



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ METOD DERIVATIZACE V PLYNOVÉ CHROMATOGRÁFII

USE OF DERIVATIZATION METHODS IN GAS CHROMATOGRAPHY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Boglárka Brédová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1374/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Boglárka Brédová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití metod derivatizace v plynové chromatografii

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat rešerši na téma využití derivatizace v plynové chromatografii pro různé typy organických sloučenin.
2. Ověřit možnosti derivatizace pro stanovení mastných kyselin ve vzorcích oleje a využití derivatizace pro stanovení organických látek ve vzorku extraktu semínek z vinné révy.
3. Shrnutí získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Boglárka Brédová
student(ka)

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Štúdia bola zameraná na overenie možností derivatizácie v plynovej chromatografii pre stanovenie mastných kyselín v olejových vzorkách a na využitie derivatizácie pre stanovenie organických látok vo vzorke extraktu semienok z vínnej révy. Teoretická časť sa zaoberá charakteristikou jednotlivých analytov. V ďalšej časti sú popísané derivatizačné metódy a transesterifikácie pre stanovenie mastnej kyseliny. Posledná kapitola sa venuje základným poznatkom o plynovej chromatografii a jej prístrojovom vybavení. Experimentálna časť bola rozdelená do troch kapitol: analýza mastných kyselín pomocou transesterifikácie, stanovenie mono-, di- a triglyceridov pomocou derivatizácie a analýza extraktov semienok z vínnej révy. V experimentálnej časti práce boli analyzované tri druhy olejov: makový, ľanový a orechový olej. Najčastejšie vyskytujúce mastné kyseliny v rastlinných olejoch sú kyselina palmitová, stearová, olejová, linolová a linolénová. Optimalizácia metódy prebiehala s použitím derivatizačného činidla MSTFA.

Stanovenie metylesterov mastných kyselín bolo prevedené na plynovom chromatografe s plameňovým ionizačným detektorom. Pre potvrdenie výskytu mastných kyselín prebiehala doplnková analýza použitím plynového chromatografu s hmotnostným spektrometrom. Analýza extraktu z vínnej révy tiež prebiehala na GC/MS. Metóda bola najviac vyhovujúca s použitím troch derivatizačných činidiel MSTFA, BSTFA a BSA+TMCS.

Kľúčové slová

plynová chromatografia, GC-FID, GC/MS, derivatizácia, mastné kyseliny, metyl estery mastných kyselín, makový olej, ľanový olej, orechový olej

Abstract

This study is focused on verifying the possibility of derivatization in gas chromatography for the determination of fatty acids in oil samples and on the use of derivatization for the determination of organic substances in a sample of vine seed extract. The theoretical part deals with the characteristics of individual analytes. In the next section derivatization methods and transesterifications for fatty acid determination are described. The last chapter deals with the basic knowledge of gas chromatography and its instrumentation. The experimental part was divided into three chapters: analysis of fatty acids by transesterification, determination of mono-, di-, and triglycerides by derivatization and analysis of grape seed extracts. Three types of oils were analyzed in the experimental part: poppy, linseed and nut oil. The most common fatty acids in plant oils are palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids. The optimization method was carried out using the derivatizing agent MSTFA.

The determination of fatty acid methyl esters was measured on a gas chromatograph with a flame ionization detector. To confirm the presence of fatty acids, additional analysis was used on gas chromatograph with a mass spectrometer. Analysis of the grape extract was also performed on GC/MS. The method was most convenient using MSTFA, BSTFA and BSA+ TMCS derivatizing agents.

Keywords

gas chromatography, GC-FID, GC/MS, derivatization, fatty acids, methyl esters of fatty acids, poppy oil, linseed oil, nut oil

BRÉDOVÁ, Boglárka. *Využití metod derivatizace v plynové chromatografii*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115602>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ludmila Mravcová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

V Brne dňa 24.5.2019

Boglárka Brédová

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Ludmile Mravcovej, Ph.D. za cenné rady a pripomienky pri tvorbe tejto práce. Ďalej by som chcela poďakovať rodine a blízkym za podporu a vytvorenie ideálnych podmienok ku štúdiu.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 2 |
| 2. Teoretická časť..... | 3 |
| 2.1 Analyzované vzorky..... | 3 |
| 2.1.1 Makový olej..... | 3 |
| 2.1.2 Ľanový olej..... | 4 |
| 2.1.3 Orechový olej..... | 4 |
| 2.1.4 Vinič hroznorodý..... | 5 |
| 2.2 Transesterifikácia..... | 6 |
| 2.3 Derivatizácia..... | 7 |
| 2.3.1 Derivatizácia z pohľadu reakcie..... | 8 |
| 2.3.2 Všeobecný prehľad derivatizačných činidiel..... | 12 |
| 2.4 Plynová chromatografia..... | 17 |
| 2.4.1 Schéma a popis funkcie plynového chromatografu..... | 17 |
| 2.5 Súčasné stanovenie voľných mastných kyselín, mono-, di- a triglyceridov pomocou derivatizácie..... | 20 |
| 3. Experimentálna časť..... | 21 |
| 3.1 Prístrojové vybavenie a pomôcky..... | 21 |
| 3.2 Chemikálie..... | 21 |
| 1.1.1 Derivatizační činidla..... | 21 |
| 3.2.1 Štandardy..... | 21 |
| 3.2.2 Rozpúšťadla..... | 21 |
| 3.2.3 Analyzované vzorky..... | 22 |
| 3.2.4 Ostatné vzorky..... | 23 |
| 3.2.5 Separačné a detekčné podmienky jednotlivých analýz..... | 23 |
| 3.3 Pracovné postupy..... | 24 |
| 3.3.1 Príprava metanolickeho roztoku hydroxidu draselného (2mol/l)..... | 24 |
| 3.3.2 Transesterifikácia..... | 25 |
| 3.3.3 Derivatizácia olejov..... | 25 |
| 4. Výsledky a diskusia..... | 26 |
| 4.1 Analýza mastných kyselín pomocou transesterifikácie..... | 26 |
| 4.2 Stanovenie mono-, di-, a triglyceridov pomocou derivatizácie..... | 32 |
| 4.3 Analýza extraktu semienok z vínnej révy..... | 34 |
| 5. Záver..... | 38 |
| 6. Zdroje..... | 39 |
| 7. Zoznam použitých skratiek a symbolov..... | 43 |

1. Úvod

Olejniny sú rôznorodé rastliny, ktoré majú v poľnohospodárstve významné postavenie pre ich všestranné využitie. Vo svojich plodoch, semenách a prípadne iných častiach rastlín obsahujú lipidy v takom množstve, že je ekonomické ich spracovávať. Napriek veľkej obľube potravín s prítomnosťou maku, orechov alebo ľanu spotrebiteľia veľakrát nevedia o obsahu vitamínov a minerálnych látok, ktoré sú z hľadiska zdravej ľudskej výživy veľmi prospešné pre náš organizmus.

V súčasnosti je daná problematika dosť aktuálna, pretože sa kladie veľký dôraz na zdravú ľudskú výživu a vyváženosť potravín v jedálnom lístku konzumentov. Čoraz viac sa stretávame s liečivými účinkami rastlinného oleja. Odporúča sa ho používať na zlepšenie kvality vlasov, nechťov, uvoľňuje kŕče, tlmí bolesti hlavy a prospešne pôsobí aj na zregenerovanie popraskanej pokožky.

Rastlinné oleje sú organické zlúčeniny, ktoré obsahujú uhlík, vodík a kyslík. Oleje sa líšia od tukov predovšetkým tým, že sú kvapalné pri izobarovej teplote, zatiaľ čo tuky sú pevné. Vo svojej štruktúre majú oleje mastné kyseliny, ktoré sa od seba líšia dĺžkou uhlíkového reťazca a stupňom nasýtenosti. Acylglyceroly (glyceridy) sú estery vyšších mastných kyselín a glycerolu. Podľa počtu esterifikovaných –OH skupín v glycerole ich môžeme rozdeliť na monoglyceridy, diglyceridy a na triglyceridy. Nevýhodou analýz olejov je, že nemôžeme stanoviť obsah mono-, di-, triglyceridov. V posledných rokoch už existujú metódy na bionafty (prírodné palivo vyrobené z ropy), kde je možné analyzovať mono-, di-, triglyceridy s derivatizáciou.

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce je overiť možnosti derivatizácie pre stanovenie mastných kyselín v olejových vzorkách a využitie derivatizácie pre stanovenie organických látok vo vzorku extraktov semienok z vínnej révy.

2. Teoretická časť

2.1 Analyzované vzorky

2.1.1 Makový olej

Makové rastliny (*Papaver somniferum L.*) patria do podskupiny *Papaveroideae* a do skupiny *Papaveraceae* - zahrňuje 44 rodov a 760 druhov. Väčšina týchto rastlinných druhov je bylennými rastlinami, niektoré výnimky sú drevené kríky. Mak sa pestuje v oblastiach, kde sú horúce letá a mierne dažde. Jeho olej zo semien sa používa na varenie v Turecku. Využíva sa na výrobu farieb, príchuť, dekoratívnych predmetov a výrobu kozmetiky. Makový olej sa tiež používa ako náplň v cukrárenských a pekárenských výrobkoch. Vďaka vysokému obsahu polynenasýtených mastných kyselín je vhodný na použitie v ľudskej výžive. Trend pestovania a využívania maku sa zvyšuje v dôsledku priaznivých vlastností spojených s ich konzumáciou. Hlavným cieľom pestovania maku v rôznych krajinách je produkcia ópia. Dominantné mastné kyseliny v makovom oleji sú kyseliny linolová, olejová a palmitová [1, 2, 3].

Makový olej je veľmi významný liečebný olej, ktorý obsahuje veľké množstvo vápnika a vitamínu D. Makový olej sa používa ako liečivo proti osteoporóze, proti rakovine, proti nádorom, teda proti strácaniu kostného tkaniva a proti mäknutiu kostí. Je dokonca účinnejší ako mlieko. Pomimo hlavných účinkov taktiež pozitívne vplýva na mentalitu, je účinný proti bolestiam hlavy a uvoľňuje svalové kŕče. Používa sa taktiež na pokožku, kde sa natiera na zapálené a suché miesta, ktorým účinne makový olej pomáha [4, 5].

Zloženie makového oleja: makový olej je bohatým zdrojom kyseliny olejovej (72%), čo z neho robí pozitívny olej. Vysoký podiel kyseliny olejovej znižuje cholesterol v krvi. Má vysoký podiel stráviteľnosti, približne 96% denne príjem 50 g.

Chemické zloženie oleja zo semien extrahovaného z indického maku podľa Singh a spol. (1999):

- kyselina palmitová (16: 0): 8,10 - 21,48%
- kyselina stearová (18: 0): 1,40 až 10,80%
- kyselina olejová (18: 1): 60,22-73,90%
- kyselina linolová (18: 2): 12,00-30,00%
- kyselina linolénová (18: 3): 0,00-9,40%
- mangán (29 mg / kg)
- meď (22,9 mg / kg)
- horčík (15,6 mg / kg)
- zinok (130 mg / kg).

Olej z makových semien obsahuje vysoko komplexné výživové látky. Kyselina linolová je nestabilná a náchylná na oxidáciu vďaka svojej špeciálnej molekulárnej štruktúre. Preto, ako zlepšiť chemickú stabilitu makového oleja počas procesu výroby a skladovania, je obrovskou výzvou, musí byť prekonaná [6].

2.1.2 Ľanový olej

Typický ľanový olej má veľký význam pre výživu a chemický priemysel z dôvodu vysokého obsahu PUFA (polynenasýtené mastné kyseliny), viac ako 60% LA (kyselina linolová). Z rovnakého dôvodu sa tento olej neodporúča používať ako jedlý olej na vyprážanie a varenie. Polynenasýtená LA sa ľahko autooxiduje. Autooxidácia je hlavnou príčinou vzniku nepríjemných chutí počas skladovania alebo varenia a nakoniec vedie k polymerizácii oleja, čo je vlastnosť výhodná pri výrobe linolea, ale nie v kulinárskom umení [7].

Epoxidovaný ľanový olej (ELO) sa bežne používa ako zmäkčovadlo pre PVC a epoxidové živice na zabezpečenie pružnosti, ako aj pre nátery a aplikácie lepidiel [8].

Chemické zloženie oleja zo semien extrahovaného zo západnej planiny Rumunská (2012) [9, 10]:

- kyselina palmitová (16: 0): 4,00 – 8,58%
- kyselina stearová (18: 0): 2,00 až 4,43%
- kyselina olejová (18: 1): 16,00-18,51%
- kyselina linolová (18: 2): 65,00-77,25%
- kyselina linolénová (18: 3): 0,10-3,21%
- mangán (26,15 mg / kg)
 - meď (1,31 mg / kg)
 - železo (59,92 mg / kg)
 - zinok (21,23 mg / kg)
 - olovo (0,08 mg / kg)
- kadmium (0,65 mg / kg).

Ľanový olej sa považuje za dobrý olej na sušenie, ktorý sa používa hlavne na prípravu náterových farieb a lakov. Uskutočnil sa značný výskum aplikácií ľanového oleja. Z lekárskeho hľadiska je ľanový olej užitočný pri liečbe úzkosti, problémov s prostatou, vaginitídy, úbytku hmotnosti a niektorých typov rakoviny [10].

2.1.3 Orechový olej

Orechy obsahujú mnoho zložiek vrátane špecifických mastných kyselín, ktoré môžu byť účinné proti rakovine. Aj keď bol opísaný antikarcinogénny účinok niektorých individuálnych mastných kyselín v orechovom oleji, účinok samotného orechového oleja na rakovinové bunky pažeráka nebol doteraz skúmaný. Okrem ALA obsahuje orechový olej ďalšie typy mastných kyselín, ako je kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina olejová a kyselina linolová, ktoré môžu mať antikarcinogénne účinky [11].

Vlašský orech (*Juglans regia L.*) je vysoko výživná potrava, ktorý je bohatý na polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA). Chráni mozog pred mnohými javmi súvisiacimi so starnutím a môže prípadne zmierniť pokles kognitívnych schopností súvisiacich s vekom. Vlašské jadrá všeobecne obsahujú asi 60% oleja, ale toto množstvo sa môže pohybovať od 52 do 70%. V závislosti od kultivaru, miesta pestovania a rýchlosti zavlažovania. Hlavnými

zložkami oleja sú triacylglyceroly, voľné mastné kyseliny, diacylglyceroly, monoacylglyceroly, steroly, estery sterolov a fosfatidy, ktoré sú prítomné len v malých množstvách. Hlavné mastné kyseliny nachádzajúce v orechovom oleji sú olejové, linolové a kyseliny linolénové. Podľa Simopoulova [12] sú vlašské orechy jedinečné, pretože majú dokonalú rovnovahu n-6: n-3 PUFA, pomer 4: 1, čo sa prejavilo znížením výskytu kardiovaskulárneho rizika. Preto je potrebné stanoviť jednoduché, rýchle simultánne stanovenie obsahu nenasýtených mastných kyselín v orechovom oleji. Hlavné mastné kyseliny v oleji z vlašských orechov boli určené použitím GC alebo GC-MS [13].

Chemické zloženie oleja zo semien extrahovaného z Turecka. (2014) [14]:

- kyselina palmitová (16: 0): 4,00 – 10,50%
- kyselina stearová (18: 0): 1,00 až 2,60%
- kyselina olejová (18: 1): 64,00-76,40%
- kyselina linolová (18: 2): 11,00-15,70%
- kyselina linolénová (18: 3): 1,00-4,30%
- mangán (23,70 µg / g)
 - meď (19,5 µg / g)
 - železo (59,92 µg / g)
 - zinok (27,00 µg / g)
 - olovo (34,40 µg / g)
- kadmium (0,46 µg / g).

2.1.4 Vinič hroznorodý

Vinič hroznorodý (ľudovo vinná réva) je liánovitá, svetlomilná rastlina s mohutným koreňovým systémom, patriaci do čeľade *Vitaceae* – viničovité. Pôvodom zo Stredomoria, určená na produkciu hrozna alebo na použitie ako množiteľský materiál pre tieto rastliny.

