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 38, 347. (1997).
- [12] Vonášek F., et al.: *Látky vonné a chuťové*. SNTL, Praha 1964.
- [13] Klouda P.: *Základy biochemie*. nakl. Pavel Klouda, Ostrava 2000.
- [14] De las Heras B., et al.: *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3, 171-185 (2003).
- [15] Terpene In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, , [cit. 2010-04-04]. Dostupné z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Terpene>>.
- [16] Aroma compound In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, , [cit. 2010-04-04]. Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Aroma_compound>.
- [17] Pawliszyn J., Artur C.L.: *Anal. Chem.* 62, 2145-2148 (1990).
- [18] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J.: *J. Chromatogr. A* 880, 35–62 (2000).
- [19] Lord H., Pawliszyn J.: *J. Chromatogr. A* 885, 153–193 (2000).
- [20] Štulík a kol.: *Analytické separační metody*. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2005.

- [21] *The University of Bristol, School of Chemistry* [online]. 2009 [cit. 2010-04-15]. MASS SPECTROMETRY RESOURCE. Dostupné z WWW: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/quad-massspec.html>>.
- [22] HARDY, J.K. *James K. Hardy and The University of Akron, Ohio* [online]. 2000 [cit. 2010-04-11]. Dostupné z WWW: <http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/Mass_Spec/index.html>.
- [23] Scott R. P. W.: *Tandem technics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England 1997.
- [24] Kovats E.: *Helv. Chim. Acta* 41, 1915-1932 (1958).
- [25] van den Dool H., Kratz P.D.: *J. Chromatogr. A* 11, 463-471 (1963).
- [26] P.J. Linstrom and W.G. Mallard, Eds., NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov>, (citováno 1. 4. 2010).
- [27] El-Sayed A. 2008. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <<http://www.pherobase.com>>. (citováno 1.4.2010).

PŘÍLOHY

Prstencový diagram vůně bylinných likérů.

Vzorky jsou seřazeny v pořadí od vnitřku prstence dle tabulky 4 (Fernet, Squash Cannabis, Becherovka, Bylinná hořká, Jägermeister, Magister). Látky jsou zobrazeny podle retenčního indexu ve směru šipek.



Legenda

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| α-Pinene | Camphene | 1,1-dimethoxy-2-methylbutane |
| Benzaldehyde | β-Pinene | β-Myrcene |
| Ethyl hexanoate | Octanal | Phelandrene |
| 3-Carene | 1,4-Cineol | α-Terpinene |
| α-Cymene | Limonene | Eucalyptol (=1,8-Cineol) |
| Indane | 2-heptyl acetate | trans-Ocimene |
| γ-Terpinene | Artemisia ketone | 1-Octanol |
| 2-methylpropyl senecioate | Terpinolen | p-Cymene |
| 2-Nonanone | β-Camphenone | Linalool |
| Nonanal | p-Ethylanisole | (E)-Thujone (=β-Thujone) |
| Butyl senecioate | Camphor | Isopulegol |
| trans-Menthone | Isoborneol | Pinocamphone |
| cis-Menthon | Borneol | Ethyl benzoate |
| Menthol | Isopinocampone | 4-Terpeneol |
| Neoisomenthol | Verbenyl ethyl ether | Pentyl senecioate |
| α-Terpeneol | Methyl salicylate | Ethyl octanoate |
| Estragol | Decanal | Octyl acetate |
| Cinnamaldehyde (Z) | Citronellol | Thymol methyl ether |
| cis-hex-3-enyl valerate | Chrysanthenyl acetate (E) | Pulegone |
| Neral (=cis-Citral) | 3-methylhexyl crotonate | Carvone |
| Anethol (Z) | Piperitone | Geraniol |
| Linalyl acetate | Chrysanthenyl acetate (Z) | Cinnamaldehyde (E) |
| Geranial (=trans-Citral) | Perillaldehyd | Neomenthyl acetate |
| Anethol (E) | Hexyl senecioate | Bornyl acetate |
| Safrol | Thymol | 2-Undecanone |
| Menthyl acetate | Ethyl nonanoate | Carvacrol |
| Undecanal | Neoisomenthyl acetate | Nonyl acetate |
| Heptyl senecioate | δ-Elemene | Ethyl hydrocinnamate |
| α-Terpenyl acetate | α-Cubebene | Citronellyl acetate |
| Eugenol | Neryl acetate | Ylangene |
| Isosafrol | Copaene | Bourbonene |
| Geranyl acetate | β-Elemene | Ethyl decanoate |
| Diphenyl ether | Cyperene | Eugenol methyl ether |
| γ-Caryophyllene | Dodecanal | α-Gurjunene |
| Decyl acetate | (Z)-α-Bergamotene | Caryophyllene (trans, β) |
| neidentifikovaný seskviterpen | Calarene | γ-Elemene |
| (E)-α-Bergamotene | Aromadendrene | Isogermacrene D |
| α-Caryophyllene (=Humulene) | β-Farnesene (E) | Alloaromadendrene |
| Ethyl cinnamate (E) | neidentifikovaný seskviterpen | Aristolene |
| 1-Dodecanol | γ-Murolene | α-Amorphene |
| α-Curcumene | β-Selinene | Eremophilene |
| δ-Selinene | γ-Maaliene | α-Selinene |
| γ-Amorphene | α-Murolene | α-Bisabolene (Z) |
| β-Bisabolene | Linalyl valerate | Ionol (=Butylated hydroxytoluene) |
| γ-Cadinene | α-Panasinsene | Myristicin |
| Calamene | δ-Cadinene | Eugenyl acetate |
| Cadine-1,4-diene | β-Panasinsene | Selina-3,7(11)-diene |
| α-Calacorene | neidentifikovaný ox. seskviterpen | Germacrene B |
| Nerolidol (E) | β-Calacorene | Neryl isovalerate |
| Caryophyllene oxide | Foeniculin (Z) | Neryl 2-methylbutanoate |
| Ethyl dodecanoate | neidentifikovaný ox. seskviterpen | β-Elemenone |
| neidentifikovaný ox. seskviterpen | α-Murolol | ar-Turmerone |
| Cadalene | Foeniculin (E) | neidentifikovaný ox. seskviterpen |
| Germacron (E,E) | | |