



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

**POTVRZENÍ IDENTIFIKACE TĚKAVÝCH LÁTEK VZORKU
VÝPOČTEM RETENČNÍCH INDEXŮ**

CONFIRMATION OF IDENTIFICATION OF VOLATILE SUBSTANCES BY CALCULATION OF RETENTION INDEXES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Sára Cviková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1505/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Sára Cviková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Potvrzení identifikace těkavých látek vzorku výpočtem retenčních indexů

Zadání bakalářské práce:

- Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - retenční indexy (RI) v plynové chromatografii – princip, popis, výpočet
 - mikroextrakce pevnou fází, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC–MS) – princip, popis, instrumentace
 - charakterizace vybraného vzorku oleje – složení, vlastnosti, těkavé látky
- Analyzujte směs standardů n–alkanů metodou GC–MS
- Vyhledejte potřebné databáze RI pro vybraný typ kolony
- Identifikujte těkavé látky ve vzorku oleje a ověřte identifikaci výpočtem retenčních indexů

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Sára Cviková
student(ka)

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zameriava na overenie identifikácie prchavých látok vzorky pomocou výpočtu retenčných indexov. Pre stanovenie bola použitá metóda HS-SPME-GC-MS. Prvá časť práce je teoretická a zameriava sa najmä na stručné ujasnenie pojmov ako plynová chromatografia, retenčný čas, retenčný index, hmotnostná spektrometria, ale aj na chemicko - fyzikálny popis vzorky CBD oleja, ktorá bola použitá na overenie funkčnosti retenčných indexov. Na stanovenie retenčných indexov bol použitý štandard homologickej rady n-alkánov (C₈ - C₂₀), ktorý bol analyzovaný za totožných podmienok ako vzorka. Vo vzorke CBD oleja sa podarilo identifikovať 38 prchavých zlúčenín. Ich identifikácia bola potvrdená výpočtom retenčných indexov, pre výpočet bola použitá rovnica podľa H. van der Doola a D.J. Kratza a zrovnáním s tabelovanými hodnotami pre rovnaký typ chromatografickej kolóny.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on verifying the identification of volatile compounds using retention indices. The HS-SPME-GC-MS was used for determination. First part is theoretical and is focused especially on the brief definition of terms such as gas chromatography, retention time, retention index, mass spectrometry, however, the chemical and physical description of the CBD oil sample, which was used to prove the function of retention indices, is also mentioned. The standard homologous set of n-alkanes (C₈ - C₂₀) was used to determinate the retention indices, which was analyzed under the same conditions as the sample of CBD oil. In the CBD oil 38 volatile compounds were successfully identified. Their identification was confirmed by calculating their retention indices using the equation by H. van der Dool and D.J. Kratz, and comparing with tabulated values for the same type of chromatographic column.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

retenční index, těkavé látky, GC-MS

KEYWORD

retention indexes, volatile compounds, GC-MS

CVIKOVÁ, Sára. *Potvrzení identifikace těkavých látek vzorku výpočtem retenčních indexů*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123981>.
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Eva Vítová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne citovala. Bakalárska 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.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som sa poďakovala vedúcej tejto práce pani docentke Eve Vítovej, ktorá bola vždy ochotná mi pomôcť a všetky veci odborne skonzultovať. Rada by som sa poďakovala aj pani doktorke Jane Zemanovej, ktorá zabezpečila vzorku CBD oleja a v poslednom rade by som sa chcela poďakovať mojej rodine a najbližším kamarátom za neustálu podporu.

OBSAH

1. Úvod	6
2. Teoretická časť	7
2.1. <i>Plynová chromatografia</i>	7
2.1.1. Chromatogram	9
2.2. <i>Retenčné charakteristiky</i>	10
2.2.1. Absolútne retenčné dáta	10
2.2.2. Relatívne retenčné dáta	10
2.3. <i>Hmotnostná spektrometria</i>	14
2.4. <i>Plynová chromatografia - hmotnostná spektrometria</i>	16
2.4.1. Vyhodnocovanie výsledkov	18
2.5. <i>Mikroextrakcia pevnou fázou</i>	18
2.6. <i>CBD olej</i>	19
3. Experimentálna časť	23
3.1. <i>Laboratórne vybavenie a chemikálie</i>	23
3.1.1. Plyny	23
3.1.2. Prístroje	23
3.1.3. Pracovné pomôcky	23
3.1.4. Chemikálie	24
3.2. <i>Analyzovaná vzorka</i>	24
3.3. <i>Použitá metóda HS-SPME-GC-MS</i>	24
3.3.1. Podmienky HS-SPME extrakcie	24
3.3.2. Podmienky GC-MS analýzy	25
3.3.3. Identifikácia a kvantifikácia prchavých látok	25
3.4. <i>Štatistické spracovanie výsledkov</i>	25
4. Výsledky a diskusia	26
4.1. <i>Stanovenie retenčných indexov</i>	26
4.2. <i>Identifikácia a kvantifikácia prchavých látok v CBD oleji</i>	28
5. Záver	38
Zoznam použitej literatúry	39
6. Zoznam použitých skratiek	44

1. ÚVOD

V rôznych oblastiach chémie počnúc od potravinárskej po materiálnu je potrebná identifikácia látok, z ktorých je zložená skúmaná vzorka. Umožňuje nám to lepšie pochopiť správanie danej látky, prípadne si vieme odvodiť ďalšie jej vlastnosti.

Na podrobné stanovenie látok je zameraný odbor chémie zvaný analytická chémia, ktorá ponúka nespočetné množstvo inštrumentálnych možností. Je potrebné si však určiť, ktorá metóda je pre danú látku najvhodnejšia, predovšetkým je nutné si uvedomiť jej fyzikálno-chemické vlastnosti.

Jedna z najmodernejších, najúčinnějších a v súčasnosti najpoužívanějších techník je plynová chromatografia. Táto technika však má svoje obmedzenie; je veľmi účinná pri separácií, ale omnoho menej účinná pri identifikácií látok. Bežne sa pre identifikáciu látok používa porovnanie tzv. retenčného času analytu (tj. doba od nástreku na kolónu po maximum chromatografického píku) s odpovedajúcim štandardom; môžu však nastať prípady, kedy tento prístup nepodá jednoznačný výsledok. Preto je táto metóda dopĺňovaná výpočtom retenčných indexov a identifikáciou látok podľa databázy retenčných indexov.

Táto kombinácia je výhodná aj pri použití plynovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou, kedy je identifikácia analytu založená na porovnaní hmotnostných spektier s knižnicou spektier, prípadne na interpretácií spektier. Výpočet retenčných indexov je vhodným doplnkom údajov z interpretácie.

Cieľom tejto práce bolo určiť retenčné indexy pre stanovenie prchavých (aromatických) látok pomocou plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou a overiť ich funkčnosť na vybranom vzorku oleja.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

Ako už bolo zmienené, hlavným cieľom tejto práce bolo určiť retenčné indexy pre stanovenie prchavých látok pomocou plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou. V nasledujúcich kapitolách teórie je predovšetkým popísaná použitá metóda, teda plynová chromatografia, hmotnostná spektrometria a ich spojenie; stručne je zmienená aj mikroextrakcia pevnou fázou. Ďalej sú popísané základy identifikácie a určovania tzv. retenčných charakteristík, hlavne retenčných indexov. Na záver je stručne charakterizovaný CBD olej, ktorý bol vybratý pre overenie funkčnosti zistených retenčných indexov.

2.1. Plynová chromatografia

Chromatografiu obecné zaraďujeme medzi separačné metódy, používa sa ku separácií, identifikácií a kvantitatívnemu určeniu zložiek zmesi [1].

Princíp chromatografie spočíva v tom, že sa vzorka vnáša medzi dve fáze, ktoré sú navzájom nemiesiteľné. Stacionárna fáza je umiestnená v kolóne, cez stacionárnu fázu prechádza mobilná fáza, ktorá unáša separované zložky vzorky kolónou. Na stacionárnu fázu sa pútajú viac tie zložky vzorku, ktoré k nej majú väčšiu afinitu; čím sa pohybom mobilnej fázy zmes rozdelí na jednotlivé komponenty [1].

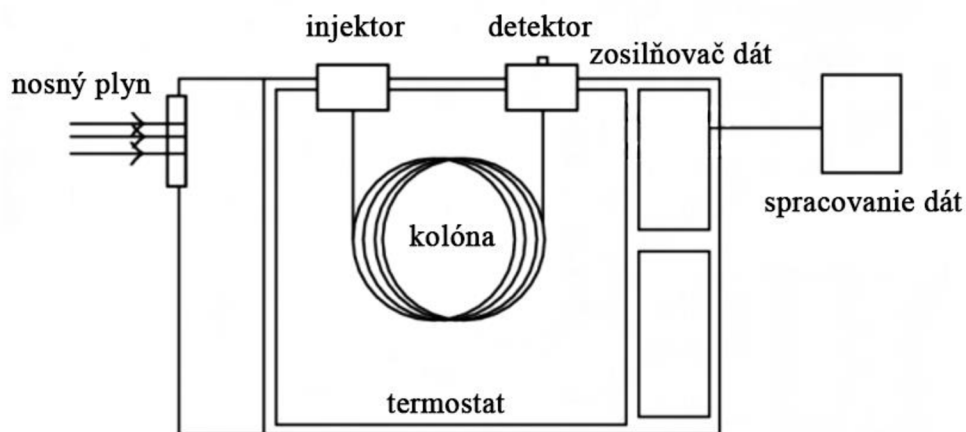
Prvé počiatky plynovej chromatografie siahajú do obdobia 50. rokov 20. storočia. V týchto rokoch sa položili základy všetkého, čo sa tejto metódy týka, a to hlavne aparatúry a riešenia problémov s prevedením. Boli vedené mnohé výskumy o technikách kolónových a detekčných, boli optimalizované podmienky na prácu s látkami ťažšími na separáciu. S nástupom technológií sa zaužívalo napájanie plynových chromatografov na počítači, čo viedlo k úplnej automatizácii a dosiahnutiu presnejších výsledkov pri vyhodnocovaní. Dlhé roky vylepšovania a vývinu tejto metódy viedli k jej zdokonaleniu do tej podoby, v akej ju poznáme dnes [2].

Spektrum využitia je veľmi široké. Plynová chromatografia sa stala významnou vo výskume vo vesmíre, je súčasťou tzv. MOMA (Mars Organic Molecule Analyzer). Doménou v potravinárskom priemysle je stanovenie mastných kyselín či analýza prchavých látok v potravinách; niektoré štúdie hovoria aj o hľadaní enantiomérov esenciálnych olejov. Veľký význam má aj v analytickej chémii a v chémii životného prostredia, kedy sa používa na stanovenie toxických a škodlivých látok v životnom prostredí. Inverzná plynová chromatografia je druh GC, ktorá má vymenené úlohy mobilnej a stacionárnej fázy. Táto technika má obľubu v charakterizácii polymérov a biopolymérov [2],[3].

Pri plynovej chromatografii sa používa ako mobilná fáza inertný plyn, celé delenie prebieha v plynnom stave za vysokých teplôt. Ako nosný plyn sa v praxi využíva plyn

dostupný v čistej forme, napríklad hélium, vodík, alebo vzácny plyn, napríklad argón. O tom, aký nosný plyn sa bude pri separácii využívať, rozhoduje to, či dokáže poskytnúť inertné správanie voči zložkám vzorky. Vysoko hustý plyn dokáže poskytnúť najlepšiu účinnosť, pretože má menšiu difúznosť, na druhej strane v porovnaní s plynom s nižšou hustotou je analýza pomalšia. Okrem toho treba brať pri výbere nosného plynu ohľad i na cenu, netoxicitu a druh detektora [1],[4].

Jednoduchá schéma plynového chromatogramu je znázornená na Obrázok 1, jeho činnosť môžeme popísať zjednodušeným spôsobom: z tlakovej fľaše prichádza nosný plyn na začiatok kolóny. Do prúdu nosného plynu sa v injektore dávkuje vzorka, ktorá je následne vnesená do chromatografickej kolóny. V kolóne sa vzorka rozdelí na zložky, ktoré sú postupne vymývané do detektora, ktorého signál sa spracuje a vyhodnotí počítačom. Teplotu injektora, detektora a kolóny reguluje termostat [5].



Obrázok 1: Schéma plynového chromatografu, prevzaté z [5]

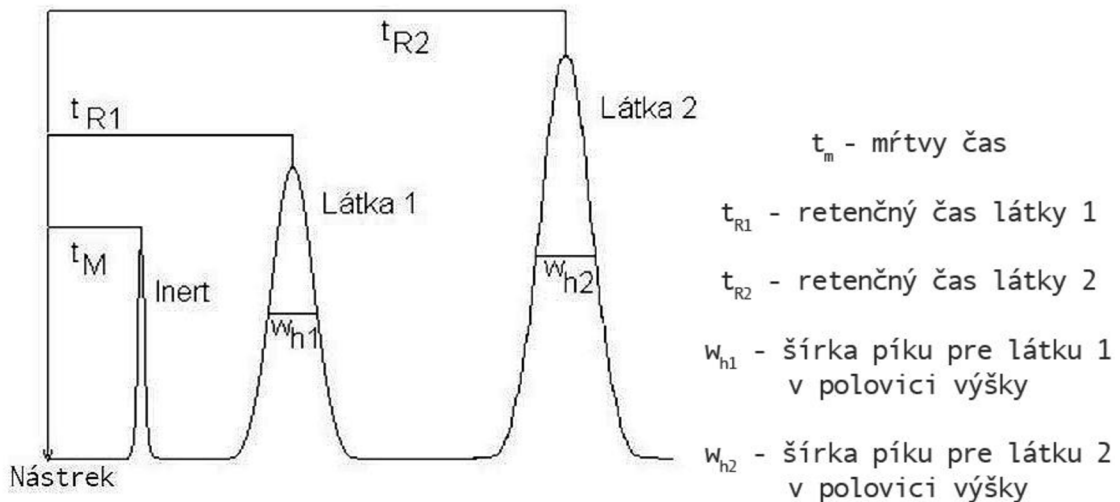
Látky sa separujú na základe rozdielov pri teplotách varu. Rôznym látkam trvá rôzne dlhý čas na to, aby sa eluovali z kolóny. Tento čas sa nazýva retenčný čas a býva rozdielny z toho dôvodu, že rôzne látky majú rozdielnú afinitu na stacionárnu fázu [6].