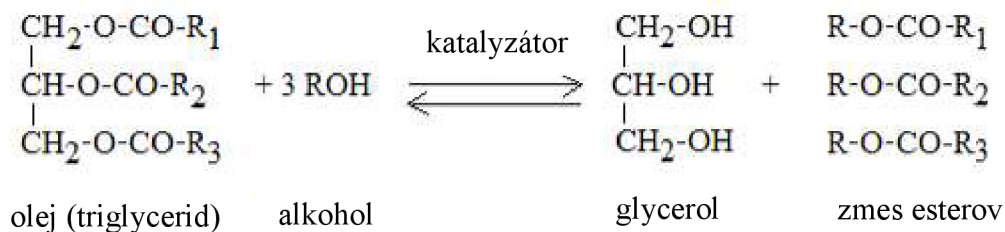
Výskumníci predpokladajú, že prirodzene sa vyskytujúce zlúčeniny poskytujú novú príležitosť na kontrolu kardiorespiračných interakcií. Extrakty z hroznových jadier obsahujú väčšinu účinných látok z hrozna čierneho, *Vitis vinifera*, ktorý je jednou z najviac pestovaných plodín na svete. Vzhľadom na svoju vysokú úroveň antioxidantov a polyfenolov. Vinná réva si získala záujem vedcov, pretože sa ukázala ako sľubný protizápalový a imunomodulačný antioxidant. Používa sa ako liečivo proti cukrovke, proti starnutiu, proti rakovine a má kardioprotektívne účinky. Výťažky z hroznových jadier sa ukázali byť vysoko bohatým zdrojom fenolových zlúčenín ako katechín, flavonoly, prokyanidín, antokyanín, kyselina gallová a resveratrol. Resveratrol je fytoalexín z hroznových semien. Bolo zistené, že jeho produkcia je najvyššia pri environmentálnych stresoch, ako sú infekcie rastlín, podnebie, ozón, UV svetlo. Zohráva kľúčovú úlohu v ochranných a terapeutických účinkoch extraktov z hroznových jadier [15].

V bobuliach hrozna sú obsiahnuté: cukry, kyseliny, dusíkaté látky, fenolové látky, aromatické látky a minerálne látky. Najvýznamnejšie organické kyseliny v hrozne sú kyselina vinná a kyselina jablčná, ktoré predstavujú 70 - 90% zo všetkých organických kyselín, ktoré sa nachádzajú v bobuliach viniča. V malom množstve sa tu vyskytuje tiež kyselina citrónová. Listy

a bobule sú schopné tvoriť kyselinu vínnu a jablčnú. Obe organické kyseliny sa v zelených bobuliach vyskytujú v maximálnom množstve pred zmäkčením. V čase mäknutia sa môže kyselina jablčná vyskytovať aj vo väčších množstvách než kyselina vínna. Kyselina vínna sa v bobuliach hromadí najmä v šupke a vo vonkajšej časti dutiny. Kyseliny hlavne ovplyvňujú sensorický prejav vyrobeného vína, ale zároveň môžu slúžiť ako konzervačná látka. Kyseliny, ktoré hrozno obsahujú, priaznivo ovplyvňujú trávenie a chuť k jedlu [16].

2.2 Transesterifikácia

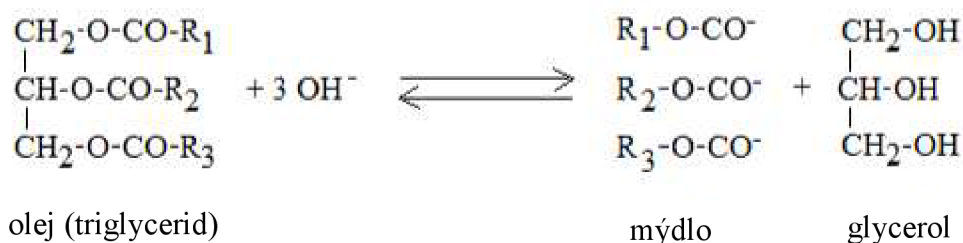
Transesterifikácia je reakcia triglyceridov (rastlinných olejov) alebo živočíšnych tukov s alkoholom, pri ktorých vzniká zmes esteru vyšších mastných kyselín (špeciálne bionafta) a glycerol, ako je znázornené na obrázku (Obrázok 1). Tieto dve vznikajúce nemiesiteľné fázy je potrebné oddeliť. Vzniknutý glycerol sa dá ďalej používať, preto je táto reakcia bezodpadová. Je to proces výmeny organických alkylových skupín (R_1 , R_2 , R_3) esteru rastlinného oleja s metylalkoholom metylovej skupiny. Tieto reakcie sú často katalyzované pridaním kyslého alebo bázičného katalyzátora. V transesterifikačnom mechanizme karbonylový uhlík východiskového esteru rastlinného oleja podlieha nukleofilnému napadnutiu prichádzajúceho alkoxidu z katalyzátora za vzniku tetraedrického medziproduktu, ktorý buď prechádza na východiskový materiál alebo prechádza na transesterifikovaný produkt a glycerol, ako je uvedené v obrázku (Obrázok 1). Pri tejto reakcii sú metanol a etanol najčastejšie používané alkoholy kvôli ich dostupnosti a nízkym nákladom. Táto reakcia sa široko používa na zníženie viskozity rastlinného oleja a konverziu triglyceridov na estery [17].



Obrázok 1 Chemická štruktúra procesu transesterifikácie [17]

kde R_1 , R_2 , R_3 : Alkylová skupina

Bočná reakcia



Obrázok 2 Bočná reakcia procesu transesterifikácie (zmydelňovanie)[17]

Pri použití zásaditého katalyzátora dochádza k bočnej reakcii, tzv. zmydelňovaniu, ktorá prebieha reakciou hydroxidu s glyceridmi alebo s voľnými vyššími masnými kyselinami v prítomnosti vody. Mydlá, ktoré vznikajú zhoršujú separáciu produktu a znižujú tým výťažok esterov. Dôvodom je, že voda posunuje rovnováhu reakcie alkoholu a hydroxidu k východiskovým látkam. Hydroxid s alkoholom reaguje za vzniku alkoholátu a vody, táto reakcia je rovnovážna. Pri tom alkoholát je katalyzátor transesterifikácie a hydroxid reaguje na mydlo [18].

Ak sa v transesterifikácii používa metanol ako alkohol, ide o metylestery (ME); podobne, ak sa etanol používa ako alkohol, reakčným produktom budú etylestery (EE). Ale v oboch prípadoch je glycerín vedľajším produktom transesterifikácie [19].

Transesterifikácia funguje dobre, keď východiskový olej má vysokú kvalitu. Do surovín na prípravu bionafty sa však často používajú pomerne nízke oleje. V prípadoch, keď je obsah voľných masných kyselín v oleji vyšší než 1%, vznikajú ťažkosti v dôsledku tvorby mydla, ktoré podporuje emulziu počas fázy premývania vodou a pri obsahu FFA (Free Fatty Acids - voľné masné kyseliny) nad 2% sa proces stáva nefunkčným [20].

2.3 Derivatizácia

Derivatizácia je proces chemickej modifikácie zlúčeniny za vzniku novej zlúčeniny, ktorá má vlastnosti, ktoré sú vhodné na analýzu s použitím GC alebo HPLC. Chemická štruktúra zlúčeniny zostáva rovnaká, len sa modifikujú špecifické funkčné skupiny reakčnej zlúčeniny na derivát. Veľmi veľa organických látok nemožno previesť do plynnej fázy, lebo sa pri pokuse o splynovanie rozkladajú. Hlavným dôvodom pre využitie derivatizácie v plynovej chromatografii je teda zvýšenie prchavosti, prípadne tepelnej stability analyzovaných látok v dôsledku zníženia polarít. Vysoký bod varu totiž majú nielen zlúčeniny s vyššou relatívnou molekulovou hmotnosťou, ale aj zlúčeniny, nesúce vo svojej molekule polárne funkčné skupiny. Je proces, pri ktorej polárna skupina v molekule (napríklad karboxylová alebo hydroxylová skupina) je chemicky konvertovaná na nepolárnu skupinu, aby sme získali prchavú molekulu. Potom sa získajú odchylné chemické a fyzikálne vlastnosti, aby boli detekovateľné a analyzovateľné pomocou GC/MS [21, 22, 23].

Vzhľadom na problematickú povahu tohto procesu (neúplnú reakciu a tvorbu viacerých derivátov) a dodatočnú zložitosť vedúcej metodológie k nízkej regenerácii a zlej reprodukčnej chromatografii, derivatizácia je často poslednou možnosťou. Napríklad bežne sa používa derivatizácia pri farmaceutickej analýze, ak API (Active Pharmaceutical Ingredient – aktívne farmaceutické prísady) nemá chromofór na UV detekciu alebo fluorofór na detekciu fluorescencie. Bežné reakčné činidlá spojené s derivatizáciou zahŕňajú alkylbromidy, chloridy kyselín a trimetylsilylestery, ktoré reagujú na funkčnú skupinu alebo skupiny neabsorbujúcich analyzátorov. Predbežná derivatizácia sa môže vykonávať v mnohých autodávkovačoch alebo automatizovaných spracovateľoch kvapalín [24].

Sú k dispozícii rôzne derivatizačné reakcie so širokým spektrom reagentov spoločné s analýzou GC. Tieto reakcie sú rozdelené do niekoľkých hlavných kategórií: silylácia, acylácia, alkylácia a metylácia. Používajú derivatizáciu preto, aby sa zvýšila stabilita, prchavosť a ďalšie vlastnosti látky, tak ako to vyžadujú postupné metódy stanovenia [25, 26].

Pri derivatizácii dochádza k zámene aktívneho vodíka polárnej skupiny najčastejšie za alkylovú, silylovú či acylovú. Blokovaním protónu sa zamedzí tvorbe vodíkového mostíka, čo vedie k zvýšeniu prchavosti derivátov v porovnaní s pôvodnými nederivatizovanými látkami. Na druhej strane sú prípady, kedy je nadmerná prchavosť analytu nežiadúca, a chemická derivatizácia potom môže byť použitá k tvorbe derivátov s nižšou prchavosťou s cieľom minimalizovať straty počas manipulácie. Derivatizácia je tiež využívaná na zamedzenie nežiadúcich sorpcií. Polárna skupina totiž môže vytvárať silné interakcie so stenou kolóny alebo so stacionárnou fázou, ktoré sa prejavujú nelinearitou v kalibračnej závislosti. Tvorba derivátov môže byť využitá pre zlepšenie rozlíšenia [27, 28].

2.3.1 Derivatizácia z pohľadu reakcie

Derivatizačné reakcie používané na plynovú chromatografiu spadajú do troch všeobecných typov reakcií, konkrétne; alkyláciou všeobecného procesu je esterifikácia, acylácia a silylácia. Prostredníctvom týchto troch procesov sa vysoko polárne materiály, ako sú organické kyseliny, amidy, polyhydroxylúčeniny, aminokyseliny, stávajú vhodnými na GC analýzu tým, že sú dostatočne prchavé. Tieto všeobecné postupy sú diskutované nižšie [29].

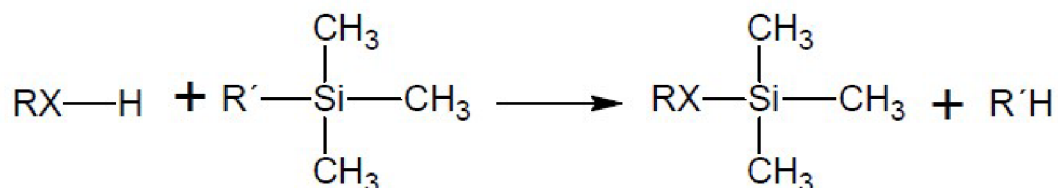
Silylácia

Silylácia, ako typ derivatizácie, sa zameriava na zníženie polárneho charakteru reakčnej zlúčeniny. Táto reakcia sa uskutočňuje nahradením labilného vodíka v karboxylovej, hydroxylovej, amínovej alebo amidovej funkčnej skupine do nepolárneho fragmentu [3131].

Silylácia je najčastejšie používaný postup pre derivatizáciu sacharidov, ktorý poskytuje im požadovanú volatilitu a stabilitu. Je jedným z najviac rozsiahle a úspešne používaných prístupov z niekoľkých dôvodov:

- porovnaním s plynovodnými zlúčeninami sú deriváty s vyššou volatilitou a lepšou termostabilitou, vhodnejšie pre GC analýzu (vysoká teplota do 300 °C).
- väčšina silylácie prebieha rýchlo v krátkom čase
- metóda má veľký potenciál pri poskytovaní lepšej odozvy detektoru, najmä detektor MS.

Princípom reakcie je pôsobenie silylačného činidla na zlúčeniny obsahujúce polárnu skupinu s aktívnym vodíkom (OH, COOH, NH, SH). Najčastejšie reakcie sú trimetylsilylačné, kedy je aktívny vodík v polárnej skupine látky nahradený trimetylsilylovou skupinou - Si(CH₃)₃ tzv. TMS (Obrázok 3).



Obrázok 3 Trimetylsilylačné reakcie

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

Trimetylsilyl skupina (TMS) je veľmi populárna a všestranná kremičitanová skupina pre GC analýzu. TMS činidlá a ich deriváty reagujú s aktívnymi atómami vodíka. Najobľúbenejšie činidlá na báze trifluoroacetamidu sú N,O-Bis-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) a N-metyl-N-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) [28, 32].

Silylácia je reverzibilná reakcia. Prítomnosť multifunkčných zlúčenín poskytuje jedinečné vlastnosti, napríklad poskytujú aktívnu funkčnú skupinu pre ďalšiu modifikáciu alebo ponúka dobré fyzikálne vlastnosti. Rovnako ako akákoľvek derivatizačná technika ani silylácia nie je bez problémov. Napríklad problémom je tvorba nežiadúcich vedľajších produktov s acetamidom.

Komerčne dostupné silylačné činidlá majú rozdiely vo svojich reakčných vlastnostiach. Niektoré z nich sú univerzálne, ale väčšinou reagujú v špecifickej funkčnej skupine [33, 34].

Potrebné informácie sú ľahko dostupné v priečinkoch výrobcov. Účinnosť silylácie závisí od rôznych parametrov, ako je reakčný čas, teplota, prítomnosť katalyzátora a použitého rozpúšťadla.

Ako rozpúšťadlá pre silylačné reakčné činidlá je možné uviesť pyridín, dimetylsulfoxid (DMSO), dimetylformamid (DMF), tetrahydrofuran (THF) alebo acetonitril (ACN). Pyridín je najpoužívanejší. Plní funkciu rozpúšťadla a katalyzátora. Aby bola derivatizácia účinná, je potrebné reakčnú zmes zahriať. Pre špecifické analyty a silylačné činidlá sú odporúčané rôzne reakčné teploty (25 - 170 ° C) a doba zahrievania (minúty - desiatky hodín) [35].

Zdá sa, že pyridín má veľkú schopnosť podporovať silyláciu. Predpokladá sa, že pyridínové zlúčeniny, ktoré pôsobia ako katalytické Lewisove bázy, reagujú so silylchloridmi za vzniku párov silylpyridíniových iónov, ktorých následná reakcia s alkoholovým substrátom poskytuje silyléterové produkty [36].

Dodávatelia silylačných činidiel často doporučujú prípravu zmesi reakčného činidla s pyridíniom a s prídavkom trimetylchlórsilánu (TMCS) ako katalyzátora. Pyridínium ako rozpúšťadlo pre silylačnú reakciu je dôležité nielen pre účinnosť reakcie, ale tiež pre stabilitu analytov [37].

Acylácia

Acylácia je alternatívou k silylácii a zachováva si niektoré výhody silylácie, ako je napríklad tvorba menej polárnych a prchavých derivátov. Pri acylácii dochádza k zámene aktívneho vodíka polárne skupiny za skupinu acylovou. Uplatňuje sa pri príprave derivátov alkoholov, fenolov, amínov, amidov a tiolov [38].



Obrázok 4 Acylačné reakcie

Kde R = alkyl, aryl a pod .; Y, R' = rôzne; X = O, NH, S

Deriváty sú charakteristické nižšiou polaritou, vysokou prchavosťou a stabilitou. V porovnaní so silyláciou, acylácie sú zamerané na vysoko polárne, viacfunkčné zlúčeniny (napr. sacharidy alebo aminokyseliny). Nedávne spôsoby acylácie sa sústredili na priamu acyláciu z pufrovaných vodných médií, po ktorej nasledovala extrakcia superkritickou kvapalinou alebo tuhou fázou. Acylácia bola tiež výhodným postupom pre derivatizáciu na dosiahnutie niektorých chirálnych separácií pomocou GC. Nadbytok derivatizačného činidla môže spôsobiť problémy s chromatografiou derivatizovaných analytov [39, 40].

Pri príprave derivátov sa zvyčajne pracuje s niekoľkými molárnym nadbytkom acylačného činidla, acylhalogenidu alebo anhydridu, vo vhodnom rozpúšťadle, ktoré je schopné viazať vznikajúce kyselinu a tým posúvať reakčnú rovnováhu v smere tvorby produktu. Najlepšie sa osvedčil pyridín a tetrahydrofurán. Ďalšou veľkou skupinou činidiel sú acylimidazoly, ktoré na rozdiel od acylhalogenidov a anhydridov netvorí kyslé vedľajšie produkty. Reakčná doba (minúty - desiatky hodín) závisí od použitého činidla, rozpúšťadla, analytu a teploty. Teplota sa volí podľa reaktivity činidla v rozmedzí laboratórnej teploty až po bod varu rozpúšťadla. Oproti silylačným činidlám sú acylačné činidlá hydrolyticky stabilnejšie. Veľmi významné je zavádzanie halogénov do molekuly derivátu, ktoré vykazujú selektivnosť pri ECD detekcii. Keďže odozva EC-detektora závisí nielen na druhu halogénu, ale aj na ich počte, sú často využívané polyfluorované deriváty. Acyl deriváty sa riadi istými fragmentačnými zákonitostami, a preto poskytujú užitočné informácie o štruktúre týchto látok v aplikáciách hmotnostnej spektrometrie [40].