Teplota pri analýze je jeden z najdôležitejších faktorov. Teplota injektora by mala byť dostatočne vysoká, aby sa dosiahla čo najväčšia rýchlosť odparovania, aby sa dostala vzorka do kolóny v malom objeme. Príliš vysoká teplota môže poškodiť vstrekovací otvor a výsledky môžu byť skreslené – komponenty trávajú väčšinu času v plynnej fáze, teda sa eluujú rýchlo ale rozlíšenie je zlé. Teplota príliš nízka má na dôsledku to, že rozlíšenie je síce zvýšené, ale citlivosť je znížená kvôli tomu, že komponenty trávajú viac času vo fáze stacionárnej. Dá sa teda povedať, že výber správnej teploty je kompromis medzi rýchlosťou, citlivosťou a rozlíšením. Uľahčenie a urýchľovanie separácií nastáva pri programovaní teploty; teplota sa počas chodu automaticky zvyšuje predvolenou rýchlosťou. Takto sa ťažšie eluovateľné zlúčeniny eluujú bez vytlačania iných zlúčenín z kolóny [4].

Sme schopní identifikovať nielen plyny, ale aj všetky látky, ktoré sa na plynné skupenstvo dokážu konvertovať, či už ide o látky kvapalné alebo tuhé [2],[7].

2.1.1. Chromatogram

Výstupom z chromatografického merania je tzv. chromatogram, ktorý sa skladá z píkov (elučných, retenčných kriviek), ktoré odpovedajú jednotlivým zložkám. Z chromatogramu sme schopní určiť ako kvalitatívne, tak kvantitatívne informácie o danom vzorku, vid' Obrázok 2.



Obrázok 2: Vzorový chromatogram s legendou, prevzaté z [8]

2.1.1.1. Kvalitatívna analýza

Ako bolo už predtým zmienené, chromatografia je metóda separačná a sama o sebe má veľmi obmedzené možnosti kvalitatívnej analýzy. Základom vyhodnocovania sú tzv. retenčné charakteristiky. Retencia analyzovanej látky v kolóne je úmerná jej distribúcií medzi stacionárnou a mobilnou fázou, ktorú ide popísať konštantou K_D . Táto konštanta sa dá vyjadriť pomocou vzorca (1)

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} = \frac{n_s V_s}{n_m V_m} \quad (1)$$

kde c_s , c_m sú koncentrácie zložky v stacionárnej a mobilnej fáze, prípadne inou alternatívou vzorca, kde sa používajú objemy V_s , V_m – objemy mobilnej fázy v chromatografickom systéme a k tomu prislúchajúce látkové množstvá n_s , n_m . Čím vyššia je hodnota K pre zložku danej vzorky, tým väčšia je jej rozpustnosť, čo znamená, že tým dlhšia je jej retencia v stacionárnej fáze [2],[9],[11].

Na získanie čo najviac informácií je potreba úplná separácia všetkých zložiek. Častým problémom býva situácia, kedy jeden individuálny pík neodpovedá práve jednej zložke, ale pohlcuje aj píky ostatných zložiek, čo býva spôsobené hlavne nesprávnym nastavením prístroja, separačnými vlastnosťami kolóny alebo citlivosťou detektoru [2].

2.2. Retenčné charakteristiky

Pri „klasickej“ chromatografickej metóde sú analytické signály dvojrozmerné, to znamená, že každý pík je charakterizovaný dvomi vlastnosťami: plochou, úmernej množstvu látky eluovanej z kolóny a polohou na chromatograme, resp. retenčným časom. Na základe týchto informácií je si možno potom odvodiť chemickú povahu a štruktúru analytu [10].

Retenčné charakteristiky môžeme rozdeliť do dvoch kategórií: absolútne a relatívne.

2.2.1. Absolútne retenčné dáta

Charakteristickou veličinou každej látky v danom systéme je retenčný čas t_R , čo je doba, ktorá uplynie od okamihu nastreknutia vzorky do maxima chromatografického píku, a retenčný objem V_R , tj. objem plynu potrebný k elúcii zložky.

2.2.1.1. Retenčný objem

Retenčný objem V_R získame ako násobok retenčného času a objemového prietoku F_c pri teplote kolóny. Táto veličina predstavuje objem eluentného nosného plynu privedeného do kolóny medzi nástrekom vzorky až po maximum danej špecifikovanej zložky. Je možné ho rozdeliť na dve časti a to sú mŕtvy retenčný objem V_M a redukovaný retenčný objem V'_R [1],[2],[4].

2.2.1.2. Retenčný čas

Samotné retenčné časy nie je možné použiť ako samotnú interpretáciu analýzy, pretože sú závislé od pracovných podmienok samotnej analýzy. V prípade plynovej chromatografie sú tieto podmienky napríklad teplota, typ stacionárnej fázy, dĺžka kolóny, prietok nosného plynu atď. Práve kvôli tomuto faktoru je nutné štandardizovať retenčné parametre [10].

2.2.2. Relatívne retenčné dáta

V bežnej plynovej chromatografii sa dáva prednosť relatívnym retenčným dátam pred absolútnymi retenčnými dátami. Vtedy je možno porovnávať tieto retencie so štandardom, ktorý je buďto, ideálne, priamo súčasťou danej vzorky, alebo je analyzovaný za rovnakých

podmienok. Relatívne retenčné charakteristiky môžu byť vzťahnuté buď na retenciu jednej štandardnej látky alebo na retenciu členov homologickej rady štandardných látok [2],[11].

2.2.2.1. *Relatívne retencie*

Relatívnu retenciu, tj. pomer dvoch absolútnych retenčných charakteristík, označovanú ako r_{12} , je možno zistiť priamo z chromatogramu. Najjednoduchší spôsob, ako je možno vyjadriť relatívnu retenciu, je pomocou korigovaných retenčných časov

$$r_{12} = \frac{t'_{R,1}}{t'_{R,2}} = \frac{V'_{R,1}}{V'_{R,2}} \neq \frac{t_{R,1}}{t_{R,2}} \quad (2)$$

Po vzťahnutí relatívnej retencie ku štandardu sa výrazne znížia chyby, ktoré sú spôsobené nepresným meraním a reguláciou, vrátane parametrov kolóny. Relatívna retencia nie je závislá na prietoku nosného plynu, na tlakovom spáde a ani na množstve stacionárnej fázy v kolóne [2],[11].

2.2.2.2. *Retenčné indexy*

Jedným z možných riešení problému štandardizácie je prepočítanie nameraných dát za rôznych podmienok do mierky, kde je možné tieto údaje porovnávať. Je to hlavne pomocou matematickej operácie nazývanej lineárna interpolácia. Avšak, v prípade nelineárnej alebo nami neznámej závislosti, vedie použitie tejto interpolácie ku istým neistotám vo výsledkoch [10].

Pre uplatnenie tohto konceptu v chromatografií bolo potrebné, aby sa do analyzovaných zložiek vložili zložky, ktoré majú predom známy retenčný index. Okrem toho je dôležité splniť aj tieto parametre: správny výber sady referenčných zlúčenín (najčastejšie homologická rada uhl'ovodíkov); priradenie hodnôt retenčných indexov týmto zlúčeninám a výber vzorca na výpočet hodnôt retenčných indexov pre všetky ostatné analyty. Práve kvôli márnej snahe nájsť univerzálnu štandardnú látku, vyhovujúcu pre široké spektrum analytov viedla k zavedeniu retenčných indexov [10].

Všeobecne, retenčný index je konštanta charakteristická pre danú látku, použitú stacionárnu fázu, a nami zvolenú pracovnú teplotu, ktorá určuje veľkosť interakcie so stacionárnou fázou. Ak retenčné časy berieme ako systém, tak je definovaný dvoma parametrami, relatívnou retenciou a retenčným objemom. Termodynamická interpretácia hodnôt retenčných indexov je, že sú úmerné voľnej energii sorpcie. Retenčné indexy navrhnuté Kovátom (1958), vzťahujú retenčné správanie látok k rade referenčných látok, akými sú nerozvetvené alkány. V tomto prípade je retenčný index stonásobok počtu uhlíkov, pričom

pracovná teplota a stacionárna fáza ostávajú zanedbané, takže retenčný index nerozvetveného alkánu C_zH_{2z+2} bude $100z$. Použitá stupnica je logaritmická, pretože logaritmus retenčného času alkánov rastie lineárne s dĺžkou ich reťazcov. Retenčný index analyzovanej látky X sa dá potom zistiť logaritmicky zo susedných dvoch alkánov takto:

$$I_x = 100 \cdot \frac{\log V_{g,X} - \log V_{g,z}}{\log V_{g,z+1} - \log V_{g,z}} + 100z \quad (3)$$

kde $V'_{g,X}$, $V'_{g,z}$ a $V'_{g,z+1}$ sú špecifické retenčné objemy látky X a alkánov so z a $z+1$ počtom uhlíkových atómov. Ak však analýza alkánov a analyzovanej látky prebieha súčasne, a môžeme brať za „súčasne“ aj analýzu za identických podmienok, je možno V_g nahradiť vo výpočtoch korigovanými retenčnými veličinami, čo je napríklad korigovaný retenčný čas alebo objem [2],[10],[11].

Je možné vyjadriť retenčný index aj pomocou relatívnej retencie $r_{X,z}$ látky X a alkánu s počtom uhlíkov z so smernicou závislosti $\log t'_R$ na počte uhlíkových atómov v molekule alkánu (Y):

$$I = 100 \cdot \frac{\log r_{X,z}}{\log r_{z+1,z}} + 100z = 100 \cdot \frac{\log r_{X,z}}{\log r_Y} + 100z \quad (4)$$

V prípade, ak je dokázaná linearita závislosti $\log t'_R$ na z , teda za predpokladu, že Y je konštantné, tak nie je potreba používať ku vypočítaniu retenčného indexu dva susedné alkány, ale je možno využiť dva ľubovoľné alkány s počtom uhlíkových atómov z a $z+i$, aj keď najvyššia presnosť je dosiahnutá pri použití dvoch susedných alkánov:

$$I = 100 \cdot \frac{\log t'_{R,X} - \log t'_{R,z}}{\log t'_{R,z+1} - \log t'_{R,z}} + 100z \quad (5)$$

Retenčný index látky X všeobecne predstavuje stonásobok počtu uhlíkov hypotetického uhl'ovodíku, ktorý má totožnú retenciu s látkou X. Logaritmy sa používajú z toho dôvodu, aby bol výsledok v lineárnej forme; logaritmus korigovaných retenčných veličín je lineárnou funkciou počtu uhlíkových atómov členov homologických radov [9],[11].

Na to, aby bolo možné správne identifikovať látku pomocou retenčných indexov, je samozrejme potreba mať presne zmerané ich hodnoty. Obecne platí: čím presnejšie sú hodnoty retenčných indexov, tým rýchlejšia a ľahšia je identifikácia látok; toto tvrdenie tkvie najmä v tom, že vyššou presnosťou hodnôt retenčných indexov a s menšou chybou merania sa znižuje kruh potenciálnych látok, ktoré môžu byť hľadanou látkou. Najčastejšie chyby pri

meraní vznikajú najmä pri nesprávnom odčítaní retenčných časov či pri adsorpčných javoch a dokonca aj pri fluktuácií experimentálnych javov [11].

Kovátsove indexy sa stali veľmi populárne v plynovej chromatografii, boli mnohokrát citované; ďalší vývoj konceptu retenčných indexov bol nutný aj pre podmienky neizotermické. Neizotermickými podmienkami definujeme také podmienky, kedy počiatočná teplota to sa počas analýzy mení, tým pádom nie je možno dodržať lineárny vzťah; dnes sa používajú na analýzu práve takéto podmienky. Toto bol dôvod, prečo bolo nutné pozmeniť pre takéto podmienky pôvodný Kovátsov vzorec, pričom sa rada referenčných zlúčenín ani vopred dané retenčné indexy nemenili. Preto bol pôvodný vzorec upravený na špeciálny vzorec pre režim lineárneho programovania teploty v roku 1963 H. van der Doolom a D. J. Kratzom pre retenčné indexy:

$$I^T = 100 \cdot \left(z + \frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{R,z}} \right) \quad (6)$$

kde z je počet uhlíkových atómov v n -alkáne, ktorý sa eluuje pred tým, než zložka prejde ionizáciou; z a $z+1$ sú alkány so z - a $z+1$ -počtom uhlíkových atómov [9],[10],[12].

Vypočítané hodnoty retenčných indexov pre izotermické a teplotne programované podmienky sú si síce blízke, ale nie sú identické. Treba brať v úvahu, že existuje aj možnosť, že hodnoty retenčných indexov sa líšia aj v závislosti od použitej rýchlosti a počiatočnej teploty to [9].

Veľký vplyv na hodnoty retenčných indexov má však povaha, teda typ stacionárnej fázy v chromatografickej kolóne, vid' Tabuľka 1. Rozlišujeme dve základné typy fáz: nepolárne polydimethylsiloxány $[-Si-(CH_3)_2 -O-]_n$ s maximálnou pracovnou teplotou okolo $300^\circ C$ a polárne polyethylénglykoly $[-CH_2CH_2 -O-]_n$ s maximálnou pracovnou teplotou cca $225^\circ C$ [10].

Aj keď tieto dve fázy majú rozdielne obchodné názvy a rozdielne zloženie, či molekulovú hmotnosť, ich polarita ostáva približne rovnaká. Pri porovnávaní retenčných indexov rovnakých zlúčenín nameraných na rovnakých fázach, ale s rôznymi pracovnými podmienkami, môžu nastať isté odchýlky. Najväčším parametrom týchto odchýliek je rozdiel teplôt, resp. teplotných závislostí retenčných indexov β :

$$\beta = \frac{dRI}{dT} = \frac{RI(T_2) - RI(T_1)}{T_2 - T_1} \quad (7)$$

pričom hodnota β naberá nulové hodnoty pri zlúčeninách necyklických, typologicky najvýznamnejšie pre n -alkány. Všeobecne platí, že čím viac cyklov v molekule, tým je hodnota

β väčšia, napríklad na 0,3 - 0,5 pri cykloalkánoch a arénoch; a $\beta > 1$ pri polycyklických zlúčeninách [10].

Tabuľka 1: Porovnanie retenčných indexov vybraných zlúčenín pre rôzne stacionárne fázy [12]

Názov zlúčeniny	RI OV-1 (polydimethylsiloxán)	RI CW-20M (polyethylénglykol)
Myrcén	979	1159
α -Pinén	960	1018
γ -Terpinén	1042	1236
Linalool	1080	1553
Estragol	1168	1656
Anetol	1251	1807
Chamazulén	1674	2334

podmienky analýzy: split pomer 1:20, teplota 230°C, FID detektor, teplota detektora 250°C, teplotný program: z 50°C (1 min) na 220 °C (3°C/min), nosný plyn vodík, prietok 1,5 mL/min

Vo všeobecnosti sú systémy retenčných indexov založené na vzťahu medzi retenciou a prírastku do štruktúry. To znamená, že každý pravidelný prírastok v rade chemických štruktúr by mal poskytovať pravidelný prírastok v zodpovedajúcich retenčných časoch. Dá sa teda povedať, že ako homológna rada nemusia byť vždy použité n-alkány. N-alkány preukazujú dokonca v polárnych stacionárnych fázach kolísavé správanie. Vzhľadom k tomuto faktoru sa uviedli do praxe alternatívy, ako napríklad alkylhalogenidy, alkylétery. Na druhej strane, najosvedčenejšie a najpoužívanejšie referenčné rady pre identifikáciu prchavých látok sú práve n-alkány a etylestery mastných kyselín. Výber vhodnej referenčnej rady závisí aj od toho, či vykazujú podobné správanie ako skúmaná vzorka alebo sú prípadne súčasťou skúmanej vzorky [9].

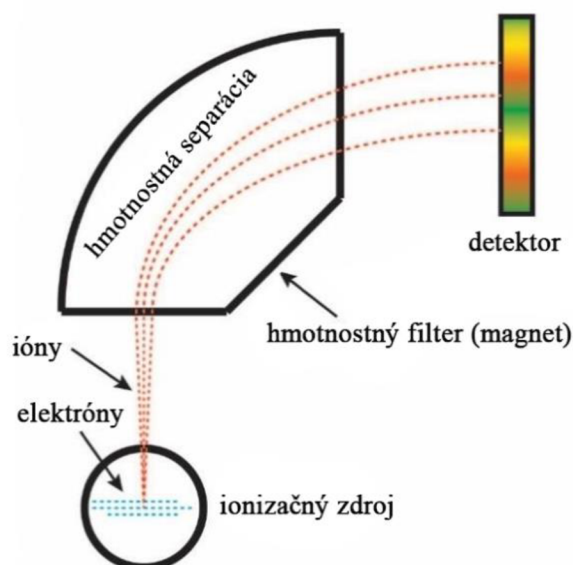
V odbornej literatúre bolo publikované veľké množstvo databáz retenčných indexov. Tieto hodnoty však neboli vytvorené za štandardizovaných podmienok napríklad rýchlosti toku nosného plynu, rýchlosti programovania teploty. Tým pádom presnosť a spoľahlivosť môže byť obmedzená. Preto je nutné aby sa hodnoty vypočítaných retenčných indexov porovnávali s príslušnými stacionárnymi fázami a podmienkami analýzy. Tieto hodnoty je potom možno nájsť v odbornej literatúre a v databázach retenčných indexov [9],[13].

2.3. Hmotnostná spektrometria

Pre lepšiu identifikáciu analytu je vhodná kombinácia plynovej chromatografie s niektorými spektrálnymi technikami, napríklad hmotnostná spektrometria, infračervená spektrometria, NMR. V súčasnej dobe sa bežne využíva spojenie s hmotnostnou spektrometriou.

Princípom hmotnostnej spektrometrie je produkcia, separácia a detekcia iónov v plynnej fáze. Základom je prevedenie látky na ióny, odštiepením valenčných elektrónov. Vzorky sa zavedú do ionizačného zdroja pomocou vstupného systému, a vplyvom tohto zdroja sa premieňa analyzovaná vzorka na molekulové ióny a fragmenty. Dôležitá veličina je tzv. efektívna hmotnosť ionizovanej častice m/z , kde m predstavuje hmotnosť iónu a z číslo elementárneho náboja. Pri ionizácii sa spotrebúva energia, ktorá musí byť dodaná rôznymi procesmi, napríklad fotoionizáciou (pre látky v plynnej fáze), laserovou desorpciou (pre látky v kondenzovanej fáze). Ďalej sa prúd iónov a fragmentov urýchli vďaka silnému elektrickému poľu a následne je vedený do homogénneho magnetického poľa ako tenký zväzok letiacich častíc. V tomto poli potom nastáva delenie častíc podľa ich náboja m/z na základe zakrivenia ich dráh letu a intenzita signálu je úmerná podľa počtu dopadnutých častíc; všetky takéto ióny tvoria hmotnostné spektrum, ktoré je tvorené jednotlivými signálmi v závislosti na hodnote m/z [14],[15].

Na získanie hmotnostného spektra je dôležitá už skôr spomenutá ionizácia, ktorá po detekcii výsledného iónu dáva informáciu o molekulovej hmotnosti látky, prípadne o jej zložení. Najpoužívanejším typom ionizácie je elektrónová. Pri komplexných molekulách je dôležité, aby sa fragmentovali, čo nám umožňuje určiť skupiny tvoriace danú molekulu a ich kombináciu v nej. Adícia elektrónu prebieha vždy medzi atakujúcim elektrónom a elektrónom molekuly. Molekulová hmotnosť detekovanej látky po elektrónovom ataku sa potom nelíši od molekulovej hmotnosti molekuly, pretože hmotnosť elektrónu je možno zanedbať. Pomocníkom pri fragmentácii analytu môže byť chemická ionizácia, ktorá je rozdielna v tom, že sa do iónového zdroja pridáva aj pomocný plyn, najčastejšie metán alebo izobután. Ionizované sú molekuly týchto pomocných plynov, ktoré potom reagujú s molekulami vzorky. Tieto dva typy ionizácií je najvhodnejšie použiť pri nízko molekulárnych látkach. Pri niektorých látkach je však nutné použiť „mäkké“ ionizačné metódy. Je tak potrebné urobiť pri látkach, ktoré sú síce termostabilné, ale zároveň štrukturálne labilné a tým pádom ich nie sme schopní nájsť pri vyhodnocovaní z hmotnostného spektra [4],[7],[16].



Obrázok 3: Jednoduchá schéma hmotnostného spektrometru, prevzaté z [17]

2.3.1.1. Hmotnostné spektrá

Pri najčastejšom type ionizácie, elektrónovej, sú plyny bombardované lúčom elektrónov s vysokou energiou, táto hodnota sa zvyčajne pohybuje okolo 70 eV. Lúč je generovaný vláknom z volfrámu, ktorý je vo vákuu. Elektrón, ktorý sa zráža s neutrálnou molekulou, dodáva dostatok energie na odstránenie elektrónu z molekúl: $M + e^- \rightarrow M^{\bullet+} + 2e^-$; kde M je molekula analytu a M^+ je molekulový ión. Práve tieto molekulové ióny sa vyrábajú v rôznych energetických stavoch a ich vnútorná energia sa rozptyľuje fragmentačnými reakciami, čím vznikajú fragmenty s nižšou hmotnosťou, ktoré sami seba ionizujú alebo konvertujú na ióny ďalším elektrónovým bombardovaním [4].

Energia 70 eV je dosť veľká na to, aby došlo ku fragmentácii všetkých molekúl; týmto spôsobom je možné generovať konzistentné spektrá. Pre identifikáciu látok pomocou hmotnostného spektrometra sa používa tzv. full scan mód, kde sú zaznamenávané všetky ióny v určitom rozsahu m/z ; z neho potom obdržime tzv. total ion chromatogram (TIC). Interný softvér nám dovoľuje tieto spektrá porovnávať proti knižnici spektier (napr. NIST, Wiley atď.) a hľadať zhody so zlúčeninami v nich. Aj keď fragmentačný signál predstavuje zlúčeninu, o ktorej v knižnici neexistuje žiaden záznam, je možno si porovnať fragmentačné vzorce so zlúčeninami s podobnými funkčnými jednotkami [3],[16],[18].

2.4. Plynová chromatografia - hmotnostná spektrometria

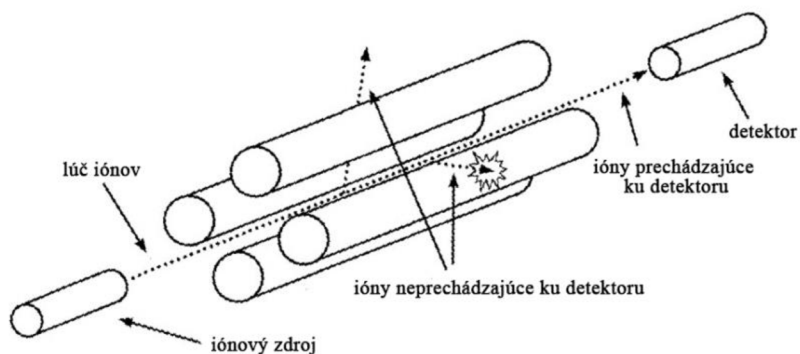
Ak je retenčný čas neznámej zlúčeniny na chromatograme rovnaký ako čistý štandard (za použitia príslušných separačných metód), tak to síce naznačuje, ale nepotvrďuje identitu neznámej látky.

Spojenie dvoch a viac techník tvorí tzv. tandemové techniky. GC-MS je výkonná technika zložená z plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie. Pomocou nich sme schopní overiť si výstup z chromatogramu pomocou hmotnostných spektier. Spojením týchto techník sme schopní oveľa účinnejšie a presnejšie identifikovať zloženie vzorky. Dnes už sú k dispozícii komerčné prístroje, v ktorých sú jednotlivé frakcie vedené priamo z kolóny do hmotnostného spektrometra. Sú bežnou súčasťou forezných a environmentálnych laboratórií [10].

Spojenie plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie sa ukázalo ako veľmi výhodné. Obe metódy majú kompatibilné požiadavky na analyzované zlúčeniny - malá molekulová hmotnosť a malá až stredná polarita. Pri spájaní do techniky GC-MS bolo potreba zaviesť kapilárne kolóny do plynového chromatografu, aby sa predišlo rozdielom v pracovných tlakoch [7].

Oba bloky majú pri tejto technike svoju špecifickú úlohu. Plynový chromatograf separuje vzorku na jednotlivé zložky a hmotnostný spektrometer slúži na identifikáciu. Po separácii látky prejdú do hmotnostného spektrometra, kde nastane ionizácia, hmotnostná analýza a detekcia hmotnostných pomerov iónov m/z , ktoré sú generované z každého analytu. V GC-MS sa používajú dva typy ionizácií – elektrónová, tzv. EI (z anglického electron ionization) a chemická, tzv. CI (z anglického chemical ionization). Výsledné spektrá sme schopní porovnať podľa existujúcej databázy spektier pre dané podmienky [6],[12],[15].

Najčastejším analyzátorom sú lineárne kvadrupóly (viď Obrázok 4) kvôli ich vysokej citlivosti a je možno z nich vyťažiť najviac informácií, či už kvalitatívnych alebo kvantitatívnych. Skladajú sa zo štyroch rovnobežných tyčových elektród a na každú tyč je prívádzaná zložka napätia pohybujúca sa v stovkách V) a zároveň rádiovfrekvenčné pole. Nastavenia hodnôt týchto veličín potom určujú trajektóriu dráh, po ktorých sa medzi tyčami pohybujú ióny s definovanou hodnotou m/z . Ióny s inou hodnotou m/z k detektoru neprejdú až do zmeny nastavenia hodnôt veličín; potom ku detektoru prístupujú ióny s rôznou hodnotou m/z [1],[6].