Acylácia sa používa hlavne na prípravu acylovaných derivátov NH, OH a SH skupín použitím karboxylovej kyseliny anhydridu kyseliny, acylhalogenidu a aktivovaného acylamidu ako derivatizačných činidiel. Acylácia s anhydridom kyseliny ako derivatizačné činidlo teoreticky predpokladá, že sa uskutočňuje za bezvodých podmienok, aby sa zabránilo hydrolyze derivátov.

Acylácia má veľa výhod, jedna z nich je, že zvyšuje stabilitu analytu ochraňuje nestabilné skupiny. Môže dodať prchavosť zlúčeninám, ako napríklad karbohydráty alebo aminokyseliny, ktoré majú veľa polárnych skupín. Tie sú neprchavé a normálne sa rozkladajú v teple. Pomáhajú chromatografickým separáciám, ktoré by nebolo možné previesť s nederivatizovanými zlúčeninami. Zlúčeniny sú detekované vo veľmi nízkych koncentráciách s použitím detektoru elektrónového záchytu [33].

Alkylácia/esterifikácia

Alkylácia zahrňuje pridávanie alkylovej skupiny (alifatickej alebo aromatickej) do aktívnej funkčnej (H) skupiny. Nahradenie vodíka s alkyl skupinou je dôležité, pretože deriváty majú nižšiu polaritu. Alkylačné činidlá sú používané na zmenu zlúčenín obsahujúce kyslý vodík, ako napríklad karboxylové kyseliny alebo fenoly. Výsledné produkty sú étery, estery, thioetery, thioestery, n-alkylaminy a n-alkylamidy [41].



Obrázok 5 Alkylačné reakci

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

Alkylhalogeny, najmä alkylbromidy alebo alkyljodidy sú časté alkylačné činidlá. Reakcie zvyčajne vyžadujú prítomnosť katalyzátora, (typicky Ag₂O, BaO, NaH atď.) A mnohokrát aj používanie špecifického rozpúšťadla (DMF, DMSO). Ďalším známym činidlom je N, N-dimetylformamid dimetylacetál [33].

K príprave alkylestеров karboxylových kyselín sa využíva esterifikácia. Esterifikácia je reakcia kyseliny s alkoholom za vzniku esteru. Je to veľmi populárna alkylačná metóda. Alkylestery ponúkajú vynikajúcu stabilitu a poskytujú rýchle a kvantitatívne vzorky GC analýza. Výsledky sú najlepšie v prítomnosti katalyzátora, ktoré sa odstraňujú s vodou. Medzi obľúbené katalyzátory patrí chlorovodík alebo thionylchlorid, ktoré môžu byť následne rýchlo odstránené spolu s nadbytkom alkoholu. Kyselina sírová býva tiež využívaná ako katalyzátor, ale nie je až tak obľúbená, pretože sa vyznačuje radom tienistých stránok (dehydratácia, ťažké odstránenie pod.). Dobre riadená esterifikácia takisto vyžaduje odstránenie vytvorenej vody použitím chemických činidiel alebo azeotropickej destilácie. Medzi materiály, ktoré odstraňujú vodu patria molekulové sitá, bezvodý síran alebo látky, ktoré s vodou reagujú, napr. 2,2-dimethoxypropan reaguje s vodou za vzniku acetónu a metanolu. Proces zahrňuje zhlukovanie karboxylovej skupiny kyseliny a hydroxylovej skupiny alkoholu s elimináciou vody [42].

Z esterov majú najväčší význam metylestery, ktoré sa oproti vyšším esterom vyznačujú radom výhod: najväčšou prchavosťou zo všetkých esterov, veľkou reakčnou rýchlosťou a vysokými výťažkami. Metylestery sa pripravujú reakciou kyseliny s metanolom za katalytického pôsobenia Lewisovými kyselinami (BF₃ alebo BCl₃) alebo v prítomnosti koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a kyseliny sírovej. Ďalej je ešte možné pripraviť metylestery reakciou karboxylovej kyseliny s diazometánom v éterový roztok. Tento spôsob prípravy metylestеров je najvhodnejší, pretože sa vyznačuje radom výhod: príprava derivátu je rýchla a proces prebieha za miernych podmienok s vysokým výťažkom, zvyčajne bez tvorby vedľajších produktov. Naopak nevýhody spočívajú v jeho karcinogénnych účinkoch a nestabilite. Reakcia diazometánu s kyselinou prebieha za eliminácie plynného dusíka [43].

2.3.2 Všeobecný prehľad derivatizačných činidiel

Silylačná reakcia je riadená dobre odstupujúcou skupinou, čo znamená odstupujúcu skupinu s nízkou zásaditosťou, schopnosť stabilizovať záporný náboj v prechodnom stave a malé alebo žiadne spätné väzby medzi odstupujúcou skupinou a atómom kremíka. Mechanizmus zahŕňa nahradenie aktívnych vodíkov (v skupinách -OH, -COOH, -NH, -NH₂ a -SH) trimetylsilylovou skupinou. Silylácia potom nastáva prostredníctvom nukleofilného ataku (S_N2), kde čím je odstupujúca skupina lepšia, tým je silylácia lepšia. To vedie k vytvoreniu bimolekulárneho prechodného stavu v prechodnom kroku reakčného mechanizmu. Všeobecné derivatizačné činidlá pre silyláciu sú znázornené v tabuľke (Tabuľka 1). Pri silylácii je najčastejšie používaným rozpúšťadlom pyridín. Hoci pyridín môže produkovať vrcholné chvosty, je to lapač kyselín a bude riadiť reakciu vpred. V mnohých prípadoch je potreba rozpúšťadla, aby bola odstránená silylačnými činidlami [29].

Bežné derivatizačné činidlá pre alkylačné typy reakcií sú dialkylacetáty, diazoalkály, pentafluórbenzylbromid (PFBBr), benzylbromid, fluorid boritý (BF₃) v metanole alebo butanole je tetrabutylamóniumhydroxid (TBH). Niektoré derivatizačné činidlá a ich príslušné vlastnosti sú znázornené v tabuľke (Tabuľka 2). Alkylačné činidlá sa môžu použiť samotne na vytvorenie esterov, éterov a amidov alebo sa môžu použiť v spojení s acylačnými alebo silylačnými činidlami. Reakčné podmienky sa môžu líšiť od silne kyslých až po silne bázické, pričom obe vytvárajú stabilné deriváty. Treba však poznamenať, že reakčné činidlá sú obmedzenejšie na amíny a kyslé hydroxylové skupiny a že reakčné podmienky sú často ťažké, zatiaľ čo činidlá sú často toxické [29].

Acylačné činidlá sa ľahko zameriavajú na vysoko polárne, multifunkčné zlúčeniny, ako sú sacharidy a aminokyseliny. Okrem toho acylačné činidlá ponúkajú výraznú výhodu zavedenia skupín zachytávajúcích elektróny [30], a teda zlepšujú detekovateľnosť počas analýzy. Tieto činidlá sú dostupné ako anhydridy kyselín, acylové deriváty alebo acylhalogenidy. Všeobecné derivatizačné činidlá pre acyláciu sú znázornené v tabuľke (Tabuľka 3) [29].

Tabuľka 1 Súhrn najpoužívanejších silylačných [33,37]

| Silylačné činidlo (skratka) | T. v. [°C/mm Hg] | Vlastnosti |
|---|------------------|---|
| trimethylchlorsilan (TMCS) | 57 | Slabý donor. Má funkciu katalyzátora a obvykle je používaný v kombinácii s činidlami BSA, BSTFA, HMDS a MSTFA. Ako vedľajší produkt vzniká HCl. |
| hexametyldisilazan (HMDS) | 124-127 | Slabý donor, derivatizuje alkoholy a fenoly. Obvykle používaný v kombinácii s TMCS. |
| bis(trimetylsilyl)acetamid (BSA) | 71-73/35 | Vysoko reaktívne, univerzálne činidlo. Produkty vznikajú za miernejších podmienok. Veľmi prchavý. Vedľajší produkt: TMS-acetamid, môže prekryvať píky derivátu. BSA zmesi oxidujú na SiO ₂ , ktorý môže znečistiť FID. |
| trimetylsilylimidazol (TMSIM) | 93-94/14 | Je selektívny, ochotne reaguje s hydroxylovými zlúčeninami, ale nereaguje s aminom. TMSIM sa vzdušnou vlhkosťou rýchle rozkladá za vzniku imidazolu a hexametyldisiloxanu. |
| N,O-bis(trimetylsilyl) trifluoacetamid (BSTFA) | 145-147 | Vysoko reaktívne, univerzálne činidlo. Reaguje rýchlejšie než BSA a poskytuje prchavejší vedľajší produkt. Má charakter rozpúšťadla. Vo svojej štruktúre obsahuje fluór, ktorý potlačuje depozíciu SiO ₂ behom FID detekcie. |
| N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) | 130-132 | Má podobnú donorovú silu ako BSA a BSTFA a môže byť použitý k silylácii všetkých protických skupín. Najprchavejší zo všetkých TMS acetamidov. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |
| N-metyl-N-t-butyl dimetylsilyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) | 172-175 | Pri reakcii s analytom dochádza k zámene aktívneho vodíka za skupinu TBDMS. Tieto deriváty sa oproti TMS derivátom vyznačujú vyššou hydrolytickou stabilitou. |
| t-butyl dimetylsilylchlorid (TBDMSCl) | 125 | Často sa používa v kombinácii MTBSTFA s 1% TBDMSCl. Vhodné pre derivatizáciu aminokyselín. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |
| N,N-diethyl-N-trimetylsilylamin (TMSDEA) | 125-126 | Stredne silný donor, pre derivatizáciu karboxylových kyselín a aminokyselín. Ako katalyzátor sa používa TMCS, trifluoroctová kyselina a pod. |
| N-metyl-N-trimetylsilylacetamid (MSA) | 159-161 | Výborné činidlo pre derivatizáciu kyselín, alkoholu, fenolu a aminu. |
| N,N-dimetyl-N-trimetylsilylamin (TMSDMA) | 84 | Podobné donorové schopnosti a uplatnenie ako TMSDEA. |

Tabuľka 2 Súhrn najpoužívanejších alkylačných a esterifikačných činidiel [33,37]

| Alkylačné a esterifikačné činidlo (skratka) | T. v. [°C/mm Hg] | Vlastnosti |
|--|---------------------|---|
| diazomethan | - | Pre derivatizáciu karboxylových kyselín, alkoholu, fenolu a aminu v prostredí nepolárneho rozpúšťadla. Rýchla reakcia, prebehajúca za miernych podmienok s vysokým výťažkom. Najvhodnejšie činidlo pre prípravu metylesterov. |
| fluorid boritý / alkohol | - | K príprave esterov karboxylových kyselín. Pre metylestery sa využíva tiež metanolický roztok HCl alebo H ₂ SO ₄ . |
| N,N-dimetylformamid dimetylacetal (metyl-8-reagent) | 102-103/ 720 | Reaguje s karboxylovými kyselinami, fenolom, thiolom a aminom. Citlivý voči vlhkosti. Rozpúšťadlo: pyridín, DMF, ACN, THF, alkohol. |
| Trimetylanilinium hydroxid (TMAH) | 65/760 | TMAH v 0,2-M methanolu je činidlo vhodné k príprave methylesterov. |
| pentafluorbenzyl bromid (PFBBBr) | 174-175 | Činidlo k derivatizácii karboxylových kyselín, fenolu a thiolu. Vhodné pre ECD. |

Tabuľka 3 Súhrn najpoužívanejších acylačných činidiel [33,37]

| Acylačné činidlo (skratka) | T. v. [°C/mm Hg] | Vlastnosti |
|---|---------------------|--|
| anhydrid kyseliny trifluoroctové (TFAA) | 39,5-40 | Anhydridy reagujú s alkoholmi, fenolmi a aminmi za vzniku stabilných a vysoko prchavých derivátov. Bazická látka (napr. triethylamin, pyridin, pevný NaHCO ₃) je pridávaná za účelom neutralizácie kyslých vedľajších produktov vznikajúcich behom derivatizácie. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |
| anhydrid kyseliny pentafluorpropionové (PFPA) | 69-70 | |
| anhydrid kyseliny heptafluormáselné (HFBA) | 108-110 | |
| trifluoracetylimidazol (TFAI) | 45-46/14 | Táto skupina látok reaguje za miernych podmienok s alkoholmi, fenolmi, primárnymi alebo sekundárnymi aminmi a thiolmi. Vedľajší produkt (imidazol) nie je kyslý. Možno acylovať aj látky citlivé voči kyselinám. Acylácia s HFBI môže prebiehať bez prítomnosti rozpúšťadla, činidla a analyt, ale treba zahriať na teplotu 80 °C po dobu 2-3 hod. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |
| pentafluorpropionylimidazol (PFPI) | - | |
| heptafluorbutyrylimidazol (HFBI) | 158-163 | |
| anhydrid kyseliny octové (AA) | - | Činidlo môže byť použité s bazickým katalyzátorom, napr. pyridinom, ktorý je akceptorom kyslých vedľajších produktov. |
| N-metyl-bis (trifluoroacetamid) (MBTFA) | 121-122 | Reaguje veľmi ochotne s primárnymi a sekundárnymi aminmi, menej ochotne s hydroxylovými zlúčeninami a thiolmi. Acylácia aminu sa uskutočňuje za laboratórnej teploty. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |
| pentafluorbenzolychlorid (PFBCl) | 158-159 | Reaguje s alkoholom a sekundárnymi aminmi. Reakcie je treba katalyzovať pyridinom alebo rovnakou bázou. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |

| Acylačné činidlo (skratka) | T. v. [°C/mm Hg] | Vlastnosti |
|-------------------------------|---------------------|---|
| pentafluorpropanol (PFPOH) | 80/748 | PFPOH je spoločne s PFPA využívaný pre derivatizáciu bežných funkčných skupín. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |
| metylchloroformiát | 70-72 | PFPOH je spoločne s PFPA využívaný pre derivatizáciu bežných funkčných skupín. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |
| etylchloroformiát | 93 | Chloroformiáty sú využívané k derivatizácii aminu, alkoholu a fenolu. Derivatizácia karboxylových kyselín prebieha za katalytického pôsobenia pyridínu. Ideálny pre ECD a NCI-MS. |

2.4 Plynová chromatografia

Chromatografia je založená na princípe, pri ktorom sa molekuly v zmesi nanášajú na povrch alebo do pevnej látky a kvapalná stacionárna fáza (stabilná fáza) sa od seba oddeľuje pri pohybe pomocou mobilnej fázy. Plynová chromatografia (GC) je separačná metóda pre delenie a určovanie plynu, kvapalín a pevných látok s bodom varu pod 400°C. Plynová chromatografia je dôležitá a jediná biofyzikálna technika, ktorá umožňuje oddelenie, identifikáciu a čistenie zložiek zmesi pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu. GC patrí k najstarším a najčastejšie používaným separačným metódam. Význam GC pre rozvoj metodológie analýzy bol ocenený udelením Nobelovej ceny pánom Martinovi a Syngeovi v roku 1952 [44, 45].

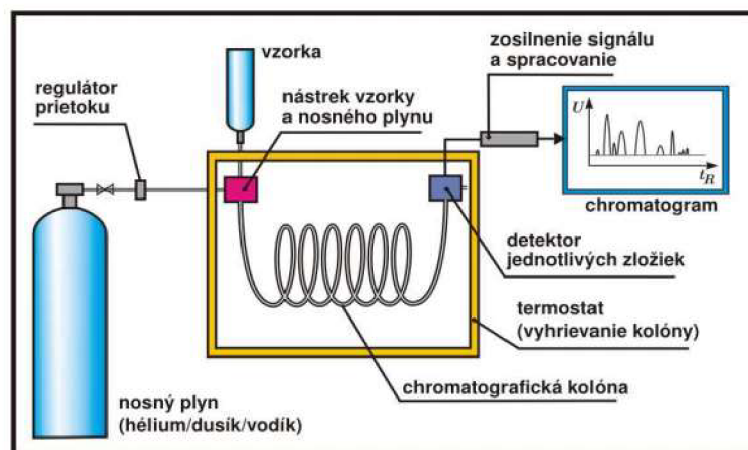
Základný princíp plynovej chromatografie spočíva v tom, že prvým krokom pri použití metódy GC je odparení vzorky v temperovanom dávkovacom zariadení (injektora), potom nasleduje oddelení jednotlivých zložiek zmesi v chromatografickej kolóne, detekcia každej zložky a jej vyhodnotenie. Iba tie zlúčeniny, ktoré sa môžu odparovať bez rozkladu, sú vhodné na analýzu GC. Tieto zlúčeniny zahŕňajú väčšinu rozpúšťadiel a pesticídov, množstvo zložiek v príchuťiach, éterické oleje, uhl'ovodíkové palivá a veľa liekov. Medzi triedy zlúčenín, ktoré často vyžadujú derivatizáciu na zvýšenie prchavosti patria kyseliny, aminokyseliny, amíny, amidy, neprchavé liečivá, sacharidy a steroidy [46].

Táto metóda je založená na delenie zložky medzi pohyblivou (mobilnou) alebo stacionárnou (nepohyblivou) fázou. Mobilnou fázou je nosný plyn a v chromatografickom kolóne je usporiadaná stacionárna fáza. Hlavnou výhodou tejto techniky je jednoduché a rýchle prevedenie analýzy, účinná separácia jednotlivých látok zo zložitých zmesi a malé množstvo vzorky potrebné k analýze [4748].

2.4.1 Schéma a popis funkcie plynového chromatografu

Na obrázku ja znázornená schéma plynového chromatografu, ktorý sa skladá z týchto hlavných častí:

- Dávkovacie zariadenie – injektor
- Termostat s kolónou
- Detektor
- Systém pre spracovanie dát



Obrázok 6 Schéma plynového chromatografu [49]

Časti plynového chromatografu:

- Stacionárne fázy

Plynová chromatografia sa obvykle delí na chromatografiu v systéme plyn – pevná látka (GSC) a na chromatografiu plyn – kvapalina (GLC). V prípade GSC je distribúcia analytu medzi stacionárnou a mobilnou fázou založená na absorpcii. GLC je príkladom rozdeľovacej chromatografie, kde dochádza k rozdeľovaniu látok v oboch fázach. V GLC sa najčasto používajú stacionárne fázy napr. polyetylenglykoly, polyestery alebo polysiloxany [45].

- Mobilná fáza

V plynovej chromatografii je mobilná fáza predstavovaná nosným plynom. Najčastejšie sa používajú ako nosné plyny: vodík, hélium, dusík. Pri voľbe nosného plynu sa berú do úvahy nasledujúce faktory: hustota, viskozita, účinnosť, čistota, typ používaných detektoru a cena plynu. Prietok mobilnej fázy musí byť optimalizovaný tak, aby sa dosiahlo čo najlepšieho rozdelenia látok na kolóne, tj. najmenšieho rozšírenia zón separovaných látok [46, 50].

Tabuľka 4 Vlastnosti nosných plynov pri 0°C a 101,3 kPa [51]

| Plyn | Hustota (g·dm ⁻³) | Viskozita (μPa·s) |
|----------------|-------------------------------|-------------------|
| H ₂ | 0,09 | 8,44 |
| He | 0,178 | 18,6 |
| N ₂ | 1,25 | 16,58 |
| Ar | 1,78 | 21,2 |

Regulátory prietoku nosného plynu sú elektronické regulačné zariadenia, ktoré sa slúžia k ovládaniu prietoku a tlaku nosného plynu. Regulátor prietoku musí zabezpečiť konštantný prietok nosného plynu a vzoriek kolón a detektorov bez ohľadu na typ nosného plynu, teplotu a rozmery kolóny. Pomocou ihlových ventilov dochádza k regulácii noseného plynu [52].

Prietok nosného plynu je možné merať na vstupe do kolóny pred dávkovacím zariadením alebo na výstupe z kolóny za detektorom. Pre priechod plynu kolónou je využívaný pneumatický odpor kolóny, ktorý sa pozná výskytom tlakového spádu. Retenčné dáta sú závislé na tlakovom spádu a preto pre presné meranie namerané hodnoty na tlakový spád treba korigovať. Najviac sa používajú k meraniu prietoku nosného plynu prietokomery, ktoré sú na meranie presné a rýchle [53].

- Dávkovacie zariadenie

K dávkovaciemu zariadeniu patrí dávkovač vzorky, septum, dávkovacia komôrka. Injektor je vstupom analyzovanej látky do plynového chromatografu. Nástrek látky sa najčastejšie robí pomocou špeciálnej injekčnej striekačky cez septum, ktoré oddeľuje vnútornú časť injektora od vonkajšieho prostredia. Súčasťou injektora je delič toku. Základné typy dávkovacieho zariadenia sú dávkovanie s deličom toku alebo bez neho, s programovateľným odparovaním alebo dávkovač vzorku do kolóny (on-column) [46, 54].

- Chromatografická kolóna

Je uložená v termostate. Kolóny môžu byť náplňové (kovové, sklenené) a kapilárne (kremenné, sklenené). Náplňové kolóny vyrobené zo skla alebo kovu sú obvykle 1 m až 5 m dlhé s vnútorným priemerom 2 mm až 4 mm. Stacionárnou fázou sú najčastejšie porézne polyméry alebo tuhé nosiče impregnované kvapalnou fázou. V kapilárnej kolóne je tenký film (0,1 - 6 μm) a kvapalnú stacionárnu fázu sú nanosené na vnútornom povrchu kapiláry. Používajú sa na rýchle analýzy bez straty účinnosti v širokom rozmedzí prietokov [46, 55].

- Detekčný systém

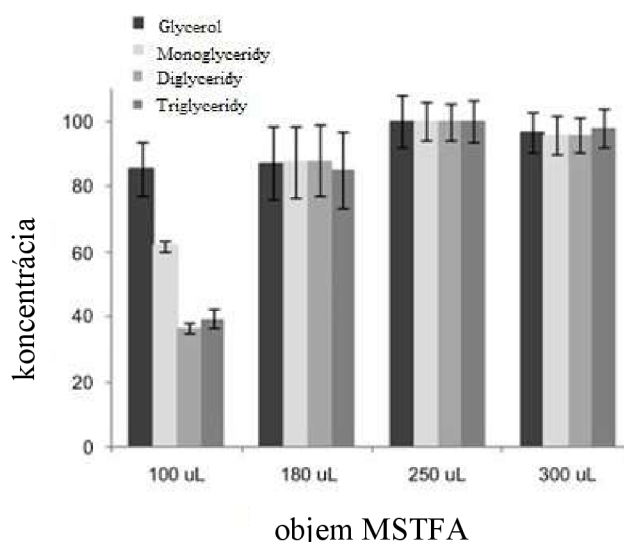
Chromatografický detektor by mal byť citlivý, stabilný, mal by zabezpečiť maximálnu rýchlosť odozvy na zmenu v zložení plynu opúšťajúceho chromatografickú kolónu. Cieľom je poskytnúť informáciu, ktorá by viedla k- identifikácií a kvantifikácií zlúčeniny. Používa sa mnoho typov detektorov, ich voľba závisí od vlastností meraných zložiek. Základné detektory sú tepelne vodivostný, plameňovo ionizačný, plameňovo ionizačný s alkalickým kovom, detektor elektrónového záchytu. Plameňovo ionizačný detektor (FID) sa radia do základnej výbavy plynového chromatografu. Jedná sa o deštruktívne detektor. Princíp detekcie spočíva v meraní zmeny ionizačného prúdu vodíkového plamienka v dôsledku prítomnosti eluovanej zložky vzorky. Vzniknuté ionizované častice zaplňujú priestor medzi elektródami a znižujú jeho odpor, takže môže prechádzať prúd. FID dáva dostatočne veľkú odozvu na takmer všetky organické látky. Bežne užívané nosné plyny dávajú nízku, takmer zaregistrovaná odozvu. FID má najväčší lineárny rozsah z bežne používaných detektorov [46, 55, 56].

Grafický záznam tzv. chromatogram je výsledkom chromatografického procesu, ktorý predstavuje závislosť signálu detektoru na čase resp. na množstva plynu prešlého kolónou [57].

2.5 Súčasné stanovenie voľných mastných kyselín, mono-, di- a triglyceridov pomocou derivatizácie

Pri analýze bionafty a ich možných kontaminantov (voľných mastných kyselín, glycerolov a glyceridov) sa používa derivatizačných techník [58, 59]. V rámci týchto štúdií boli overované a modifikované doporučené metódy pre analýzu bionafty ASTM D 6584, EN 14103 a EN 14105. Pri derivatizácii sú využité rôzne derivatizačné činidlá, najčastejším a s najlepším výsledkom je MSTFA. Ako analytická koncovka bola využitá plynová chromatografia s plameňovo-ionizačným detektorom alebo hmotnostným detektorom. Pre analýzu glyceridov sa používa kapilárna kolóna s vysokoteplotnou stabilitou (napríklad HT-5 kolóna).

Dias A.N. a kol. [58] sa vo svojej práci venovali optimalizácii množstva derivatizačného činidla (MSTFA). Ako optimálny objem s najlepšou výťažnosťou derivatizácie sa javil objem 250 μL (prípade 350 μL) MSTFA. Pre potvrdenie a identifikáciu analytov bola použitá GC/MS [58].



Obrázok 7 Porovnanie rôznych objemov MSTFA v silylačnej reakcii [58]

V podobnom štúdií od Prado C a kol. [59] boli analyzované vzorky bionafty z celej rady rôznych zdrojov biomasy (arašidy, slnečnice, sója, káva, kukurica a ďalší). A to predovšetkým z dôvodu, že technika dávkovania vzorku cool on column používaná v norme EN 14105 a ASTM D6584 vyžaduje dlhú dobu chladenia injektora a teplota termostatu 370°C nie je vhodná pre bionafty pochádzajúce z olejnatých semien, ako sú arašidy a katrán, ktoré obsahujú triacylglyceroly s dlhým reťazcom. Ako vnútorný štandard pri všetkých analýzach bol použité 1,2,4-butantriol [59].

Výsledky s použitím derivatizácie MSTFA boli úspešné a zrovnateľné so štandardizovanými metódami. Účelom tejto štúdie bolo vyskúšané metódy, ktorá by umožnila stanovenie celkových esterov, mono-, di- a triacylglyceridov, ako aj voľný a celkový obsah glycerolu.

3. Experimentálna časť

V tejto štúdií sme chceli overiť možnosti derivatizácie pre stanovenie mastných kyselín vo vzorkách oleja a využitie derivatizácie pre stanovenie organických látok vo vzorku extraktu semienok z vínnej révy. Na získanie semikvantitatívnej analýzy jednotlivých vzorcov bola použitá metóda transesterifikácia. Podľa zdroja, ktorý je uvedený v kapitole teoretickej časti, bolo využité na silyláciu reakčné činidlo na báze trifluóracetaminu – MSTFA a BSTFA.

Pre analýzu extraktu zo semienok vínnej révy bolo použité derivatizačných činidiel MSTFA, BSTFA a BSA za účelom identifikácie prítomných látok.

3.1 Prístrojové vybavenie a pomôcky

- plynový chromatograf HP 5890 series II, Hewlett Packard, USA
- hmotnostný spektrometr Pegasus IVD, Leco
- autosampler HP 7673A, Hewlett Packard, USA
- analytické váhy Kern, 770-14, Nemecko
- ultrazvuková lázeň, Teson 4, Tesla
- magnetická miešačka MM2A,
- suchý termostat Evaterm, Labicom, ČR
- automatické mikropipety
- laboratórne sklo, plastové špičky, skúmavky a eppendorfy, viečka, septa, krimpovacie vialky (1,8 ml), krimpovacie kliešte.

3.2 Chemikálie

1.1.1 Derivatizační činidla

- N-metyl-N-(trimetylsilyl)trifluoracetamid, MSTFA, Sigma-Aldrich, USA
- N,O-Bis-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid, BSTFA, Sigma-Aldrich, USA
- N,O-Bis-(trimetylsilyl)acetamid s trimetylchlorsilanom, BSA+TMCS, Sigma-Aldrich, USA

3.2.1 Štandardy

- ASTM D6584 Standard Solution 2, Sigma-Aldrich, USA
- Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich, USA

3.2.2 Rozpúšťadla

- pyridín, Sigma-Aldrich, USA
- etanol, denaturovaný, Sigma-Aldrich, USA
- metanol, Sigma-Aldrich, USA,
- 2,2,4-trimetylpentán (izooktan), Sigma-Aldrich, USA

- tetrahydrofurán, Sigma-Aldrich, USA

Všetky použité chemikálie boli použité v čistote p.a. alebo vyššej.

3.2.3 Analyzované vzorky

- Panenský makový olej

Zloženie: 100% olej z maku modrého

Priemerné výživové hodnoty na 100g:

| | |
|---------------------------------------|------|
| Tuky | 100 |
| z toho | |
| Nasýtené mastné kyseliny | 11,6 |
| Mononenasýtené mastné kyseliny | 71,2 |
| z toho | |
| Kyselina olejová /C18:1n9/ | 70,8 |
| Polynenasýtené masné kyseliny | 17,6 |
| z toho | |
| Kyselina linolová /C18:2n6 Omega 6MK/ | 13,4 |

Výrobca: Farma Jaroslav Ovčarovič, Galanta, SK

- Panenský ľanový olej

Zloženie: 100% olej z ľanu

Priemerné výživové hodnoty na 100g:

| | |
|--|-------|
| Tuky | 100 |
| z toho | |
| Nasýtené mastné kyseliny | 9,26 |
| Mononenasýtené mastné kyseliny | 16,33 |
| Polynenasýtené masné kyseliny | 74,42 |
| z toho | |
| Kyselina linolová /C18:2n6 Omega 6 MK/ | 70,20 |
| Kyselina alfa-linolenová /Omega 3 MK/ | 4,22 |

Výrobca: Farma Jaroslav Ovčarovič, Galanta, SK

- Panenský orechový olej

Zloženie: 100% olej z orechu

Priemerné výživové hodnoty na 100g:

| | |
|--|-------|
| Tuky | 100 |
| z toho | |
| Nasýtené mastné kyseliny | 8,50 |
| Mononenasýtené mastné kyseliny | 75,98 |
| z toho | |
| Kyselina olejová /C18:1n9/ | 73,42 |
| Polynenasýtené masné kyseliny | 15,52 |
| z toho | |
| Kyselina linolová /C18:2n6 Omega 6 MK/ | 13,25 |
| Kyselina alfa-linolénová /Omega 3 MK/ | 2,27 |

- Výrobca: Mgr. Stéphane Di Giacomo - KARPATIA, Žalobín, SK

3.2.4 Ostatné vzorky

- hydroxid draselný
- kyselina sírová (bezvodová)
- destilovaná voda

3.2.5 Separačné a detekčné podmienky jednotlivých analýz

Plynovochromatografické podmienky č. 1:

Plynový chromatograf HP 5890 series II (Hewlett Packard, USA) s autodávkačom HP 7673A, (Hewlett Packard, USA)

Kapilárna kolóna 1: Rxi-5HT 30 m x 0,320 mm (i.d.) x 0,100

Kapilárna kolóna 2: Rxi-5Sil MS 30 m x 0,250 mm (i.d.) x 0,250 µm

Teplota injektoru 250 °C

Injektor v split móde 2 min

Dávkovaný objem 1 µl

Teplotný program: od 70 °C do 260 °C (5 min) rýchlosťou 10 °C min⁻¹

Prietok nosného plynu (hélium) 1 ml min⁻¹

Teplota FID detektora 280 °C

Plynovochromatografické podmienky č. 2:

Plynový chromatograf HP 5890 series II (Hewlett Packard, USA) s autodávkačom HP 7673A, (Hewlett Packard, USA)

Kapilárna kolóna 1: Rxi-5HT 30 m x 0,320 mm (i.d.) x 0,100 μm

Kapilárna kolóna 2: Rxi-5Sil MS 30 m x 0,250 mm (i.d.) x 0,250 μm

Teplota injektora 290 °C

Injektor v split móde 2 min

Dávkovaný objem 1 μl

Teplotný program: od 60 °C do 360 °C (10 min) rýchlosťou 20 °C min^{-1}

Prietok nosného plynu (hélium) 1 ml min^{-1}

Teplota FID detektora 300 °C

Plynovochromatografické podmienky č. 3:

Plynový chromatograf HP 5890 series II (Agilent Technologies, USA) s hmotnostným spektrometrom Pegasus IVD (Leco) s autodávkačom Agilent Technologies 7673A, (Agilent Technologies, USA)

Kapilárna kolóna: Rxi-5Sil MS 30 m x 0,25 mm (i.d.) x 0,25 μm

Teplota injektora 250 °C

Injektor v splitless móde 1:50 min

Dávkovaný objem 1 μl

Teplotný program: od 70 °C do 300 °C (5 min) rýchlosťou 15 °C min^{-1}

Prietok nosného plynu (hélium) 1 ml min^{-1}

Teplota iónového zdroja 250 °C

Napätie detektoru: 1800 V

Teplota transferlinu: 280 °C

FAME mód m/z 50-600

3.3 Pracovné postupy

3.3.1 Príprava metanolického roztoku hydroxidu draselného (2mol/l)

Za mierneho ohrievania sa rozpustí 13,1g KOH v 100 ml absolútneho metanolu. Pridá sa väčšie množstvo bezvodého síranu sodného k vysušeniu roztoku. Po 30 minútach sa roztok prefiltruje.