Obrázok 4: Schéma lineárneho kvadrupólu, prevzaté z [19]

GC-MS našlo svoje využitie pri monitorovaní a sledovaní organických znečisťujúcich látok v životnom prostredí, ako napríklad stanovovanie chlórphenolov vo vode a pôde, herbicídov alebo bezolovnatého benzínu vo vzduchu. Z potravinárskeho hľadiska sa používa na detekciu kontaminantov, pri analýze éterických olejov, vonných látok či meranie zvyškových pesticídov v potravinách a víne. V oblasti medicíny je GC-MS používané pri bioanalýze krvi a moču na prítomnosť barbiturátov, narkotík, anestetík atď., alebo pri vyhodnocovaní moču v diagnostike porúch genetického metabolizmu močovým testom. Z farmaceutického hľadiska je táto technika osvedčená hlavne na kontrolu a zabezpečenie kvality farmaceutických zložiek a je neoddeliteľnou súčasťou lekársko-chemického výskumu. Okrem toho sa bežne využíva i vo (foreznej) toxikológii pri stanovovaní toxínov a jedov a pri stanovovaní dopingových látok v tele športovcov. Menej známe je využitie GC-MS na detekciu výbušných látok na letiskách a využitie stanovenia endokanabinoïdov, ktoré pôsobia na ten istý receptor ako THC [2],[20].

2.4.1. Vyhodnocovanie výsledkov

Vyhodnocovanie výsledkov GC-MS a identifikácia zlúčenín sa obecné vykonáva pomocou dvoch základných stratégií. Prvou stratégiou je použitie štandardov – certifikovaných referenčných materiálov. Mnohé z týchto štandardov nie sú ľahko dostupné a veľa z nich ani nie je k dispozícii. Preto sa ako prístupnejšia javí druhá stratégia, ktorá kombinuje viacero krokov: spojenie retenčných indexov s experimentálnymi hmotnostnými spektrami a porovnanie s tými, ktoré existujú v databázach [4],[7].

Na trhu je dostupných niekoľko softvérov knižníc hmotnostných spektier. Výsledky porovnania nami nameraného spektra s knižnicou sú spravidla usporiadané od najväčšej pravdepodobnosti a pri každom porovnávaní si môžeme pozrieť percentuálnu zhodu. Príkladom je knižnica FFNSC MS, ktorá obsahuje 1827 zlúčenín, alebo program AMDIS so spojením knižnice NIST. Pri porovnávaní retenčných indexov je dôležité si overiť, či boli dodržané správne analytické postupy, napríklad či pri programovom nastavení teploty bol použitý príslušný vzorec na výpočet retenčných indexov podľa van der Doola. Je možno povedať, že vypočítané hodnoty sa považujú za prijateľné, pokiaľ sa líšia od tabelovaných hodnôt pre stacionárne fázy methylsilikónu ± 5 a pre polyethylénglykol ± 10 jednotiek. Presnosť merania je ovplyvňovaná aj prítomnosťou autoinjektora alebo autosamplera. Spôľahlivosť retenčných časov sa zvýšila aj od zavedenia elektronických zariadení na reguláciu tlaku a zlepšenia distribúcie tepla v kolónovej peci [9].

2.5. Mikroextrakcia pevnou fázou

Teória ohľadom SPME, teda solid-phase microextraction, v preklade mikroextrakcia na pevnej fáze, bola prvýkrát spomenutá v 90. rokoch profesorom Januszom Pawliszynom a zároveň ju prvýkrát uviedol do analytickej praxe. S postupom času získala táto metóda

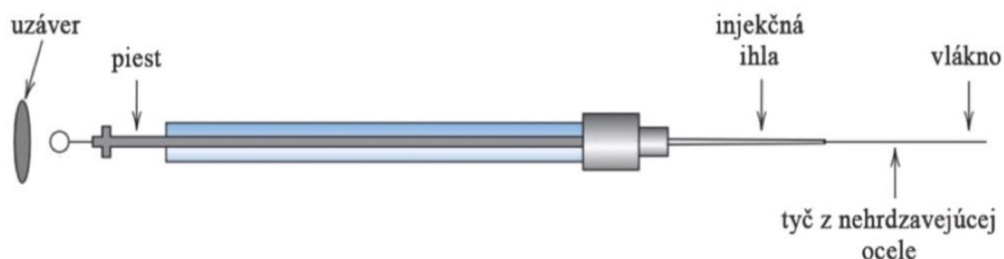
obrovský význam vo vzorkovaní širokého spektra analytov plyných, kvapalných aj pevných skupenstiev s rôznym zložením [21].

V porovnaní s extrakciou rozpúšťadlom je SPME oveľa jednoduchšia a menej pracná. SPME je bezrozpúšťadlová sorpčná/desorpčná metóda a integruje odber vzoriek, extrakciu a koncentráciu analytov, zvyčajne za použitia plynovej chromatografie [22].

HS-SMPE môžeme považovať za vylepšenejšiu variantu SPME. Na odber vzorky je využívaná prchavosť látky a vzorka je naberaná z voľného priestoru nad vzorkou, tzv. headspace, tzn. HS. Pomocou HS-SPME je možno analyzovať napríklad vonné látky, prípadne rôzne iné organické prchavé zlúčeniny. Analyt zo vzorky nie je extrahovaný v najväčšom možnom množstve, ale v koncentracii odpovedajúcej rovnovážnemu stavu [22],[23].

Zariadenie SPME (viď Obrázok 5) je vyrobené z vlákna z taveného oxidu kremičitého, ktoré je potiahnuté tenkou vrstvou (väčšinou je hrúbka v rozmedzí 5 - 100 nm) imobilizovaného polymérneho sorbentu alebo imobilizovanej kvapaliny. Toto vlákno je umiestnené na povrchu ihly, ktorá je vo vnútri injekčnej striekačky [21].

Metóda SPME je v analytickej praxi veľmi často využívaná najmä kvôli nespočetnému množstvu výhod a komerčnej dostupnosti. Medzi tieto výhody patrí napríklad jednoduchosť, krátky čas extrakcie, prevádzka možná i bez rozpúšťadla, možnosť automatizácie, priame spojenie s plynovým chromatografom a celkovo dobré výsledky izolácie stopových množstiev analyzovanej látky. Ako aj iné metódy, aj táto však disponuje istými nevýhodami. Existujú problémy s extrahovaním polárnych analytov zo vzoriek s polárnym zložením a okrem iného samotné vlákno je náchylné ku poškodeniu [3],[21].



Obrázok 5: Schéma SPME vlákna, prevzaté z [4]

2.6. CBD olej

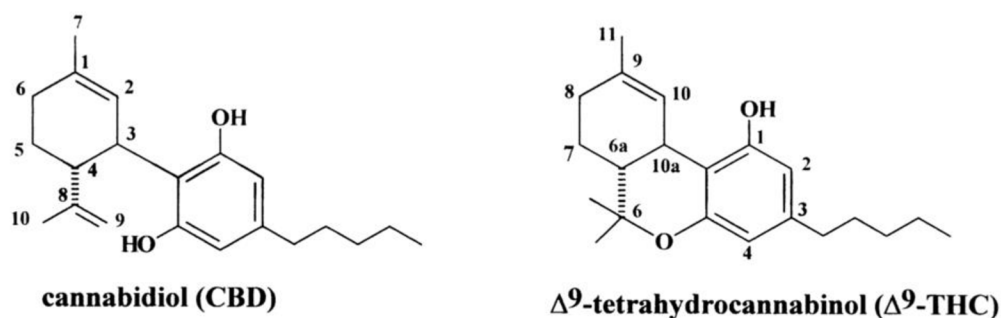
Ako testovacia vzorka pre overenie funkčnosti retenčných indexov bol v tejto práci použitý CBD olej. CBD, celým názvom Cannabidiol, je nepsychotropná látka izolovaná z rastliny *Cannabis sativa* (konope siate). Konope je vo svete ešte stále považované predovšetkým za rekreačnú drogu a užívanie konopných produktov vyvoláva radu

kontroverzie. Zároveň sa ale čím ďalej, tým viac poukazuje na priaznivé účinky látok obsiahnutých v tejto rastline na ľudské zdravie. Výskumy v posledných rokoch naznačujú, že najväčší terapeutický potenciál skrýva látka označovaná ako CBD, ktorá je legálna a na trhu sa aj v Českej Republike predáva predovšetkým vo forme extraktov zmiešaných v olejoch.

Konope obsahuje vyše 60 zložiek - cannabinoidov, ktoré sa rozdeľujú z hľadiska účinnosti na psychoaktívne, aktívne ale nepsychoaktívne a neaktívne. Do skupiny psychoaktívnych zložiek zaraďujeme aj THC, v celej forme Δ^9 -tetrahydrokanabinol. Je to bezdusíkatá látka s tromi uhlíkovými cyklami a dvoma chirálnymi centrami v transfigurácii. Z chemického hľadiska ide o prchavý viskózný olej s dobrou rozpustnosťou v tukoch. Po zahratí nastáva veľmi ľahko dekarboxylácia, rovnako ľahko sa rozkladá po vystavení svetlu, teplu a vzduchu [24],[25].

V poslednej dobe sa farmaceutický výskum a priemysel začal intenzívne zameriavať na jeho pozitívne účinky v liečbe pri mnohých ochoreniach pre jeho nízku až takmer neexistujúcu toxicitu [25].

Štruktúry CBD a THC sa líšia nepatrne, no nomenklatúrou sa líšia oveľa viac, vid' Obrázok 6. Najzásadnejší rozdiel medzi týmito dvoma látkami je pri účinnosti na ľudský organizmus, práve kvôli psychoaktívnym účinkom THC [26].



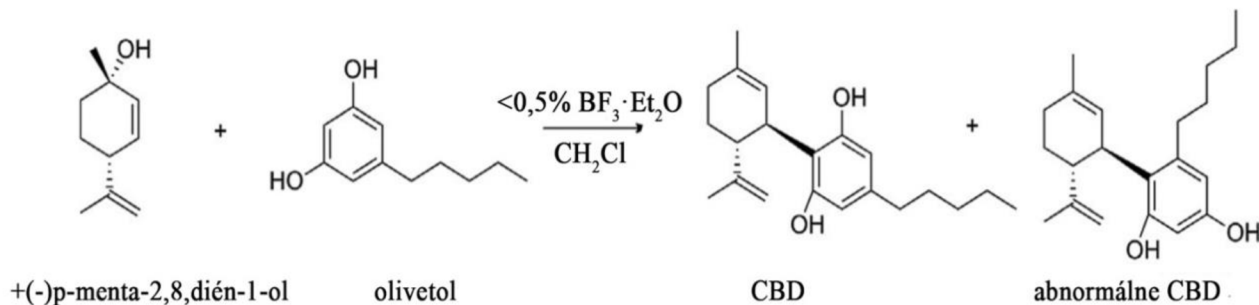
Obrázok 6: Štruktúrny vzorec pre CBD a THC, prevzaté z [26]

Prítomnosť cannabinoidov v ľudskom organizme sa dá stanoviť rôznymi spoľahlivými analytickými a biochemickými metódami z krvi, moču, vlasov a dokonca aj nechťov. Medzi takéto metódy patrí napríklad Elisa, fluorescenčná polarizácia, TLC, HPTLC, GC-MS [24],[27],[28].

Táto látka bola objavená v rozmedzí rokov 1939 až 1945, pričom prvé výskumy účinkov na ľudské zdravie sa začali vykonávať v roku 1970. Účinok CBD sa skúmal napríklad na osobách trpiacich epilepsiou. Celkovo sa experimentu zúčastnilo 15 ľudí, z toho siedmym sa podávalo placebo a zvyšní dobrovoľníci dostávali denne 200 až 300 mg CBD. Výsledky

ukázali, že štyria z ôsmich vykazovali pozitívne účinky počas trvania experimentu, tj. žiadne epileptické záchvaty; traja zaznamenali zlepšenie a jeden nevykazoval žiadne účinky. V neskorších rokoch sa začal výskum orientovať okrem liečby neurologických ochorení aj na choroby psychického charakteru. Od roku 2018 je Americkým úradom pre potraviny a liečivá (FDA) schválené použitie extraktu z kanabisu ako liečby epileptických záchvatov, zároveň spojených s Lennox-Gastautovým alebo Dravetovým syndrómom pre osoby staršie ako 2 roky [29],[30].

Syntéza CBD prebieha najčastejšie z olivetolu, čo je recorzinol, ktorý má na postrannom reťazci pentyl. Táto konkrétna metóda syntézy sa začína pôsobením lítia na 1,3-dimetoxy-olivetol, tento krok nasleduje adícia gerenialu. Po tejto adícii nasleduje proces cykлизácie pomocou tosylchloridu a nakoniec sa takto vytvorená zlúčenina demetyluje pomocou jodidu metylmagnézia. Táto metóda syntézy sa osvedčila ako veľmi nepraktická; vzniká racemická zmes a výťažok trans-cannabidiolu je veľmi nízky. Kvôli stereoselektivite sa vo syntéze CBD osvedčila metóda, pri ktorej kondenzuje olivetol s (+/-)-p-menta-2,8-dién-1-olom za prítomnosti slabej kyseliny, konkrétne formamid acetálu. Ešte lepší výťažok však dostaneme, ak namiesto formamidu acetálu využijeme Friedel-Craftsovu reakciu éterátu fluoridu boritého; pričom však vzniká aj abnormálne CBD (Abn-CBD). Vzniku tohto štruktúrneho izoméru sa dá predísť tak, že sa použije oxid hlinitý a výťažok z tejto syntézy sa pohybuje v okolí 41% kryštalickej látky a 55% vo forme chromatograficky čistého oleja [25],[26],[31].