3.3.2 Transesterifikácia

Olej bol dokonale rozpustený v 10 ml izooktanu. Do skúmavky so zábrusovým uzáverom sa napipetovalo 300 µl zmesi a 4 ml izooktanu. Automatickou pipetou bolo pridané 200 µl metanolického roztoku KOH a skúmavka bola uzatvorená. Zmes v skúmavke bola silno pretrepávaná po dobu asi 30 sekúnd. Po počiatočnom zákale spôsobenom oddelením glycerolu bola reakčná zmes postupne vyčírená. Do roztoku sa pridal 1 g hydrogénsíranu sodného a zmes bola intenzívne potrepaná po dobu 15 sekúnd, aby sa zneutralizoval hydroxid draselný. Po usadení soli do 2 ml vialky bola odobraná horná izooktanová vrstva. Tá obsahovala asi 15 mg / ml metylesterov mastných kyselín. Analýza olejov sa uskutočnila na plynovom chromatografe č. 1 (strana 23). Podmienky boli optimalizované pre vybrané analyty uvedené na strane 22.

K identifikácii prítomných mastných kyselín bol použitý štandard Supelco 37 Component FAME Mix, ktorý je zmesový štandard metylesterov mastných kyselín.

3.3.3 Derivatizácia olejov

Analýza vzorky

Roztok vzorky bol pripravený rozpustením približne 2,1 g oleji v 5 ml pyridine. Do malej vialky boli napipetovaný 200 µl rozpustený roztok a 100 µl silylačné činidlo MSTFA. Derivatizačná zmes bola derivatizovaná pri teplote 70 °C po dobu 30 minút. Tento spôsob derivatizácie bol aplikovaný na všetky typy olejov. Meranie prebiehalo použitím GC-FID a GC-MS. GC-FID analýzy, prebiehali na plynovom chromatografe č. 2 podľa podmienok vedených na strane 24.

4. Výsledky a diskusia

4.1 Analýza mastných kyselín pomocou transesterifikácie

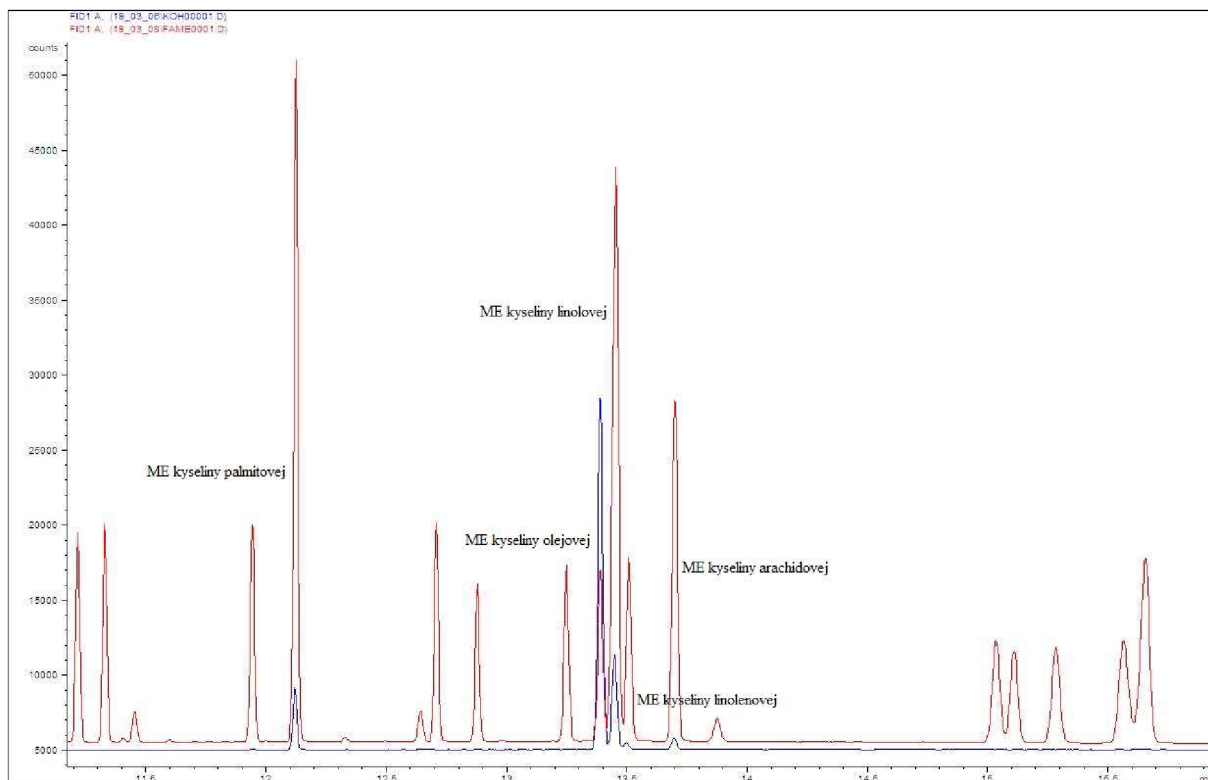
GC-FID bol použitý na účinnú separáciu s krátkym časom analýzy. Použitie vysokej teploty v peci (300 °C) umožnilo získať vhodné tvarované píky a zaistiť elúciu všetkých zložiek vzorky s dobre definovanými píky a základnou stabilitou. Tak bolo možné získať analytické krivky na semikvantifikáciu mastných kyselín.

Analýza celkový obsah mastných kyselín v olejoch bol získaný pomocou metódy transesterifikácie. Aby bol zistený presný obsah vzorky, bolo treba porovnávať zmesovým štandardom, ktorý obsahoval 37 metylesterov mastných kyselín. Tabuľka (Tabuľka 5) ukazuje komponenty zmesového štandardu a na obrázku (Obrázok 8) vidíme jeho chromatogram.

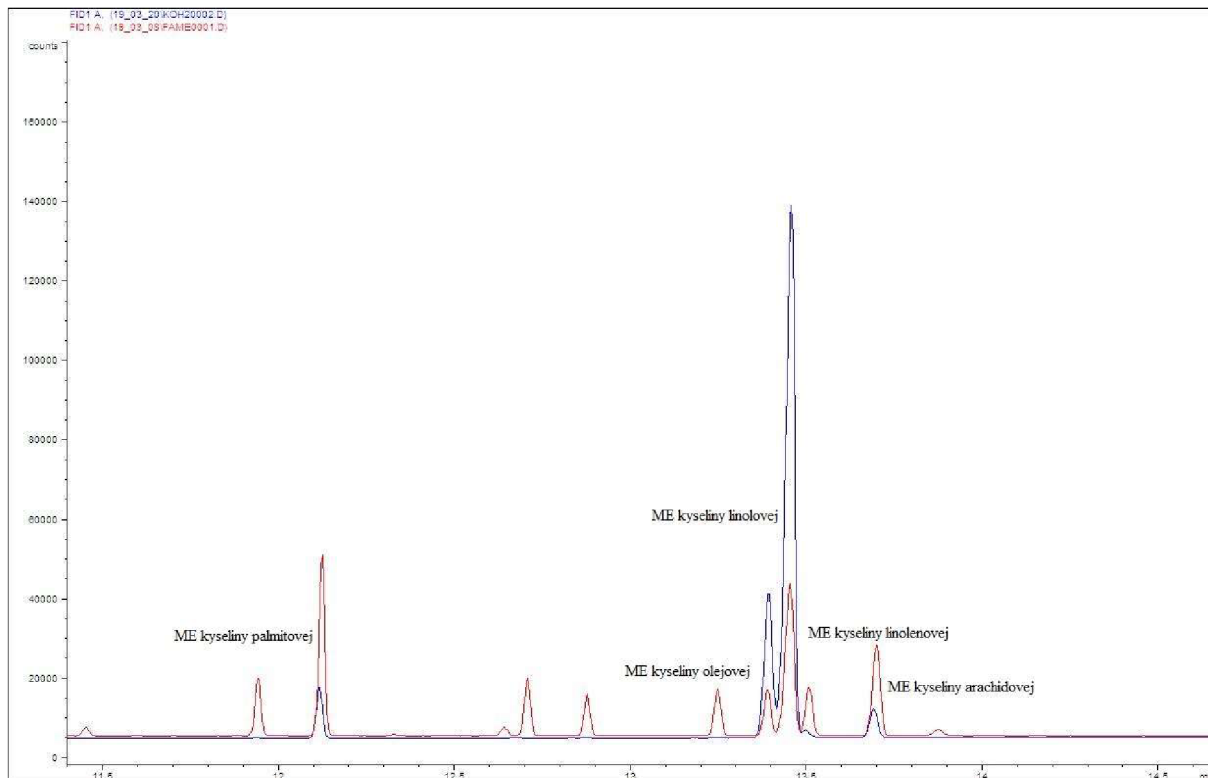
Tabuľka 5 Štandard metylesterov mastných kyselín - Supelco 37 Component FAME Mix

| | |
|---|--|
| Metyl-butyrát | Metyl linoleát |
| Metyl hexanoát | Metyl arachidát |
| Metyl octanoát | Metyl γ -linolenát |
| Metyl dekanoát | Metyl cis-11-eicosenoát |
| Metyl laurát | Metyl heneicosanoát |
| Metyl tridekanoát | Metylester cis-11,14-eicosadienovej kyseliny |
| Metyl myristát | Metyl behenát |
| Metyl myristoleát | Metylester cis- 8,11,14- eicosatrienovej kyseliny |
| Metyl pentadekanoát | Metyl erucát |
| Metyl cis-10-pentadekanoát | Metylester cis- 11,14,17- eicosatrienovej kyseliny |
| Metyl palmitát | Metylester cis- 5,8,11,14- eicosatetraenovej kyseliny |
| Metyl palmitoleát | Metyl tricosanoát |
| Metyl heptadekanoát | Metylester cis-13,16-docosadienovej kyseliny |
| Metylester cis-10-heptadekanovej kyseliny | Metyl lignocerát |
| Metyl stearát | Metylester cis- 5,8,11,14,17- eicosapentaenovej kyseliny |
| Metylester trans-9-olejovej kyseliny | Metyl nervonát |
| Metylester cis-9-olejovej kyseliny | Metylester cis- 4,7,10,13,16,19- docosahexaenovej kyseliny |
| Metyl linolealidát | |

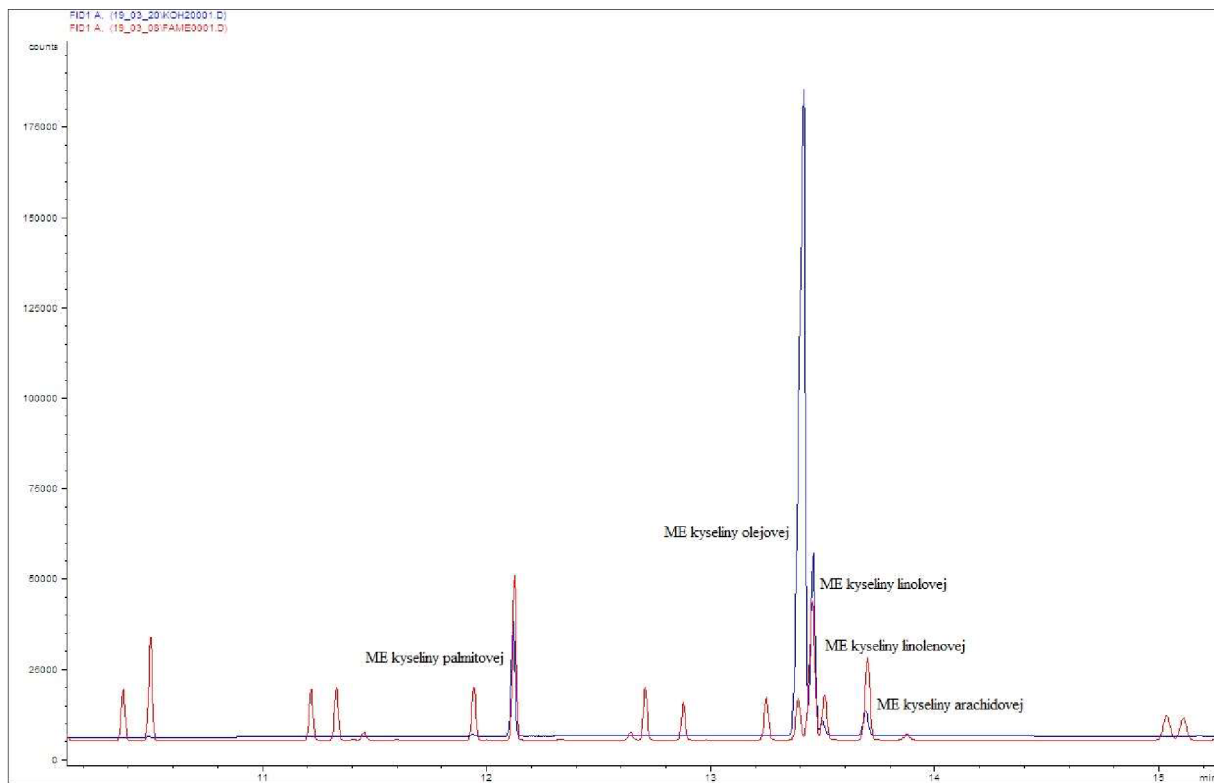
Vo vzorkách bolo identifikované 5 rôznych mastných kyselín. Výsledky boli porovnávané so štandardom a zistené, že makový olej (Obrázok 8) obsahuje metylester kyseliny palmitovej, metylester kyseliny linolovej, metylester kyseliny olejovej, metylester kyseliny linolenovej a metylester kyseliny arachidovej. Lanový olej (Obrázok 9) a orechový olej (Obrázok 10) tiež zahrňuje tieto isté metylestery kyseliny palmitovej, olejovej, linolovej, linolenovej a arachidovej, ale v iných pomeroch.



Obrázok 8 Stanovenie metylesterov mastných kyselín u makového oleja pomocou GC/FID. (červený je štandard FAME Mix, modrý chromatogram je vzorka makového oleja)



Obrázok 9 Stanovenie metylesterov mastných kyselín u ľanového oleja pomocou GC/FID (červená je štandard FAME Mix, modrá chromatogram je vzorka ľanového oleja)

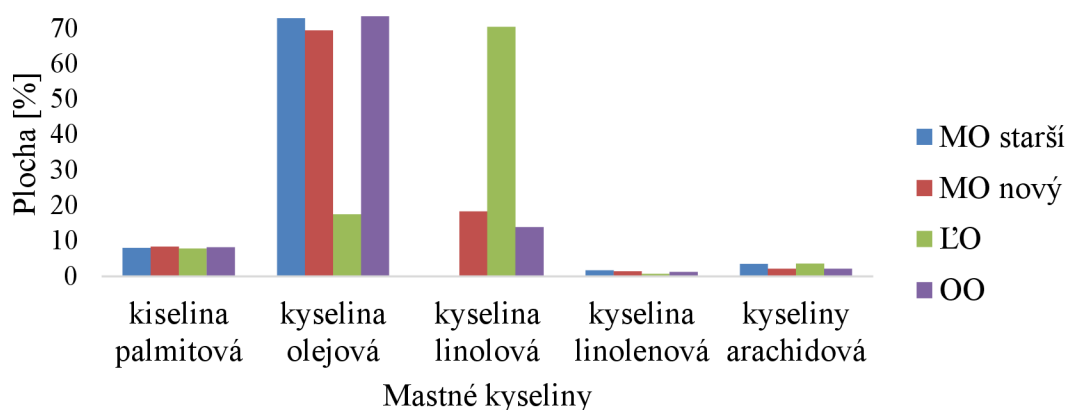


Obrázok 10 Stanovenie metylesterov mastných kyselín u orechového oleja pomocou GC/FID (červená je štandard FAME Mix, modrá chromatogram je vzorka orechového oleja)

Po integrácií pomocou Chemstation v GC-FID, bola zistená semikvantifikácia jednotlivých olejov. Program spočíta celkovú plochu, a potom tú plochu rozpočíta koľko percent pripadá na jednotlivý pík. V tabuľke (*Tabuľka 6*) je znázornené relatívne zastúpenie metylesterov mastných kyselín v jednotlivých olejoch. Pri porovnávaní chemického zloženia makového oleja s normami, ktoré nachádzajú na strane č. 7 bolo zistené, že panenský makový olej obsahuje kyselinu palmitovú 8,0%, kyselinu linolovú 13,8% a kyselinu linolenovú 1,7%. Najvyššie zastúpenie mala kyselina olejová 72,9%, hodnoty staršieho makového oleja sú odlišné od nového makového oleja a to kvôli tomu, že mastné kyseliny časom na vzduchu oxidujú. Ľanový olej obsahuje kyselinu palmitovú 7,9 %, kyselinu olejovú 17,5%, kyselinu linolenovú 0,7% a kyselinu arachidovú 13,7%. Najväčší pík bol u kyseliny linolovej 70,4%. Orechový olej ukázal podobné výsledky ako makový olej, obsah kyseliny palmitovej je 8,20, kyseliny olejovej 73,4%, kyseliny linolovej 13,9%, kyseliny linolenovej 1,2% a kyseliny arachidovej 2,2%. Výsledky sú splnené podľa očakávaní, ako vidíme na obrázkoch (Obrázok 8, Obrázok 9, Obrázok 10). Každá vzorka bol premeraná minimálne trikrát a výsledné hodnoty boli spriemerované.