Obrázok 7: Syntéza CBD, prevzaté z [25]

CBD vykazuje pozitívne účinky na ľudí trpiacich úzkostnými poruchami, dokonca viac než liek Diazepam, patriaci medzi benzodiazepíny. Okrem toho sa využívajú jeho antipsychotické účinky. Medzi psychotické poruchy sa radí aj schizofrénia, na ktorej bol tiež vedený výskum účinnosti CBD. Ukázalo sa, že pri podávaní množstva 1,5 g na 1 kg pacienta sa účinnosť CBD vyrovná účinnosti haloperidolu. Vo veľkom sa využíva aj ako alternatíva liečenia závislostí na iných drogách, napríklad na marihuane [32].

Užívanie CBD sa osvedčilo aj pri onkologických pacientoch. Vedľajšie účinky chemoterapie sú okrem iného nauzea a zvracanie po dobu niekoľko dní, spôsobené pôsobením

silných chemických látok na organizmus pacienta. Okrem toho zmiernuje aj silné bolesti pri metastázach [32].

Okrem pozitívnych recenzií na vplyv na ľudský organizmus má CBD využitie aj v analytickom smere. Ak ho použijeme v báze za prítomnosti kyslíku, tak oxiduje na monoméne a dimérne hydroxychinóny. Ich anióny majú tmavofialovú farbu; a toto tvorí základ Beamovej reakcie používanej na identifikáciu CBD v látke [26],[29].

Je možno tvrdiť, že sa CBD v posledných rokoch teší veľkej obľube. V Spojených Štátoch Amerických je táto látka vo väčšine štátov plne legalizovaná a dekriminalizovaná. V Českej Republike je CBD momentálne plne legálne, čo umožňuje mnoho výrobcov jeho produkciu. Je preto dôležité si kvôli prítomnosti iných látok, pred užitím overiť zloženie akéhokoľvek produktu obsahujúceho CBD [33].

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

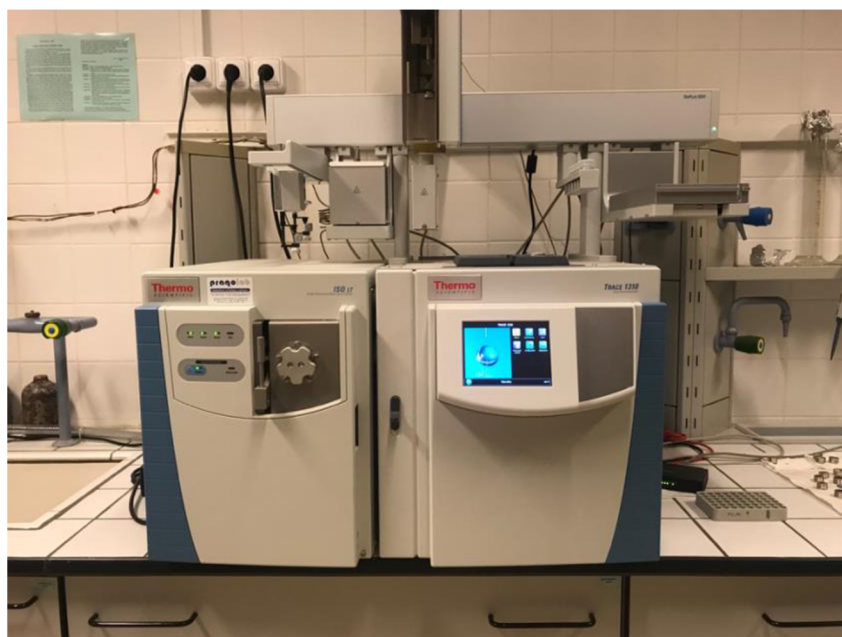
3.1. Laboratórne vybavenie a chemikálie

3.1.1. Plyny

Ako nosný plyn sa využíval Hélium s čistotou 4.8, ktorý bol umiestnený v tlakovej fľaši s redukčným ventilom od SIAD Česká Republika.

3.1.2. Prístroje

- Plynový chromatograf Trace™ 1310 s injektorom s možnosťami split/splitless (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostný detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knižnica spektrier NIST/EPA/NIH, verzia 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)



Obrázok 8: Plynový chromatograf Trace™ 1310 s hmotnostným detektorom ISQ™ LT

3.1.3. Pracovné pomôcky

- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
- Mikropipety BiohitProloine (objem 100 - 1000 μm), špičky
- Vialky s objemom 10 ml so skrutkovacím magnetickým uzáverom
- Bežné laboratórne sklo a pomôcky

3.1.4. Chemikálie

Na stanovenie retenčných indexov bol použitý štandard homologickej rady n-alkánov (C₈ - C₂₀) v hexáne (~40 mg·l⁻¹) (Sigma Aldrich, Nemecko).

3.2. Analyzovaná vzorka

Ako testovacia vzorka pre overenie retenčných indexov bol použitý CBD olej, zakúpený v bežnej trhovej sieti (CBDepot, Česká Republika).

Vzorka má konštitučný názov 2-[(1R,6R)-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzén-1,3-diol.

Tabuľka 2: Zloženie vzorky CBD oleja

zložky	koncentrácia [%]	zdravotné riziká
prípravok na ochutenie konope (THC-free) - 50% z toho:	20	podozrenie z poškodenia plodnosti alebo nenarodeného dieťaťa
(-)-trans-Cannabidiol	50	podozrenie z poškodenia plodnosti alebo nenarodeného dieťaťa
Glyceridy, zmiešaný dekanoyl a oktanoyl	80	podľa registrácií REACH, neboli klasifikované žiadne riziká

Výrobca v príbalovom letáku uvádza, že zložka na ochutenie je viaczložková látka typu UVCB podtyp číslo 3; označenie UVCB sa používa pre látky, ktorých zdroj je biologický a proces je zdokonalenie neznámeho alebo premenlivého zloženia, komplexných reakčných produktov alebo biologických materiálov, z anglického jazyka Unknown or Variable composition, Complex reactions products or Biological materials. Výrobca ďalej uvádza, že vzorka bola získaná z častí rastliny *Cannabis sativa* L., čo je priemyselné konope získané pomocou extrakcie rozpúšťadlom a následnou frakcionáciou. Vo vzorke by sa nemal nachádzať žiadny podiel tetrahydrocannabinolu (THC).

3.3. Použitá metóda HS-SPME-GC-MS

3.3.1. Podmienky HS-SPME extrakcie

- Doba inkubácie (temperovania) 10 minút
- Doba extrakcie 20 minút
- Teplota extrakcie a inkubácie (teplota agitátoru) 40 °C

- Agitátor zapnutý 5 sekúnd, vypnutý 60 sekúnd
- Množstvo vzorky 3 ml
- Hĺbka ponorenia vlákna do vialky 20 mm

3.3.2. Podmienky GC-MS analýzy

- Kapilárna kolóna TG–WaxMS (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm)
- Teplota injektora (desorpcie) 240 °C
- Doba desorpcie 20 minút
- Splitless dávkovanie, ventil uzatvorený 10 minút
- Hĺbka ponorenia vlákna do injektora 40 mm
- Nosný plyn hélium, prietok 1 ml·min⁻¹
- Teplotný program 40 °C s výdržou 1 minúta, vzostupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdržou 22 minút, celková doba analýzy 60 minút
- Hmotnostný detektor v móde EI, energia ionizačných elektrónov 70 eV, teplota iónového zdroja 200 °C, skenovací rozsah m/z 30-370 amu, rýchlosť skenovania 0,2 sekundy

3.3.3. Identifikácia a kvantifikácia prchavých látok

Prchavé látky vo vzorkách boli identifikované pomocou Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) na základe porovnania hmotnostných spektier s dostupnou knižnicou spektier a overenie výpočtom retenčných indexov. Obsah identifikovaných zlúčenín je vyjadrený semikvantitatívne pomocou plôch príslušných píkov na chromatograme.

3.4. Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky boli spracované pomocou programu Microsoft Office Excel 2016. Vzorka aj štandard boli merané trikrát (n=3).

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hlavným cieľom tejto práce bolo určiť retenčné indexy pre stanovenie prchavých látok pomocou metódy HS-SPME-GC-MS. Táto metóda je na ústave už pomerne dlho zavedená a často používaná, predovšetkým na sledovanie profilu a obsahu tzv. aromaticky aktívnych látok v potravinových aj nepotravinových matriciach.

Vonné (aromaticky aktívne) sú látky, ktoré pôsobia na čuchové receptory človeka a vyvolávajú tak dojem vône. Sú to väčšinou málo polárne alebo nepolárne prchavé látky ($M_r < 300$).

Z chemického hľadiska môžeme vonné látky nájsť prakticky v každej skupine organických zlúčenín. Významnými vonnými látkami sú niektoré uhľovodíky, väčšina vonných látok však obsahuje v molekule kyslík (alkoholy, étery, aldehydy, ketóny, kyseliny, estery, atď.), dusík (napríklad amíny, dusíkaté heterocykly), síru (thioly, sulfidy, sírne heterocykly).

V prírodných materiáloch ich doposiaľ bolo identifikovaných a popísaných cca 7000. Vôňa (aróma) potravín alebo obecné prírodných materiálov, je tvorená veľkým počtom týchto látok, môže ísť o kombináciu niekoľko desiatok až stoviek zlúčenín, nachádzajúcich sa vo veľmi nízkych koncentráciách ($\mu\text{g} - \text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Pri sledovaní aromatického profilu každého materiálu je teda nevyhnutné použiť vysoko citlivú metódu, dosiahnuť dokonalejšiu separáciu jednotlivých zložiek, čo najpresnejšiu identifikáciu a kvantifikáciu jednotlivých zlúčenín. V súčasnosti je jednoznačne najúčinnjšia a najpoužívanejšia metóda pre stanovenie vonných látok GC-MS, ktorá s výhodou využíva ich prchavosť [20].

Táto práca je zameraná predovšetkým na možnosti identifikácie. Ako už bolo zmienené, identifikácia analytu je založená na porovnaní hmotnostných spektier s knižnicou spektier, prípadne na interpretácii spektier. Aj napriek tomu, že GC-MS je pri identifikácii veľmi účinná, môžu nastať prípady, kedy nepodá jednoznačný výsledok. Preto je identifikácia dopĺňovaná stanovením retenčných indexov a identifikáciou látok podľa databáz retenčných indexov [9],[12],[13].

4.1. Stanovenie retenčných indexov

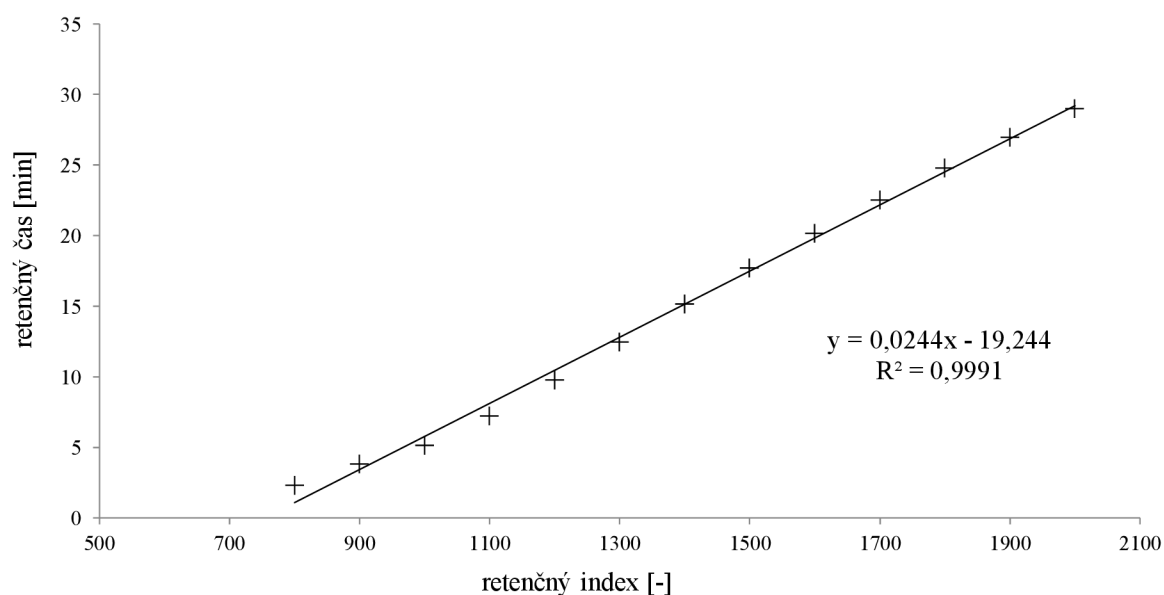
Pre stanovenie retenčných indexov bola použitá homologická rada n-alkánov ($C_8 - C_{20}$), tento zmesný štandard bol podrobený analýze metódou HS-SPME-GC-MS (viď kapitola 3.3). Analýza bola vykonaná trikrát, pre ďalšie výpočty bol použitý priemer ($n = 3$).

Získané retenčné časy jednotlivých alkánov sú zhrnuté v Tabuľka 3 a tieto potom boli použité pre výpočet retenčných indexov prchavých látok.