Tabuľka 6 Relatívne zastúpenie metylesterov mastných kyselín v jednotlivých olejoch po GC- FID analýze

| | Makový olej starší | | Makový olej nový | | Ľanový olej | | Orechový olej | |
|----------------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|
| | R _t [min] | Plocha [%] | R _t [min] | Plocha [%] | R _t [min] | Plocha [%] | R _t [min] | Plocha [%] |
| ME | | | | | | | | |
| kyseliny palmitovej | 12,114 | 8,013 | 12,114 | 8,334 | 12,114 | 7,864 | 11,935 | 8,168 |
| ME | | | | | | | | |
| kyseliny olejovej | 13,398 | 72,870 | 13,400 | 69,464 | 13,388 | 17,473 | 12,114 | 73,427 |
| ME | | | | | | | | |
| kyseliny linolovej | 13,447 | 13,758 | 13,450 | 18,271 | 13,452 | 70,402 | 13,399 | 13,923 |
| ME | | | | | | | | |
| kyseliny linolenovej | 13,492 | 1,718 | 13,493 | 1,383 | 13,495 | 0,693 | 13,447 | 1,246 |
| ME | | | | | | | | |
| kyseliny arachidovej | 13,688 | 3,473 | 13,688 | 2,179 | 13,689 | 3,568 | 13,689 | 2,172 |



Obrázok 11 Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vo vzorkách olejov

Na obrázku (Obrázok 11) sú graficky zaznamenané percentuálne plochy píkov odpovedajúce konkrétnym mastným kyselinám, ktoré sú vo vzorke samotného oleja.

Pre potvrdenie výskytu mastných kyselín prebiehala doplnková analýza pomocou použitia GC/MS. Výsledky merania boli vyhodnotené na základe podobnosti v prostredí Chromatof, pričom namerané spektrá boli porovnávané s knižnicou spektier NIST 01 Mass Spectral Library (NIST08/EPA/NIH). Čím vyššia je pravdepodobnosť, tým sú viac podobné tie spektrá, tým je väčšia pravdepodobnosť, že je to skutočne tá látka. V tabuľke (Tabuľka 7) a tabuľke (Tabuľka 8) sú látky, ktoré majú pravdepodobnosť väčšiu ako 800, lebo pod 800 je malá pravdepodobnosť porovnávania látky.

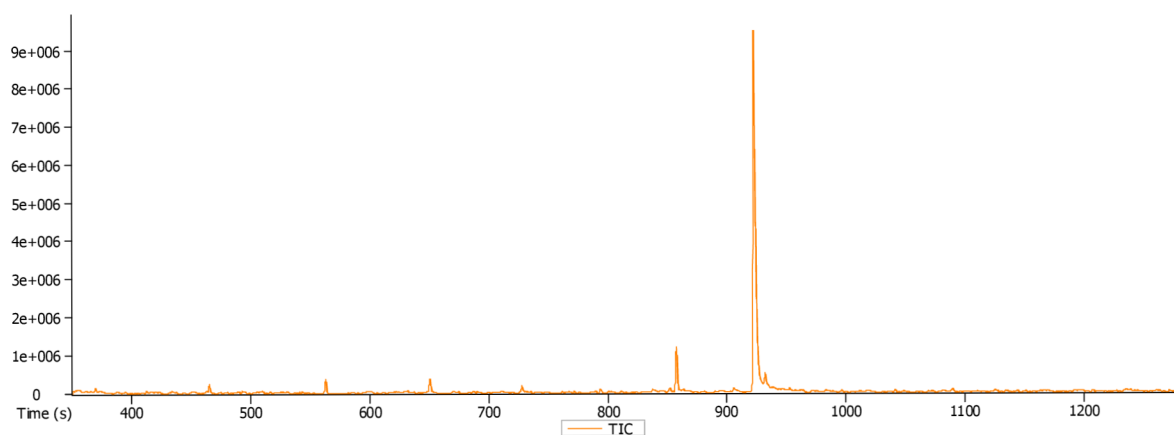
Tabuľka 7 Vzorka makového oleja analyzovaná pomocou GC/MS

| Názov | Podobnosť | R _t [s] | Plocha | Výška |
|--|-----------|--------------------|----------|--------|
| Metylester <i>cis</i> -oktadec-9-enevej kyseliny | 750 | 850,8 | 25231 | 1598,1 |
| Metylester palmitovej kyseliny | 939 | 857,8 | 5628954 | 335711 |
| Heptylester 4-bromofenyl ftalovej kyseliny | 731 | 874,9 | 27882 | 790,67 |
| Metylester 15-metylhexadekanovej kyseliny | 785 | 895,9 | 28326 | 1557,6 |
| Metylester linolovej kyseliny | 923 | 922,9 | 16195254 | 802242 |
| Metylester olejovej kyseliny | 864 | 924,6 | 2060168 | 86401 |
| Metylester stearovej kyseliny | 937 | 932,3 | 2184915 | 94350 |
| Metylester laurovej kyseliny | 767 | 993,4 | 45412 | 1552,5 |
| Metylester tridekanovej kyseliny | 858 | 1000,8 | 127873 | 6823,4 |
| Metylester 15-metylhexadekanovej kyseliny | 787 | 1072,3 | 51292 | 2371,9 |

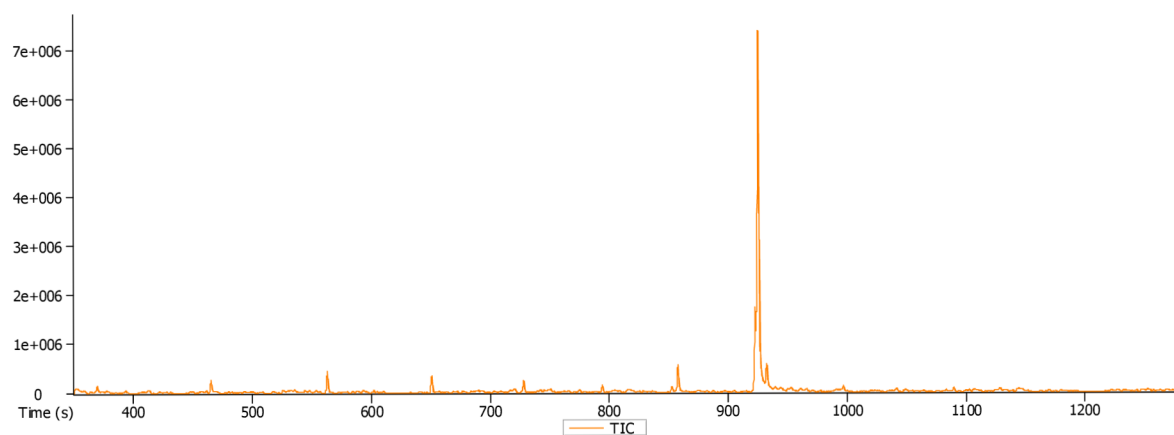
Tabuľka 8 Vzorka ľanového oleja analyzovaná pomocou GC/MS

| Názov | Podobnosť | R _t [s] | Plocha | Výška |
|--|-----------|--------------------|---------|--------|
| Ester 1,2-benzendikarboxylovej, bis(2- metylpropyl) kyseliny | 942 | 837,2 | 92125 | 5074,7 |
| Metylester palmitovej kyseliny | 941 | 857,8 | 2553548 | 153006 |
| Metylester tridekanovej kyseliny | 823 | 895,9 | 30973 | 1506,7 |
| Metylester olejovej kyseliny | 922 | 924,7 | 1511168 | 72630 |
| Metylester linolenovej kyseliny | 929 | 925,4 | 6297780 | 334598 |
| Metylester stearovej kyseliny | 932 | 932,4 | 2504570 | 118515 |
| Metylester 15-metylhexadekanovej kyseliny | 838 | 1000,9 | 44036 | 2168,6 |

Na obrázkoch (Obrázok 12, Obrázok 13) sú znázornené chromatografy z GC/MS.



Obrázok 12 Chromatogram makového oleja v GC/MS

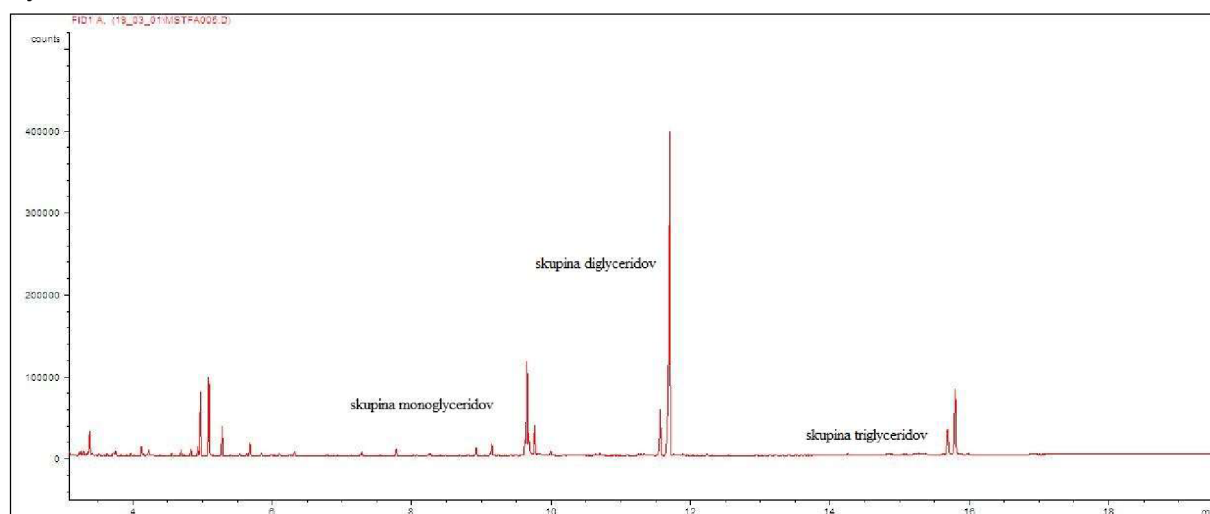


Obrázok 13 Chromatogram ľanového oleja v GC/MS

4.2 Stanovenie mono-, di-, a triglyceridov pomocou derivatizácie

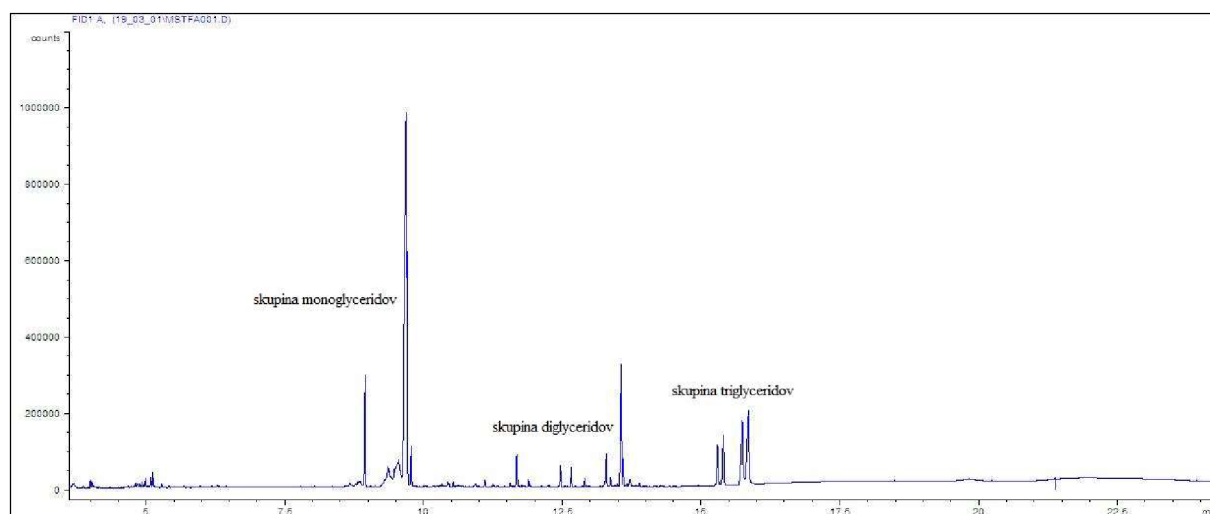
Jednotlivé zastúpenie acylglycerolov je jedným najdôležitejších ukazateľov kvality. Analýza GC-FID uskutočnila na plynovom chromatografe pri GC-FID podmienkach č.2 (strana 234). Mastné kyseliny sú súčasťou mono-, di-, a triglyceridov. Navrhovaný spôsob umožňuje identifikovať a zahrnúť vrcholy mastných esterov s krátkym reťazcom a diferencovať monoacylglyceridy a diacylglyceridy a triacylglyceridy z esterov s dlhým reťazcom, čím sa zabráni nadhodnoteniu alebo podhodnoteniu v kvantitatívnej analýze.

Na obrázku (Obrázok 14) je GC-FID chromatograf separácie štandardnej zmesi mastných kyselín.

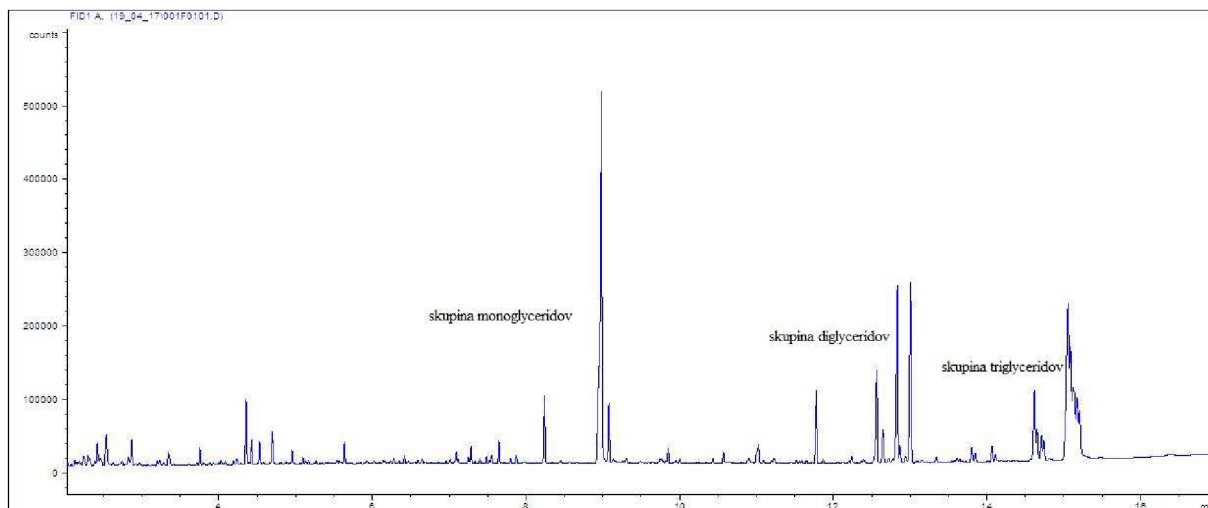


Obrázok 14 Chromatogram štandardu Supelco 37 Component FAME MIX v GC/FID

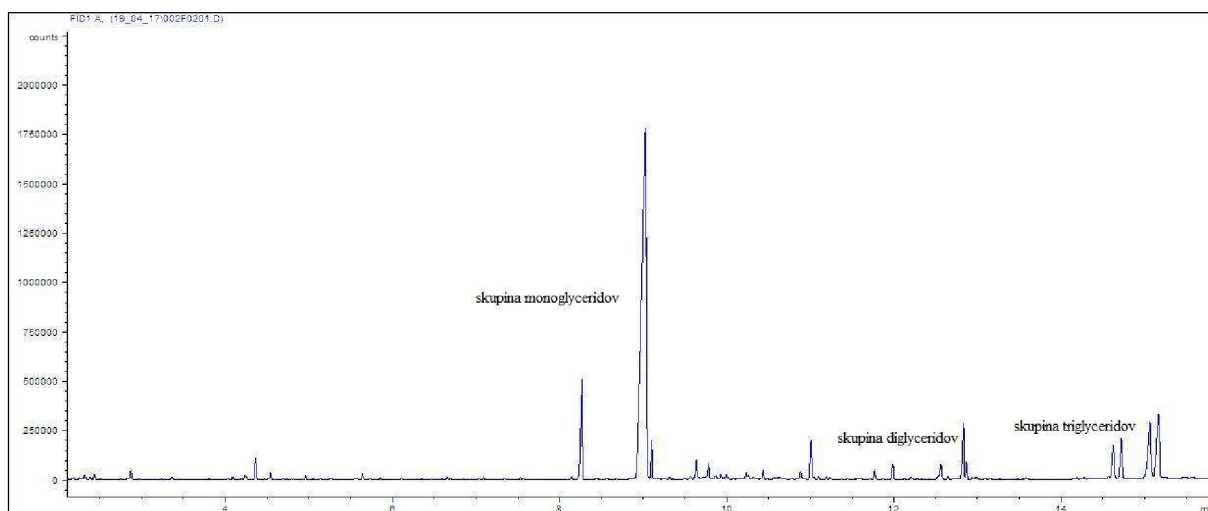
Jednotlivé skupiny, ako mono-, di-, a triglyceridy boli derivatizované vo všetkých olejoch. Separčná činnosť Rxi-5HT kolóny nie je dostatočná, aby bola možnosť na presné identifikovanie skupiny glyceridov. Nie je možné určiť, ktoré mono-, di-, a triglyceridy by boli prítomné, s ktorými mastnými kyselinami. Na nasledujúcich obrázkoch (Obrázok 15, Obrázok 16, Obrázok 17) sú znázornené skupiny jednotlivých glyceridov v olejových vzorkách.