Tabuľka 3: Zhrnutie vlastností použitých štandardov n-alkánov

n-alkán	M_r [g·mol ⁻¹]	bod varu [C°]	t_R [min]	RI
C ₈	114,23	125	2,28	800
C ₉	128,20	151	3,80	900
C ₁₀	142,29	174	5,15	1000
C ₁₁	156,31	195	7,21	1100
C ₁₂	170,33	216	9,78	1200
C ₁₃	184,37	234	12,46	1300
C ₁₄	198,39	253	15,12	1400
C ₁₅	212,42	270	17,70	1500
C ₁₆	226,41	286	20,17	1600
C ₁₇	240,48	302	22,53	1700
C ₁₈	254,49	317	24,78	1800
C ₁₉	268,52	330	26,94	1900
C ₂₀	282,56	343	29,00	2000

M_r - molekulová hmotnosť, t_R - retenčný čas, RI - retenčný index



Graf 1: Kalibračná krivka zmesného štandardu n-alkánov

Z chromatogramu zmesného štandardu nebolo možné pravdepodobne kvôli prítomnosti hexánu ako rozpúšťadla identifikovať píky chromatogramu prvých troch zlúčenín, konkrétne: oktánu, nonánu a dekánu. Dôvodom bola zrejme nižšia teplota varu hexánu, ktorý ako prchavá

látka zaclonil píky týchto zlúčenín, čím nebolo možné tieto píky vyhodnotiť. Keďže pre výpočet retenčných indexov bolo však nutné poznať retenčné časy týchto zlúčenín, bola i potreba zhotoviť kalibračnú krivku.

Hodnoty retenčných časov sa zvyšujú lineárne so stúpajúcim počtom uhlíkov zlúčeniny, resp. so stúpajúcim retenčným indexom; preto bolo možné vytvoriť lineárnu spojnicu. Kalibračná krivka bola zhotovená ako závislosť retenčných časov na retenčných indexoch. Retenčné časy neidentifikovaných štandardov boli dopočítané z rovnice kalibračnej krivky.

Retenčné časy dopočítaných zlúčenín boli následne použité aj vo výpočtoch retenčných indexov zlúčenín v neznámej vzorke.

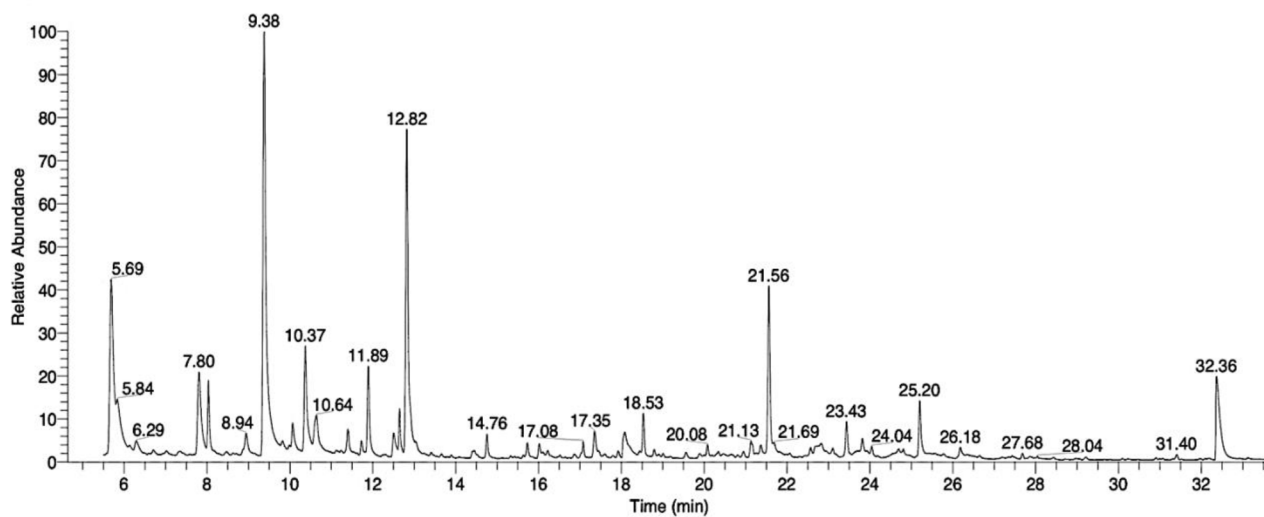
4.2. Identifikácia a kvantifikácia prchavých látok v CBD oleji

Retenčné indexy by mali byť použiteľné pre identifikáciu zlúčenín v akejkol'vek vzorke, v tejto práci bola ich funkčnosť overená pomocou vzorky CBD oleja.

Vzorka CBD oleja bola analyzovaná za rovnakých podmienok, ako zmes alkánov. Identifikácia prchavých látok vo vzorke bola vykonaná na základe porovnania hmotnostných spektier s dostupnou knižnicou spektier a potvrdená výpočtom retenčných indexov.

Vzhľadom k tomu, že použitá metóda HS-SPME-GC-MS je založená na analýze s použitím programovaného zvyšovania teploty kolóny v priebehu analýzy (v rozmedzí 40 - 220 C°), pre výpočet retenčných indexov bola použitá rovnica (6) podľa van der Doola a Kratza.

Prehľad všetkých identifikovaných zlúčenín vo vzorke a vypočítané retenčné indexy pre všetky identifikované zlúčeniny sú uvedené v Tabuľka 4. Vypočítané retenčné indexy boli následne porovnané s tabelovanými hodnotami retenčných indexov, meraných na obdobnej kolóne (polárna stacionárna fáza - polyethylénglykol) vid' Tabuľka 4 [13]. Pre porovnanie bola použitá chemická databáza PubChem [34] a práca Babushok a kol. [13], ktorá uvádza prehľadnú tabuľku RI najdôležitejších zložiek esenciálnych olejov pre tri typy bežne používaných stacionárnych fáz - nepolárnu, mierne polárnu a polárnu, a ďalej práca Bianchi a kol. [35], ktorá uvádza tabuľku RI celkom 250 prchavých látok na polárnej kolóne.



Obrázok 9: Chromatogram CBD oleja; identifikácia píkov vid' Tabuľka 4

Tabuľka 4: Prehľad prchavých látok identifikovaných vo vzorke CBD oleja

Názov zlúčeniny	Chemická klasifikácia	t _R [min]	Faktor zhody	RI vypočítaný	RI tabelovaný	Δ RI	Tabelovaný 90% interval spoľahlivosti RI	Literárny zdroj
α-Pinen	terpén	5,62	934	1022,7	1025,4	2,7	1008-1039	[13]
β-Pinen	terpén	7,63	935	1116,3	1110,0	6,3	1085-1130	[13]
3-Carén	terpén	8,71	872	1158,4	1146,8	11,6	1122-1169	[13]
β-Myrcén	terpén	9,13	968	1174,7	1167,0	7,7	-	[35]
methyl hexanoát	ester	9,81	921	1201,1	1184,6	16,5	1172-1202	[13]
limonén	terpén	10,07	908	1210,8	1198,2	12,6	1178-1219	[13]
β-Phellandrén	terpén	10,32	828	1220,1	1209,3	10,8	1188-1233	[13]
trans-β-ocimén	terpén	11,05	882	1247,4	1250,4	3,0	1232-1267	[13]
γ-Terpinén	terpén	11,35	908	1258,6	1245,0	13,6	1238-1255	[13]
cis-β-Ocimén	terpén	11,51	930	1264,6	1250,4	14,2	1232-1267	[13]
o-cymén	alkylbenzén	12,08	930	1285,8	-	-	1248-1310	[13]
terpinolén	terpén	12,37	952	1296,6	1282,4	14,2	1261-1300	[13]
sulkatón	ketón	13,91	876	1354,5	1336,9	17,6	1317-1357	[13]
tetradekán	uhl'ovodík	15,13	931	1400,4	1400,0	0,4	-	[35]
methyl oktanoát	ester	15,22	934	1403,9	1388,8	15,1	1375-1410	[13]
nonanál	aldehyd	15,38	909	1410,1	1391,5	18,6	1370-1414	[13]
ethyl oktanoát	ester	16,35	925	1447,7	1434,9	12,8	1416-1458	[13]

Tabuľka 4: Prehľad prchavých látok identifikovaných vo vzorke CBD oleja - pokračovanie

p-cymenén	aromatický uhľovodík	16,61	924	1457,8	1456	1,8	1412-1457	[13],[37]
kyselina octová	karboxylová kyselina	17,19	937	1480,2	1480,0	0,2	1408-1479	[13],[35]
2-ethyl-hexanol	alkohol	17,74	949	1501,6	1487,9	13,7	1452-1513	[13]
dekanál	aldehyd	18,07	874	1515,0	1495,9	19,1	1471-1516	[13]
gáfor	terpén	18,64	880	1538,1	1531	7,1	1481-1537	[13],[36]
benzaldehyd	aldehyd	18,98	912	1551,8	1520	31,8	1481-1555	[13]
linalool	terpénový alkohol	19,20	887	1560,7	1547,0	13,7	1507-1564	[13]
α -bergamotén	terpén	20,14	938	1598,8	1591,0	7,8	-	[38]
karyofylén	terpén	20,50	874	1614,0	1598,5	15,5	1569-1632	[13]
ethyl dekanoát	ester	21,37	841	1650,8	1648	2,8	1616-1644	[13],[39]
levomentol	terpén	21,50	903	1656,4	1652,0	4,4	1599-1651	[13],[40]
cis- β -farnesén	terpén	22,02	829	1678,4	1659,0	19,4	-	[41]
furfurylalkohol	alkohol	22,10	863	1681,8	1656,3	25,5	1618-1688	[13]
β -humulén	terpén	22,25	938	1688,1	1673,2	14,9	1660-1689	[13]
anethol	éter	25,95	825	1854,2	1847	7,2	1802-1846	[13],[42]
benzylalkohol	aromatický alkohol	26,96	881	1917,7	1912,0	5,7	1821-1905	[13],[43]
1-dodekanol	alkohol	28,58	946	1979,6	1959,3	20,3	1924-1980	[13]
kyselina oktánová	karboxylová kyselina	30,62	926	2065,3	2057,1	8,2	2011-2089	[13]

Tabuľka 4: Prehľad prchavých látok identifikovaných vo vzorke CBD oleja - pokračovanie

p-vinylguaiacol	ester	33,35	896	2180,0	2185,6	5,6	2145-2219	[13]
ethyl hexadekanoát	ester	34,07	806	2210,7	2215,0	4,3	-	[44]
n-dekánová kyselina	karboxylová kyselina	34,64	905	2235,1	2273,7	38,6	2227-2301	[13]
						priemerná hodnota Δ RI	12,04	

Priemerná hodnota Δ RI bola vypočítaná ako podiel rozdielu sumy všetkých rozdielov nameranej a tabelovanej hodnoty RI a n , kde n je počet všetkých identifikovaných zlúčenín.

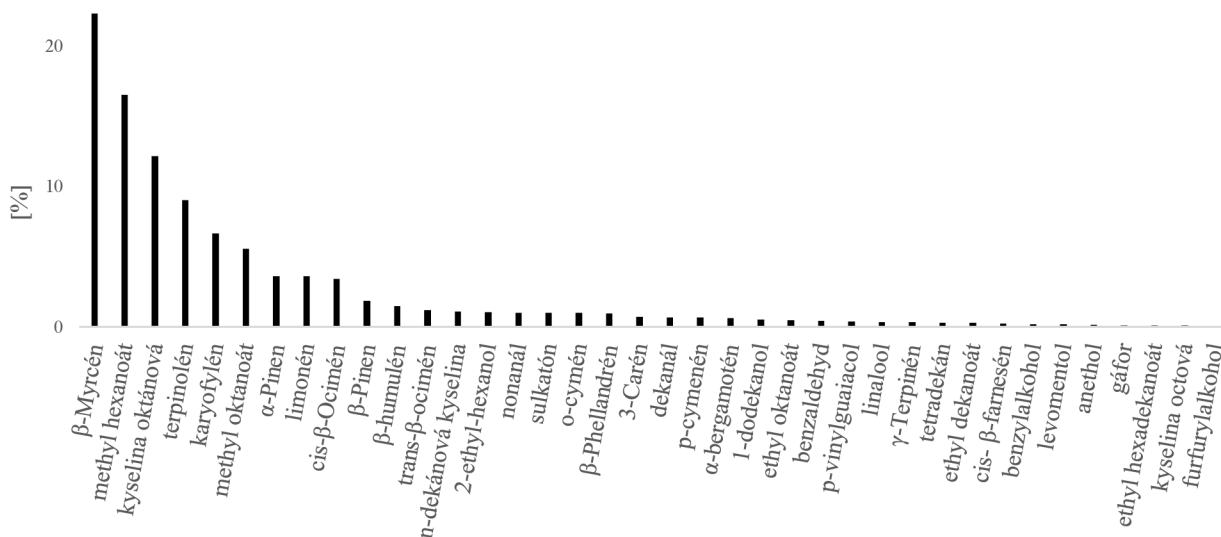
Pri 48,65 % zlúčeninách sa namerané a vypočítané hodnoty retenčných indexov veľmi približovali ku priemernej tabelovanej hodnote. Za také považujeme zlúčeniny, ktoré majú rozdiel nameranej a tabelovanej hodnoty ΔRI menší ako je priemerná hodnota ΔRI . Rozdiel nameranej a tabelovanej hodnoty ΔRI je uvedený v Tabuľka 4. Pri 81,81% zlúčenín namerané hodnoty spadali do rozmedzia 90% intervalu spoľahlivosti a z toho 22,23% zlúčenín spadalo zároveň do rozmedzia 50% intervalu spoľahlivosti, tak ako ich vo svojej prehľadnej práci uvádza Babushok a kol. [13]. Celkovo do rozmedzia 50% intervalu spoľahlivosti spadalo 26,08% zlúčenín. Hodnoty intervalov spoľahlivosti sú založené na počte dostupných údajových záznamov [13].