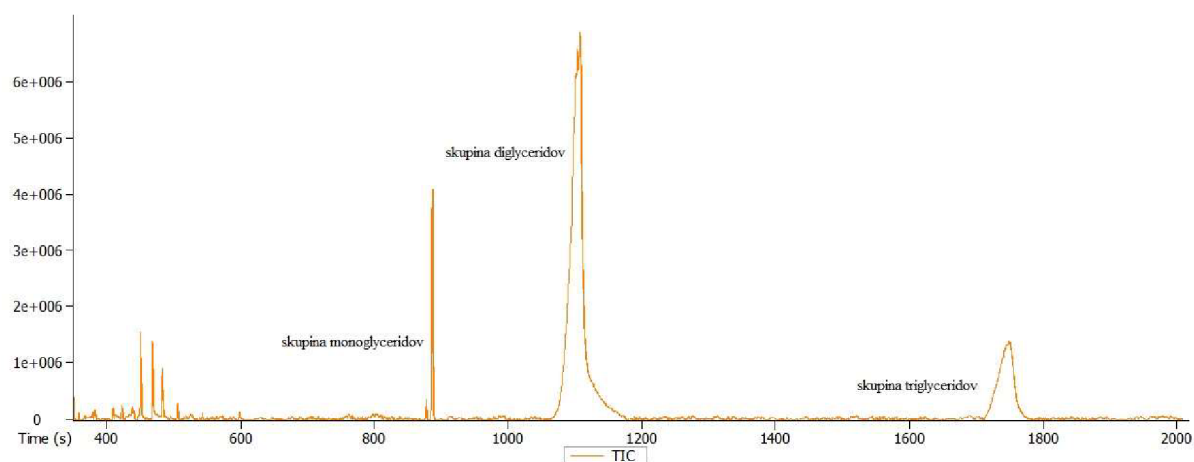
Obrázok 15 Zastúpenie skupiny mono-, di-, a triglyceridov vo vzorke makového oleja



Obrázok 16 Chromatogram zastúpenie skupiny mono-, di-, a triglyceridy vo vzorke ľanového oleja



Obrázok 17 Chromatogram zastúpenie skupiny mono-, di-, a triglyceridy vo vzorke orechového oleja

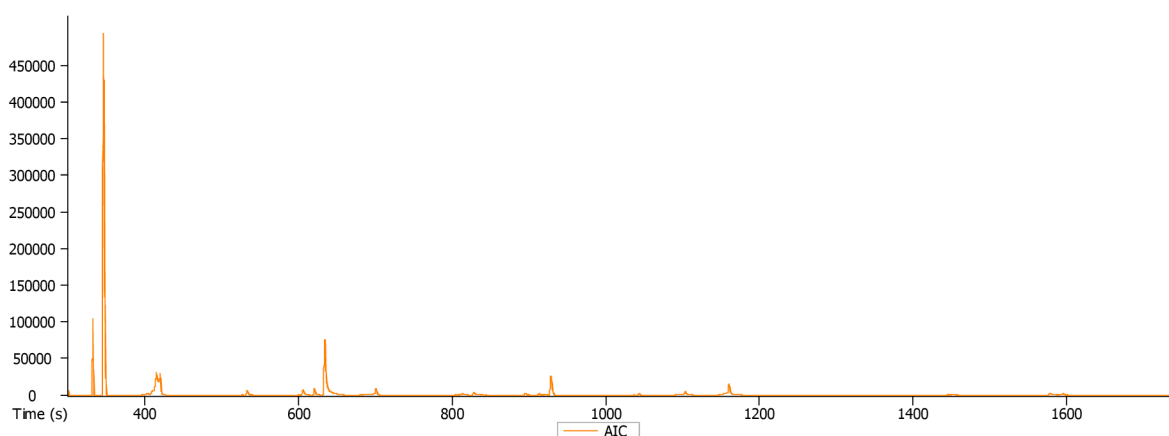


Obrázok 18 Chromatogram zastúpenie skupiny mono-, di-, a triglyceridy z GC/MS

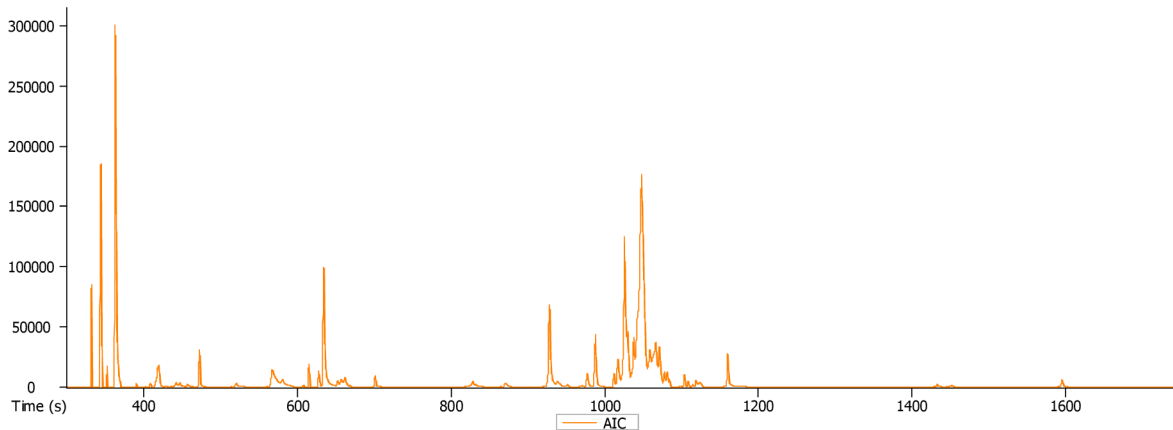
Obrázok 18 je ukážkou analýzy mono-, di- a triglyceridu z GC/MS. Na potvrdenie bola vyskúšaná jedna olejová vzorka na hmotnostný spektrometer a knižnica GC/MS potvrdila existencie skupiny mono-, di-, a triglyceridov. Pri skupine monoglyceridov bolo pozorovateľné, že na voľné –OH skupiny z monoglyceridu sú napojené dva silyli. Pre porovnanie jednotlivých glyceridov s retenčnými časmi, že monoglyceridy ležali veľmi skoro, kým skupina diglyceridov sa ležala už neskoro. V skupine diglyceridov sme objavili zmes rôznych diglyceridov a rôzne dĺžky mastných kyselín. Triglyceridy sú na konci chromatogramu. Nie sme schopní odlíšiť, ako dlhý je reťazec glyceridov.

4.3 Analýza extraktu semienok z vínnej révy

GC/MS analýzy prebiehali na plynovom chromatografe č. 3 podľa GC/MS podmienok uvedených na strane 24. Bola vyskúšaná rozpustnosť vzorky polyfenolu číslo J v rôznych rozpúšťadlách a vzorka bola úplne rozpustná len v metanole, etanole a čiastočne rozpustná v tetrahydrofuráne. Na zmesi, ktorá obsahovala rozpúšťadlo etanol a vzorku polyfenolu číslo J, boli vyskúšané dve rôzne merania. Prvé prebiehalo vo väčšom splite 1:20, a druhé bolo splitless, to znamená, že meranie prebiehalo bez splitu (dávkovanie s deličom toku). Intenzity píkov boli príliš nízke proti našim požiadavkám, práve preto sme vyskúšali bez splitu. Etanol a metanol sú kvapaliny, v ktorých je hydroxylová skupina –OH naviazaná na uhlík. Prednostne prebiehala silylácia rozpúšťadla a nie hľadaných analytov. Chromatogram s metanolom (Obrázok 9) ukazoval menej látky, ako s etanolom (Obrázok 2020). Súhrmom bolo potvrdené, že metanol a etanol nie je možné použiť na derivatizáciu, lebo prednostne derivatizujú –OH skupiny.



Obrázok 19 Chromatogram vzorky polyfenolov číslo J v metanole z GC/MS



Obrázok 20 Chromatogram vzorky polyfenolov číslo J v etanole z GC/MS

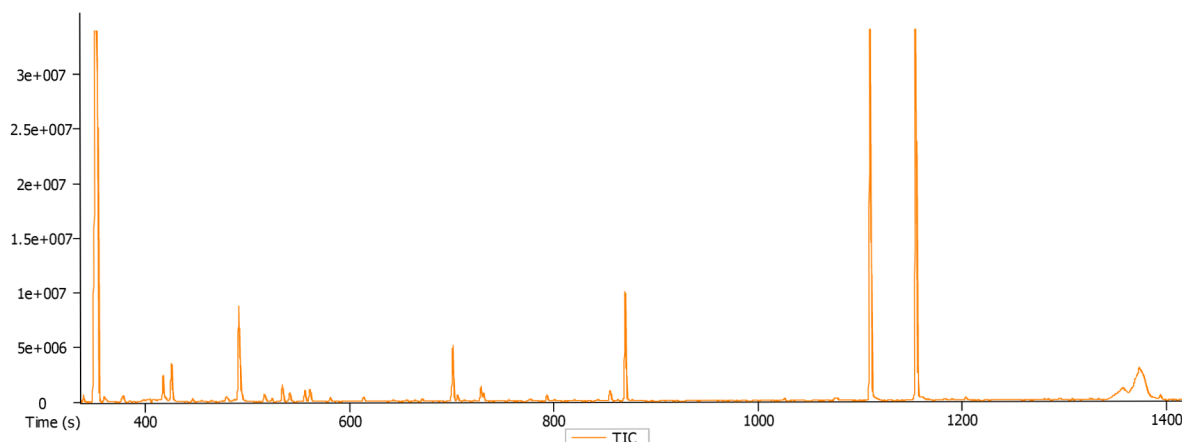
Použitím systému GC/MS bola stanovená vo vínnom extrakte, prítomnosť dvoch derivátov flavonoidných zlúčenín s podobnou hmotnosťou spektra: 942 (90%), 355 (79%), 73 (63%), 369 (36%), 383 (24%), 650 (6%). Tieto dve zlúčeniny boli identifikované ako stereoizoméry, menovite - glukopyranósa a manopyranósa.

Vzorka polyfenolu číslo J bola rozpustená v tetrahydrofuránu veľmi zle, práve preto bolo treba použiť ultrazvuk pre lepšie rozpustenie. Časť, ktorá zostala po ultrazvuku v rozpúšťadle prešla cez striekačkový filter. Rozpustená vzorka polyfenolu číslo J bola derivatizovaná. Boli použité nasledujúce derivatizačné činidlá: MSTFA, BSTFA a BSA+TMCS.

Tabuľka 9 Pomery jednotlivých derivatizačných činidiel a inkubačné časy

| Derivatizačná činidlo | V (μl) | čas (h) |
|-----------------------|--------|---------|
| MSTFA | 200 | 1 |
| BSTFA | 100 | 0,5 |
| BSA+TMCS | 100 | 0,5 |

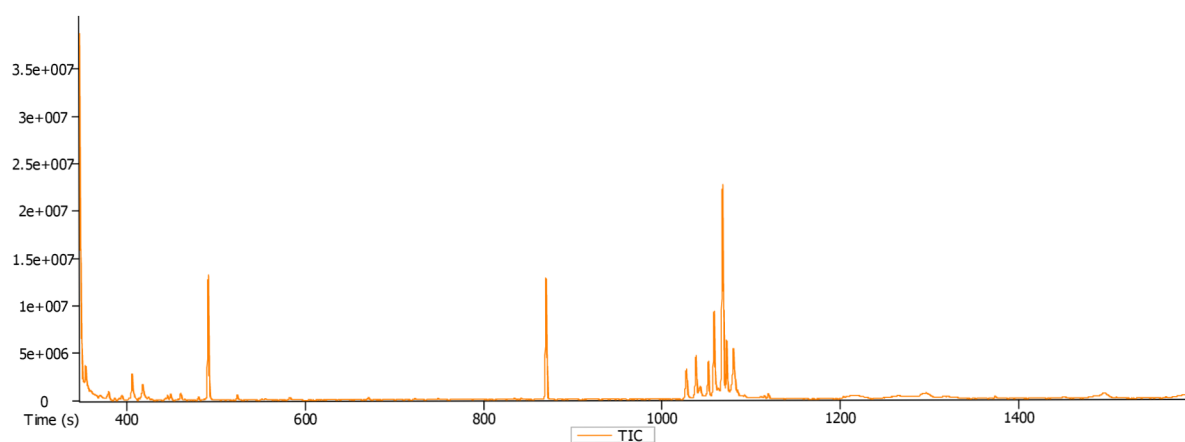
Použitím systému GC/MS bola stanovená vo vínnom extrakte, prítomnosť dvoch derivátov flavonoidných zlúčenín. Tieto zlúčeniny boli identifikované ako stereoizoméry, menovite – furanózy, pyranózy.



Obrázok 21 Chromatogram vzorky polyfenolov číslo J v THF s MSTFA činidlom

Tabuľka 10 Vzorka polyfenolu číslo J s MSTFA analyzované pomocou GC/MS

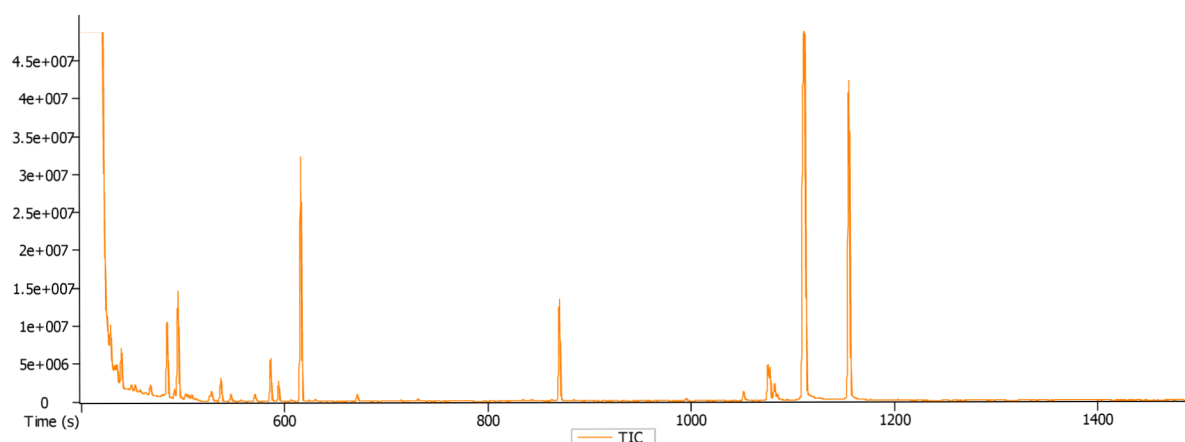
| Názov | Podobnosť | R _t [s] | Plocha | Výška |
|--|-----------|--------------------|---------|--------|
| Trimetylester butanovej kyseliny | 735 | 331,3 | 8733,4 | 8733,4 |
| Butylester propanovej kyseliny | 786 | 370,3 | 89920 | 4872 |
| Trimetylsilylester palmitovej kyseliny | 797 | 504,1 | 20373 | 1160,2 |
| Undekán | 940 | 534,5 | 5873579 | 334667 |
| Trimetylester glykolovej kyseliny | 916 | 556,4 | 989856 | 56315 |
| Trimetylsilylester dekanovej kyseliny | 729 | 834,1 | 29524 | 1427,7 |
| Trimetylsilylester pelargonovej kyseliny | 873 | 748,9 | 89747 | 4910,1 |
| Trimetylsilyl tagatofuranozu | 852 | 1059,1 | 70013 | 3915,5 |
| Trimetylsilyl talofuranozu | 812 | 1077,4 | 92781 | 4663,4 |
| Trimetylsilyl glukopiranozu | 947 | 1155,2 | 5970557 | 204 |
| Trimetylester stearovej kyseliny | 846 | 1307,8 | 234209 | 12442 |