Päť zlúčenín, konkrétne: β -myrcén, tetradekán, α -bergamotén, cis- β -farnesén a ethyl hexadekanoát neboli evidované v databáze v práci Babushok a kol. [13]. Tým pádom nebolo možné určiť, či spadajú do rozmedzia intervalov spoľahlivosti 50% alebo 90%. Hodnoty retenčných indexov však boli porovnané s inými prácami z chemickej databázy NIST. Zlúčeniny β -myrcén a tetradekán boli porovnané s nameranými hodnotami podľa práce Bianchi a kol. [35], α -bergamotén s prácou Sagrero-Nieves a kol. [38], cis- β -farnesén s prácou Gancel a kol. [41] a ethyl hexadekanoát s prácou Chung a kol. [44]. Na porovnávanie boli vybrané tie merania, ktoré boli merané na polárnej fáze a podmienkou taktiež bolo neizotermné meranie.

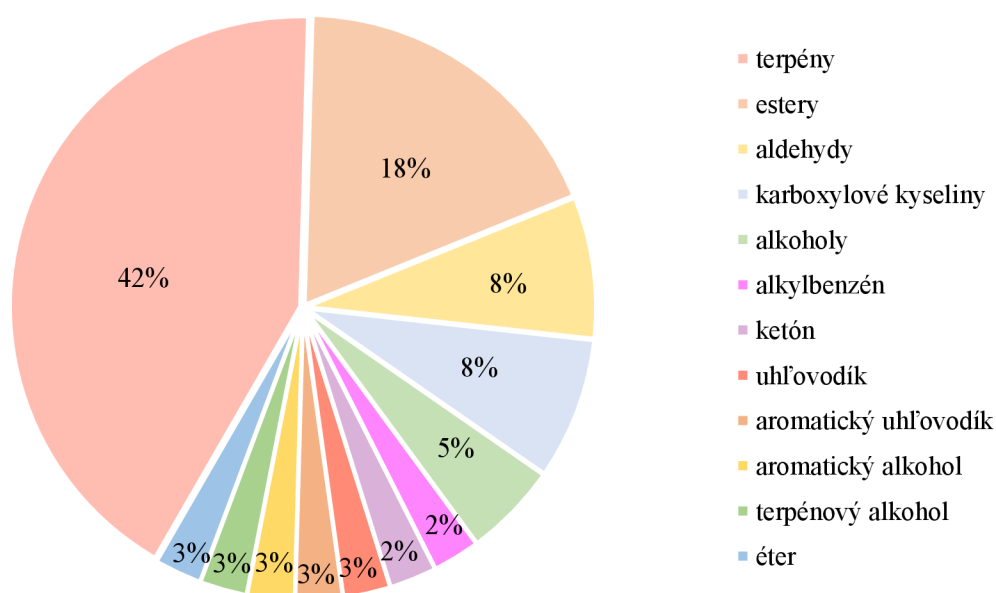
Niektoré zlúčeniny, konkrétne 24,25% zlúčenín nespádali do žiadneho intervalu spoľahlivosti podľa databázy v práci Babushok a kol. [13], bola však nájdená zhoda s inými prácami, napríklad Bianchi a kol. pre p-cymenén [37], Bianchi a kol. pre kyselinu octovú [35], Kundakovic a kol. pre gáfor [36], Gürbüz a kol. pre ethyl dekanóat [39], Choi a kol. pre levomentol [40], Wong a kol. pre anethol [42] a Qian a kol. pre benzylalkohol [43].

Zellner a kol. [9] uvádzajú, že v prípade polárnej kolóny je retenčný index výrazne závislý na teplote, preto sa môžu retenčné indexy líšiť od tabelovaných hodnôt až v desiatkach jednotiek, cca 10 – 50 je považované za prijateľnú presnosť. Pokiaľ vezmeme v úvahu hodnoty ΔRI v Tabuľka 4 (všetky < 40), môžeme považovať identifikáciu všetkých uvedených zlúčenín za potvrdenú.

Na základe plôch ktoré zaujímali jednotlivé píky vo výslednom chromatograme CBD oleja bol vyhodnotený podiel látok vo vzorke (viď Obrázok 10).



Obrázok 10: Identifikované zložky CBD oleja zostupne zoradené podľa kvantity vo vzorke



Obrázok 11: Percentuálne zastúpenie látok vo vzorke CBD oleja na základe príslušnosti k chemickej skupine látok, vychádzajúc z Tabuľka 4

Ako je jasné z Obrázok 11, väčšinu, konkrétne 42% identifikovaných látok v CBD oleji klasifikujeme do skupiny terpénov. Terpény sú prchavé, lipofilné látky odvodené od základnej izoprénovej jednotky 2-methyl-1,3-butadiénu, ktorá tvorí uhlíkovú kostru, preto sa terpény označujú ako izoprenoidy. V prírode sa najčastejšie vyskytujú ako uhl'ovodíky, alkoholy a ich glykozidy, étery, aldehdy a ketóny, karboxylové kyseliny a estery, pričom v súčasnej literatúre je ich známych asi 30 000. Využívajú sa na výrobu jemných parfumov, na zjemnenie arómy a vône potravín a nápojov a na výrobu liekov rastlinného pôvodu [45].

Ako už bolo spomenuté v kapitole 3.2, CBD olej bol zhotovený z rastliny *Cannabis sativa*. Všetky identifikované prchavé látky (terpény) sa nachádzajú práve v tejto rastline, pričom ich celkový počet v nej presahuje 100. Sú zodpovedné primárne za vôňu a sekundárne i za chuť tejto rastliny. V koreňoch, listoch a kvetinách rastliny boli identifikované predovšetkým mono- (napríklad limonén, terpinolén alebo myrcén) a seskviterpény (napríklad karyofylén alebo humulén). Dôležité je si však uvedomiť, že v samčej a samičej časti rastliny sa môžu nachádzať iné terpény a to aj vďaka tomu, že samičia odroda narozdiel od samčej produkuje šišky. V Tabuľka 5 je pre zaujímavosť uvedený popis arómy a vlastností najvýznamnejších terpénov identifikovaných v CBD oleji [46].

V rámci vykonanej literárnej rešerše nebola nájdená práca, ktorá by analyzovala vzorku CBD oleja na polárnej fáze pri rovnakých podmienkach. Keďže CBD olej je vyrobený z rastliny *Cannabis sativa*, tak možno predpokladať, že pri GC-MS analýze vzorky tejto rastliny boli identifikované totožné, prípadne obdobné zlúčeniny. Podľa práce Rothschild a kol. [47] sa všetky terpény a ich alkoholy identifikované v našej vzorke zhodujú so zlúčeninami identifikovanými v tejto práci. Zlúčeniny, ktorými sa naše výsledky odlišovali boli najčastejšie uhl'ovodíky a hydroxylové zlúčeniny a ich deriváty. Toto je pravdepodobne spôsobené tým, že v našej vzorke sa okrem látok prítomných aj v *Cannabis sativa* nachádzali aj látky, ktoré môžu pôsobiť ako ochucovadlá alebo rôzne konzervanty. Analýza tejto práce prebiehala taktiež na polárnej fáze pri neizotermálnej analýze [47].

Tabuľka 5: Najvýznamnejšie terpény a ich deriváty identifikované v CBD oleji a ich vlastnosti a využitie [45],[48],[49],[50],[51]

Zlúčenina	Aróma a chuť	Účinky a využitie	Výskyt
β -Myrcén	zemitá, pripomína klinčeky	sedatívne, protizápalové, relaxačné	éterický olej z tymianu, mango, chmeľ
terpinolén	drevitá	antibakteriálne, antimikrobiálne	šalvia, rozmarín, ihličnaté stromy
karyofylén	bylinná, korenistá	antiseptické, protirakovinové, protizápalové, topické látky	čierne korenie, škorica, chmeľ
α - a β -pinen	borovicová	protizápalové, protirakovinové, ochucovadlo, biopalivo, insekticídy	borovice, rozmarín, bazalka, petržlen
limonén	citrusová	anxiolytické, antibakteriálne, protizápalové, antioxidačné	citrón, pomaranč, limeta,
cis- β - a trans- β -ocimén	drevnatá, sladká	antimykotické, antivírusové, insekticídy, antiperspiranty, šampóny, mydlá	petržlen, mango, kumquat
β -humulén	zemitá, drevnatá, korenistá	protizápalové, prírodné antibiotikum, protialergické, protinádorové, podporuje apetít	chmeľ, ženšen, koriander,
β -Phellandren	vôňa pomarančovej šťavy	antifungálne, protizápalové, analgetikum, čínska medicína, výroba parfumov	fenikel, zázvorová tráva, škorica, mäta levanduľa, kôpor, borovica
3-Carén	sladká citrusová, štiplavá	protizápalové, posilňuje kosti, podporuje pamäť kozmetické výrobky, parfumy	terpentín, rozmarín
α -bergamotén	-	feromóny hmyzu	mrkva, citrón, kumquat
linalool	príjemná kvetinová,	antimikrobiálne, sedatívne, protizápalové, protistresové aromatické činidlo, ochucovadlo, šampóny, mydlá,	levanduľa, ružové drevo, vavrín, sladká bazalka,
γ -Terpinén	pikantná	antimykotikum, antioxidačné, antiseptické, antibakteriálne	kardamón, majoránka, eukalyptus
gáfor	výrazná aróma	anestetické, antimikrobiálne, balzamovacia tekutina prísada do varenia	rozmarín, mäta

V identifikovaných prchavých látkach sa okrem terpénov nachádzali aj osem a desať uhlíkaté zlúčeniny ako tetradekán, metyl oktanoát, ethyl oktanoát, dekanál, ethyl dekanoát a 1-dodekanol. Toto môže byť spôsobené tým, že vo vzorke bol prídavok glyceridov, oktanoylu a dekanoylu, ako vidno v Tabuľka 2. Keďže dekanoyl a hexanoyl sú derivátmi príslušných kyselín, je možné, že vo vzorke sa tieto zlúčeniny rozložili a vznikli estery alebo alkoholy príslušných kyselín.

Prítomnosť kyseliny octovej v tejto vzorke je pravdepodobne kvôli tomu, že organické kyseliny sa bežne pridávajú do éterických olejov na zvýšenie účinnosti oleja. Inak povedané, ak má mať esenciálny olej antimikrobiálny účinok, prídavok kyseliny octovej tento účinok výrazne podporí. Okrem toho je známe, že kyselina octová inhibuje rast rôznych mikroorganizmov. Antimikrobiálne účinky kyseliny octovej práve podporujú zložky esenciálneho oleja. O takomto obojstrannom účinku hovoríme ako o synergickom [52].

Ako vidno v Tabuľka 2, jednou z hlavných zložiek je prípravok na dochutenie konope. Medzi identifikované zložky vo vzorke CBD, ktoré slúžia na dochutenie, patrí napríklad anethol alebo p-vinylguaiacol. Tieto dve zložky majú sladkú, jablkovú chuť [53].

5. ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo potvrdiť možnosť identifikácie prchavých látok vo vzorke pomocou výpočtov retenčných indexov. Pre stanovenie bola použitá metóda HS-SPME-GC-MS.

Teoretická časť sa zameriavala na ozrejenie pojmov ako napríklad retenčný čas a retenčný index a s tým súvisiace vysvetlenie dvoch analytických metód a ich spojeniu do tandemovej techniky GC-MS; a hlavne na priebeh vývoja vzorcov na výpočet retenčných indexov až po van der Doolov a Kratzov vzorec. Zameriavala sa i na predstavenie nami zvolenej vzorky, CBD oleja, jeho chemicko-fyzikálnych vlastností a jeho využitie.

V experimentálnej časti bakalárskej práce bol overený vzorec výpočtu retenčných indexov podľa van der Doola a Kratza na vzorke CBD oleja. V prvom kroku sa homologická rada n-alkánov podrobila analýze GC-MS. Následne bol pomocou ich hodnôt retenčných časov dopočítaný retenčný index pre každú zlúčeninu, ktorá bola identifikovaná vo vzorke CBD oleja.

Vo vzorke CBD oleja sa podarilo identifikovať 38 prchavých zlúčenín, z kvantitatívneho hľadiska tvorili najvýznamnejšiu časť terpény. Vypočítané retenčné indexy boli nasledovne porovnané s priemernými tabelovými hodnotami retenčných indexov oných zlúčenín. Naša celková odchýlka Δ RI bola 12,04. 81,81% zlúčenín sa nachádzalo v rozmedzí 90% intervalu spoľahlivosti a z toho 22,23% zlúčenín spadalo zároveň do rozmedzia 50% intervalu spoľahlivosti.