Obrázok 22 Chromatogram vzorky polyfenolu číslo J v THF s BSTFA činidlom

Tabuľka 11 Vzorka polyfenolu číslo J s BSTFA analyzované pomocou GC/MS

| Názov | Podobnosť | R _t [s] | Plocha | Výška |
|--|-----------|--------------------|---------------------|---------|
| Butyrolaceton | 960 | 380,1 | 6351567 | 289928 |
| Trimetylsilylester propanovej kyseliny | 882 | 488,1 | 1161981 | 66688 |
| Trimetylsilylester acetovej kyseliny | 889 | 502,4 | 88104 | 4973,5 |
| Trimetylsilylester palmitovej kyseliny | 913 | 503,7 | 32894 | 1811,2 |
| Trimetylsilylether glycerolu | 865 | 671,3 | 1624326 | 88131 |
| Trimetylsilyl glukofuranozu | 785 | 1052 | 4883896 | 279128 |
| Trimetylsilyl ether deoxyribopyranozu | 700 | 1068,6 | 2,6·10 ⁷ | 1329359 |
| Trimetylsilyl mannopyranozu | 735 | 1109,9 | 70547 | 2553,2 |



Obrázok 23 Chromatogram vzorku polyfenolu číslo J s BSA+TMCS

Tabuľka 12 Vzorka polyfenolu číslo J s BSA+TMCS analyzované pomocou GC/MS

| Názov | Podobnosť | R _t [s] | Plocha | Výška |
|--|-----------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Trimetylsilylester propanovej kyseliny | 899 | 491,5 | 1366756 | 76524 |
| Trimetylsilylester l-alaninu | 810 | 530,1 | 63439 | 3040,9 |
| Tolykaín | 881 | 560,1 | 521886 | 28726 |
| Trimetylsilylester octovej kyseliny | 721 | 566 | 107659 | 5553,2 |
| Trimetylsilylester šťavelovej kyseliny | 728 | 594,1 | 9793618 | 555288 |
| Trimetylsilyl valinu | 842 | 627,7 | 110582 | 6129,1 |
| Trimetylsilylester butanovej kyseliny | 906 | 643,7 | 535544 | 23546 |
| Trimetylsilyl D-arabinovej kyseliny | 819 | 970,3 | 176196 | 8481,8 |
| Trimetylsilylether tagatofuranozu | 903 | 1059,1 | 181298 | 9661,9 |
| Trimetylsilyl glukofuranozu | 813 | 1080,6 | 34450 | 1801,9 |
| Trimetylsilyl glukopyranozu | 898 | 1112,2 | 5,3·10 ⁸ | 1,6·10 ⁷ |

5. Záver

V prvej fáze bola prevedená kvalitatívna analýza vzorky s cieľom zistiť, aké masné kyseliny sú vo vzorke obsiahnuté a aké je ich percentuálne zastúpenie. Kvalitatívna analýza bola prevedená tak, že jednotlivé masné kyseliny vo vzorkách boli porovnané s analýzou referenčného štandardu SUPELCO 37 Component FAME Mix, ktorý bol prevedený za rovnakých podmienok. Metylestery masných kyselín boli identifikované tak, že retenčné časy píkov štandardu boli porovnané s retenčnými časmi píkov pripravených vzorkov. Na identifikáciu týchto masných kyselín bola vybraná plynová chromatografia v spojení s plameňovým ionizačným detektorom (GC-FID) a plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou (GC/MS). Metóda derivatizácia splnila tú funkciu, že potvrdila prítomnosť glyceridov v olejoch. Možnosť využitia derivatizácie nebolo úspešné tak, ako v dostupnom literárnom zdroji. Jednotlivé typy mono-, di- a triglyceridov prítomné vo vzorke nebolo možné presne určiť, len skupiny glyceridov. Metóda má nevýhodu použiteľnosti kvôli tomu, že je potrebná vysoká teplotná kolóna.

V druhej fáze prebiehalo stanovenie látky extraktu z vínnej révy, ktorá mala názov vzorka polyfenol číslo J. Optimalizácia metódy na ne cieľovú analýzu prebiehala s použitím troch derivatizačných činidiel MSTFA, BSTFA a BSA+TMCS. Použitím derivatizačných činidiel MSTFA a BSTFA boli získané lepšie chromatografické parametre.

6. Zdroje

- 1 Rashid, U., Ibrahim, M., Nehdi, I. A., Al-Resayes, S. I., Ullah, S., Mehmood, M. A., & Shahzadi, S. (2016). Synthesis and characterization of poppy seed oil methyl esters. *Chinese Journal Of Chemical Engineering*, 24(8), 1087-1096. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2016.01.007>
- 2 DÜNDAR EMİR, D., AYDENİZ, B., & YILMAZ, E. (2015). Effects of roasting and enzyme pretreatments on yield and quality of cold-pressed poppy seed oils. *Turkish Journal Of Agriculture And Forestry*, 39, 260-271. <https://doi.org/10.3906/tar-1409-34>
- 3 Ghafoor, K., Özcan, M. M., AL-Juhaimi, F., Babiker, E. E., & Fadimu, G. J. (2019). Changes in quality, bioactive compounds, fatty acids, tocopherols, and phenolic composition in oven- and microwave-roasted poppy seeds and oil. *Lwt*, 99, 490-496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.017>
- 4 Yang, X., Gao, N., Hu, L., Li, J., & Sun, Y. (2015). Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. *Journal Of Food Engineering*, 161, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.027>
- 5 Bio KAMO: Nature Product Shop [Online]. Retrieved March 16, 2019, from https://www.biokamo.sk/index.php?route=product/product&product_id=188
- 6 Pushpangadan, P., George, V., & Singh, S. P. (2012). Poppy. *Handbook Of Herbs And Spices*, 437-448. <https://doi.org/10.1533/9780857095688.437>
- 7 Kolodziejczyk, P., Ozimek, L., & Kozłowska, J. (2012). The application of flax and hemp seeds in food, animal feed and cosmetics production. *Handbook Of Natural Fibres*, 329-366. <https://doi.org/10.1533/9780857095510.2.329>
- 8 Khandelwal, V., Sahoo, S. K., Kumar, A., & Manik, G. (2018). Electrically conductive green composites based on epoxidized linseed oil and polyaniline: An insight into electrical, thermal and mechanical properties. *Composites Part B: Engineering*, 136, 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.10.030>
- 9 Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum Usitatissimum* L.) from Romania [Online]. *Journal Of Agroalimentary Processes And Technologies*, 2012(18 (2), 136-140). Retrieved from [https://www.journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/61602L07_Popa_Vol.18\(2\)_2012.pdf](https://www.journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/61602L07_Popa_Vol.18(2)_2012.pdf)
- 10 Szyzewski, P., Frankowski, M., Ziola-Frankowska, A., Siepak, J., Szyzewski, T., & Piotrowski, P. (2016). A comparative study of the content of heavy metals in oils: linseed oil, rapeseed oil and soybean oil in technological production processes. *Archives Of Environmental Protection*, 42(3), 37-40. <https://doi.org/10.1515/aep-2016-0029>
- 11 Batirel, S., Yilmaz, A. M., Sahin, A., Perakakis, N., Kartal Ozer, N., & Mantzoros, C. S. (2018). Antitumor and antimetastatic effects of walnut oil in esophageal adenocarcinoma cells. *Clinical Nutrition*, 37(6), 2166-2171. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.10.016>
- 12 Simopoulos AP S, The importance of the ratio of omega-6/ omega-3 essential fatty acids, *Biomed Pharmacother*, 56. 365-79. 2002.
- 13 Li, X., Zhao, Y., Gong, X., Zhao, C., & Zhou, X. (2014). Quality Evaluation of Walnut Oil through HPLC and in Vitro Antioxidant Activity. *Journal Of Food And Nutrition Research*, 2(5), 244-249. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-5-6>
- 14 Kalkışım, Özgün & Ozdes, Duygu & Onaran, Abdurrahman. (2014). ASSESSMENT OF MINERAL ELEMENTS AND HEAVY METAL CONTENTS OF WALNUT SAMPLES (*JUGLANS REGIA* L.). *Advances in Food Sciences*. 36. 24-29.

- 15 Abdelsalam, H. M., Samak, M. A., & Alsemeh, A. E. (2019). Synergistic therapeutic effects of *Vitis vinifera* extract and Silymarin on experimentally induced cardiorenal injury: The pertinent role of Nrf2, *110*, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.053>
- 16 Pavloušek, P. (2006). *Výroba vína u malovinařů*. Praha: Grada. ISBN: 80-247-1247-4
- 17 Patel, N. K., & Shah, S. N. (2015). Biodiesel from Plant Oils. *Food, Energy, And Water*, 277-307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800211-7.00011-9>
- 18 Bouaid, A., El boulifi, N., Hahati, K., Martinez, M., & Aracil, J. (2014). Biodiesel production from biobutanol. Improvement of cold flow properties. *Chemical Engineering Journal*, 238, 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.10.022>
- 19 Muthukumar, C., Sharmila, G., Manojkumar, N., Gnanaprakasam, A., & Sivakumar, V. M. (2018). Optimization and Kinetic Modeling of Biodiesel Production. Reference Module In Materials Science And Materials Engineering. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10578-8>
- 20 Advanced Renewable Energy Systems. (2014). Elsevier. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978178242269350022X>
- 21 Dasgupta, A., & Wahed, A. (2014). Drugs of Abuse Testing. *Clinical Chemistry, Immunology And Laboratory Quality Control*, 289-306. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407821-5.00016-4>
- 22 Český lékopis 2009 (ČL 2009), Grada, Praha 2009
- 23 Reakční chromatografie v organické analýze. (1989). Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury.
- 24 Choi, C. K., & Dong, M. W. (2005). 5 Sample preparation for HPLC analysis of drug products. *Handbook Of Pharmaceutical Analysis By Hplc*, 123-144. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80049-2](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80049-2)
- 25 Su, Y., Xia, S., Wang, R., & Xiao, L. (2017). Phytohormonal quantification based on biological principles. *Hormone Metabolism And Signaling In Plants*, 431-470. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00013-X>
- 26 D. Rood: A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatography System, 3rd Edition, Wiley, 1999
- 27 Zaikin V., Halket J. (2009). A Handbook of derivatives for mass spectrometry. 513 IM Publications
- 28 Danielson, N. D., Gallagher, P. A., & Bao, J. J. (2006). Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis. *Encyclopedia Of Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1905>
- 29 Orata, F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography - Progress In Agricultural, Biomedical And Industrial Applications*. <https://doi.org/10.5772/33098>
- 30 Kataoka, H. (2005). Gas Chromatography of Amines as Various Derivatives. *Quantitation Of Amino Acids And Amines By Chromatography - Methods And Protocols*, 364-404. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(05\)80016-8](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(05)80016-8)
- 31 Knapp, D. R. (c1979). Handbook of analytical derivatization reactions. 741 New York: Wiley.
- 32 Caban, M., & Stepnowski, P. (2018). Silylation of acetaminophen by trifluoroacetamide-based silylation agents. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 154, 433-437. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.037>

- 33 Bulletin 909A, Guide to derivatization reagents for GC, Sigma-Aldrich 1997
- 34 Todua, N. G., & Mikaia, A. I. (2016). Mass spectrometry of analytical derivatives. 2. "Ortho" and "Para" effects in electron ionization mass spectra of derivatives of hydroxy, mercapto and amino benzoic acids. *Mass-spektrometria*, 13(2), 83-94.
- 35 Moldoveanu, S., & David, V. (2002). *Sample preparation in chromatography*. Boston: Elsevier.
- 36 Patschinski, P., Zhang, C., & Zipse, H. (2014). The Lewis Base-Catalyzed Silylation of Alcohols—A Mechanistic Analysis. *The Journal Of Organic Chemistry*, 79(17), 8348-8357. <https://doi.org/10.1021/jo5016568>
- 37 Sigma - Aldrich: Guide to derivatization reagents, Bulletin 909A, 1997 [online], dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application_Notes/4537.Par.0001.File.tmp/4537.pdf, [cit. 2010-10-03].
- 38 *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. (2014). Elsevier. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472114544>
- 39 Orata, F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography - Progress In Agricultural, Biomedical And Industrial Applications*. <https://doi.org/10.5772/33098>
- 40 Kientz, C. E., & Verweij, A. (1986). Trimethylsilylation and Trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns. *Journal Of Chromatography A*, 355, 229-240. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)97319-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)97319-4)
- 41 Lee, D. W., & Yoo, B. R. (2014). Advanced metal oxide (supported) catalysts: Synthesis and applications. *Journal Of Industrial And Engineering Chemistry*, 20(6), 3947-3959. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.08.004>
- 42 Regis Technologies: GC derivatization [Online]. Retrieved March 13, 2019, from <http://www.registech.com/specialty-reagents/gc-derivatization-reagents>
- 43 L. Brian, B., Gracy, R. W., & Scholes, V. E. (1972). Gas chromatography of cyclopropane fatty acid methylesters prepared with methanolic boron trichloride and boron trifluoride. *Journal Of Chromatography A*, 66(1), 138-140. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)82938-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)82938-1)
- 44 Martin, A. J. P., & Synge, R. L. M. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal*, 35(12), 1358-1368. <https://doi.org/10.1042/bj0351358>
- 45 Grob, R. L., & Barry, E. F. (c2004). *Modern practice of gas chromatography* (4th ed.). Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience.
- 46 Sparkman, O. D., Penton, Z. E., & Kitson, F. G. (2011). *Gas Chromatography. Gas Chromatography And Mass Spectrometry: A Practical Guide*, 15-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373628-4.00002-2>
- 47 Koplík R., prednáška Základy analýzi potravin, Ústav analýzi potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2010 [cit. 2010-10-15] dostupné na <https://web.vscht.cz/~koplíkr/ČástA6_3.pdf>
- 48 Pěkníková, M., & Krucinová, D. (1999). *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA.
- 49 Obrázok: <https://en.wikibooks.org/w/index.php?title=File:SchemaGC.png&filetimestamp=20061029184003>

- 50 Nikolova, I. Chromatografické metody [Online]. In . Dostupné z http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf
- 51 Jančářová, I., & Jančář, L. (2003). Analytická chemie. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.
- 52 Volka, K. (1995). Analytická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.
- 53 V. Hinshaw, J. (2013). Measuring Gas Flow for Gas Chromatography [Online]. LCGC North America, 31(3) 210-217. Dostupné z <http://www.chromatographyonline.com/measuring-gas-flow-gas-chromatography?id=&sk=&date=&pageID=4>
- 54 Nollet, L. M. L., & Toldrá, F. ([2015]). Handbook of food analysis (Third edition). Boca Raton, FL: Marcel Dekker.
- 55 Smolková, E. (1991). Analýza látek v plynném stavu. Praha: SNTL.
- 56 Smolková, E., Pacáková, V., & Feltl, L. (1976). Plynová chromatografie: 1. [díl]: Teoretické základy. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- 57 Šingliar, M. (1961). Plynová chromatografia v praxi. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry.
- 58 Dias, A. N., Cerqueira, M. B. R., Moura, R. R. de, Kurz, M. H. S., Clementin, R. M., D'Oca, M. G. M., & , E. G. (2012). Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography. *Fuel*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.037>
- 59 Prados, C. P., Rezende, D. R., Batista, L. R., Alves, M. I. R., & Antoniosi Filho, N. R. (2012). Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel. *Fuel*, 96, 476-481. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.11.060>

7. Zoznam použitých skratiek a symbolov

- GC – plynová chromatografia
- GC-FID – plynová chromatograf s plameňovým ionizačným detektorom
- GC/MS – plynová chromatograf s hmotnostným spektrometrom
- MSTFA – N-metyl-N-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid
- BSTFA – N,O-Bis-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid
- BSA+TMCS – N,O-Bis-(trimetylsilyl)acetamid s trimetylchlorsilanom
- PUFA – polynenasýtené mastné kyseliny
- ALA – kyselina alfa-linolenová
- LA – kyseliny linolové
- ELO – epoxidovaný ľanový olej
- PVC – polyvinylchlorid
- ME – metylester
- EE – etylester
- FFA – voľné mastné kyseliny
- HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
- API – aktívne farmaceutické prísady
- TMS – trimetylsilyl skupina
- DMSO – dimetylsulfoxid
- DMF – dimetylformamid
- THF – tetrahydrofuran
- ACN – acetonitril
- ECD – detektor elektrónového záchytu
- PFBBr – pentafluórbenzylbromid
- TBH – tetrabutylamóniumhydroxid
- NCI-MS – hmotnostná spektrometria s negatívnou chemickou ionizáciou
- FAME - metylester mastnej kyseliny