Ako bolo už zmienené, GC-MS je pomerne veľmi účinná pri identifikácii zlúčenín, samotné porovnávanie hmotnostných spektier s knižnicou spektier však nemusí vždy podať jednoznačný výsledok. Výsledky tejto práce ukazujú, že výpočet retenčných indexov je jednoduchý, univerzálne použiteľný spôsob, ako doplniť a potvrdiť identifikáciu prchavých látok vo vzorke.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

- [1] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [2] SMOLKOVÁ, Eva a Ladislav FELTL. *Analýza látek v plynném stavu*. Praha: SNTL, 1991.
- [3] W., Vetter. Current Use of Gas Chromatography and Applications. *Analytical Separation Science*. 2015, **3**. DOI: 10.1002/9783527678129.assep026.
- [4] CHRISTIAN, Gary D. *Analytical chemistry*. 6th ed. Hoboken: Wiley, c2004. ISBN 04-712-1472-8.
- [5] WANG, Xiao-Liang, Ming-Xu ZHANG, Kun-Zhi LIU a Xi-Ming SUN. Temperature Control of Gas Chromatograph Based on Switched Delayed System Techniques. *Mathematical Problems in Engineering*. 2014, **2014**, 1-5. DOI: 10.1155/2014/367629. ISSN 1024-123X.
- [6] XINGHUA, Huo a Lankmayr ERNST. Hyphenated Techniques in Gas Chromatography. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. Graz University of Technology, Austria: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0298-4.
- [7] STASHENKO, Elena a Jairo REN. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Advances in Gas Chromatography*. InTech, 2014, 2014-02-26. DOI: 10.5772/57492. ISBN 978-953-51-1227-3. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-gas-chromatography/gas-chromatography-mass-spectrometry>
- [8] FEREBAUEROVÁ, Markéta. *Využití separačních metod v analýze léčiv II*. Hradce Králové, 2009. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce PharmDr. Radim Kučera Ph.D.
- [9] ZELLNER, Barbara d'Acampora, Carlo BICCHI, Paola DUGO, Patrizia RUBIOLO, Giovanni DUGO a Luigi MONDELLO. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. *Flavour and Fragrance Journal*. 2008, **23**(5), 297-314. DOI: 10.1002/ffj.1887. ISSN 08825734. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1887>
- [10] ZENKEVICH, I. G. Kovats Retention Index System. CAZES, Jack. *Encyclopedia of Chromatography Update Supplement*. 1. CRC Press, 2004. ISBN 978-0824721534.
- [11] PACÁKOVÁ, Věra a Ladislav FECHTL. *Retenční indexy v plynové chromatografii*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [12] BICCHI, C., A. BINELLO, A. D'AMATO a P. RUBIOLO. Reliability of Van den Dool Retention Indices in the Analysis of Essential Oils. *Journal of Chromatographic Science*. 1999, **37**(8), 288-294. DOI: 10.1093/chromsci/37.8.288. ISSN 0021-9665. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/37.8.288>

- [13] BABUSHOK, V. I., P. J. LINSTROM a I. G. ZENKEVICH. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 2011, **40**(4). DOI: 10.1063/1.3653552. ISSN 0047-2689. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3653552>
- [14] HOLZBECHER, Z., J. CHURÁČEK a kolektiv. *Analytická chemie*. Praha: SNTL: Nakladatelství technické literatury, 1987.
- [15] KORHOŇOVÁ, M., K. HRON, D. KLIMČÍKOVÁ, L. MÜLLER, P. BEDNÁŘ a P. BARTÁK. Coffee aroma—Statistical analysis of compositional data. *Talanta*. 2009, **80**(2), 710-715. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.07.054. ISSN 00399140. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914009006249>
- [16] KUFA, Pavel. *Identifikace vonných látek v bylinných líkérech*. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI, 2010. BAKALÁŘSKÁ PRÁCE. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Petr Barták Ph.D.
- [17] RADAUSCHER, E. J. *Design, Fabrication, and Characterization of Carbon Nanotube Field Emission Devices for Advanced Applications*. Department of Electrical and Computer Engineering, 2016. Dissertation thesis. Duke University.
- [18] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [19] HONOUR, J. W. Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2003, **40**(6), 628-638. DOI: 10.1258/000456303770367216. ISSN 0004-5632. Dostupné také z: <http://acb.sagepub.com/lookup/doi/10.1258/000456303770367216>
- [20] CHAUHAN, Ashish. *GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology*. 2014, **5**(6). DOI: 10.4172/2155-9872.1000222. ISSN 21559872. Dostupné také z: <http://omicsonline.org/open-access/gc-ms-technique-and-its-analytical-applications-in-science-and-technology-2155-9872.1000222.php?aid=33334>
- [21] SPIETELUN, Agata, Michał PILARCZYK, Adam KLOSKOWSKI a Jacek NAMIEŚNIK. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*. 2010, **39**(11). DOI: 10.1039/c003335a. ISSN 0306-0012. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c003335a>
- [22] GHERGHEL, Simona, Ruth M. MORGAN, Javier ARREBOLA-LIÉBANAS, Roberto ROMERO-GONZÁLEZ, Chris S. BLACKMAN, Antonia GARRIDO-FRENICH a Ivan P. PARKIN. Development of a HS-SPME/GC-MS method for the analysis of volatile organic compounds from fabrics for forensic reconstruction applications. *Forensic Science International*. 2018, **290**, 207-218. DOI: 10.1016/j.forsciint.2018.07.015. ISSN 03790738. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073818303955>
- [23] ARTHUR, Catherine L. a Janusz. PAWLISZYN. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. 2002, **62**(19),

- 2145-2148. DOI: 10.1021/ac00218a019. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00218a019>
- [24] SHARMA, Priyamvada, Murthy PRATIMA a M.M. Srinivas BHARATH. Chemistry, Metabolism, and Toxicology of Cannabis: Clinical Implications. *Iranian journal of psychiatry*. 2012(7), 149-56.
- [25] LAGO-FERNANDEZ, Ana, Vanessa REDONDO, Laura HERNANDEZ-FOLGADO, Laura FIGUEROLA-ASENCIO a Nadine JAGEROVIC. New Methods for the Synthesis of Cannabidiol Derivatives. *Cannabinoids and Their Receptors*. Elsevier, 2017, 2017, , 237-257. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/bs.mie.2017.05.006. ISBN 9780128121566. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687917301490>
- [26] MECHOULAM, Raphael, Linda A. PARKER a Ruth GALLILY. Cannabidiol: An Overview of Some Pharmacological Aspects. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2002, 42(S1), 11S-19S. DOI: 10.1002/j.1552-4604.2002.tb05998.x. ISSN 00912700. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1552-4604.2002.tb05998.x>
- [27] FRASER, AD a D. WORTH. Monitoring urinary excretion of cannabinoids by fluorescence-polarization immunoassay: a cannabinoid-to-creatinine ratio study. *Ther Drug Monit*. 2002, (24), 746-750.
- [28] HIDVEGI, E. a G.P. SOMOGYI. Detection of cannabigerol and its presumptive metabolite in human urine after Cannabis consumption. *Pharmazie*. 2010, (65), 408-411.
- [29] MECHOULAM, Raphael a Yehiel GAONI. The absolute configuration of δ 1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Letters*. 1967, 8(12), 1109-1111. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)90646-4. ISSN 00404039. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403900906464>
- [30] JUNG, Byunghyuck, Jungkyu K. LEE, Jungnam KIM, Eunhye K. KANG, Sang Yeong HAN, Hee-Yoon LEE a Insung S. CHOI. Synthetic Strategies for (-)-Cannabidiol and Its Structural Analogs: An Overview of Some Pharmacological Aspects. *Chemistry – An Asian Journal*. 2019, 14(21), 3749-3762. DOI: 10.1002/asia.201901179. ISSN 1861-4728. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/asia.201901179>
- [31] BAEK, Seung-Hwa, Morris SREBNIK a Raphael MECHOULAM. Boron trifluoride etherate on alimina - a modified Lewis acid reagent. *Tetrahedron Letters*. 1985, 26(8), 1083-1086. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)98518-6. ISSN 00404039. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403900985186>
- [32] ZUARDI, A. W., I. SHIRAKAWA, E. FINKELFARB a I. G. KARNIOL. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ 9-THC in normal subjects: An Overview of Some Pharmacological Aspects. *Psychopharmacology*. 1982, 76(3), 245-250. DOI: 10.1007/BF00432554. ISSN 0033-3158. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00432554>

- [33] HAZEKAMP, Arno. The Trouble with CBD Oil. *Medical Cannabis and Cannabinoids*. 2018, **1**(1), 65-72. DOI: 10.1159/000489287. ISSN 2504-3889. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/489287>
- [34] PubChem. *PubChem* [online]. [cit. 2020-07-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [35] BIANCHI, Federica, Maria CARERI, Alessandro MANGIA a Marilena MUSCI. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness. *Journal of Separation Science*. 2007, **30**(4), 563-572. DOI: 10.1002/jssc.200600393. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600393>
- [36] KUNDAKOVIC, T., N. FOKIALAKIS, N. KOVACEVIC a I. CHINOU. Essential oil composition of *Achillea lingulata* and *A. umbellata*. *Flavour and Fragrance Journal*. 2007, **22**(3), 184-187. DOI: 10.1002/ffj.1778. ISSN 08825734. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1778>
- [37] BIANCHI, F, C CANTONI, M CARERI, L CHIESA, M MUSCI a A PINNA. Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta*. 2007, **72**(4), 1552-1563. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.02.019. ISSN 00399140. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914007001294>
- [38] SAGRERO-NIEVES, Lorenzo a J.P. BARTLES. Volatile components from the leaves of *Heterotheca inuloides* Cass. *Flavour and Fragrance Journal*. February 1996, **11**(1), 49-51. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199601)11:1<49::AID-FFJ538>3.0.CO;2-J.
- [39] GÜRBÜZ, Ozan, June M. ROUSEFF a Russell L. ROUSEFF. Comparison of Aroma Volatiles in Commercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography–Olfactometry and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, **54**(11), 3990-3996. DOI: 10.1021/jf053278p. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf053278p>
- [40] CHOI, Hyang-Sook a Masayoshi SAWAMURA. Composition of the Essential Oil of *Citrus t amurana* Hort. ex Tanaka (Hyuganatsu). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, **48**(10), 4868-4873. DOI: 10.1021/jf000651e. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf000651e>
- [41] GANCEL, Anne-Laure, Didier OLLÉ, Patrick OLLITRAULT, François LURO a Jean-Marc BRILLOUET. Leaf and peel volatile compounds of an interspecific citrus somatic hybrid [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Citrus paradisi* Macfayden]. *Flavour and Fragrance Journal*. 2002, **17**(6), 416-424. DOI: 10.1002/ffj.1119. ISSN 08825734. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1119>
- [42] WONG, K. C. a Y. E. TENG. Volatile Components of *Mimusops elengi* L. Flowers. *Journal of Essential Oil Research*. 1994, **6**(5), 453-458. DOI: 10.1080/10412905.1994.9698425. ISSN 1041-2905. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1994.9698425>
- [43] QIAN, Michael C. a Yuanyuan WANG. Seasonal Variation of Volatile Composition and Odor Activity Value of 'Marion' (*Rubus* spp. hyb) and 'Thornless Evergreen' (*R. laciniatus* L.) Blackberries. *Journal of Food Science*. 2005, **70**(1), C13-

- C20. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09013.x. ISSN 00221147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09013.x>
- [44] CHUNG, Hau Yin, Pui Kwan FUNG a Joo-Shin KIM. Aroma Impact Components in Commercial Plain Sufu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53**(5), 1684-1691. DOI: 10.1021/jf048617d. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf048617d>
- [45] BREITMAIER, Eberhard. *Terpenes: flavors, fragrances, pharma, pheromones*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. ISBN 978-3-527-31786-8.
- [46] ANDRE, Christelle M., Jean-Francois HAUSMAN a Gea GUERRIERO. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*. 2016, **7**. DOI: 10.3389/fpls.2016.00019. ISSN 1664-462X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00019/abstract>
- [47] ROTHSCILD, MIRIAM, GUNNAR BERGSTRÖM a STEN-ÅKE WÄNGBERG. Cannabis sativa: volatile compounds from pollen and entire male and female plants of two variants, Northern Lights and Hawaiian Indica. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2005, **147**(4), 387-397. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2005.00417.x. ISSN 1095-8339. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2005.00417.x>
- [48] MILES, Helena. 15 terpenes in cannabis explained. *CannaCon* [online]. [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://cannacon.org/15-terpenes-cannabis-explained/>
- [49] Terpenes. *Fundación Canna* [online]. [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.fundacion-canna.es/en/terpenes>
- [50] Terpinolene. *Weedmaps* [online]. [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://weedmaps.com/learn/dictionary/terpinolene/>
- [51] BENNETT, Patrick. What is humulene and what does this cannabis terpene do? *Leafly* [online]. 2018, 28. 11. 2018 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.leafly.com/news/science-tech/humulene-terpene>
- [52] KURITA, Nobuyuki a Shigeru KOIKE. Synergistic Antimicrobial Effect of Acetic Acid, Sodium Chloride and Essential Oil Components. *Agricultural and Biological Chemistry*. 2014, **46**(6), 1655-1660. DOI: 10.1080/00021369.1982.10865289. ISSN 0002-1369. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1982.10865289>
- [53] ASHURST, Philip R. *Food Flavorings*. 3. Springer US, 1999. ISBN 978-0-8342-1621-1.

6. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

GC	Gas Chromatography – Plynová chromatografia
MS	Mass Spectrometry – Hmotnostná spektrometria
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
SPME	solid-phase microextraction – mikroextrakcia na pevnej fáze
MOMA	Mars Organic Molecule Analyzer
NMR	Nuclear magnetic resonance – Nukleárna magnetická rezonancia
TIC	Total ion chromatogram
EI	electron ionization – elektrónová ionizácia
CI	chemical ionization – chemická ionizácia
THC	Δ^9 -tetrahydrokanabinol
CBD	kanabidiol
TLC	Thin layer chromatography – Chromatografia na tenkej vrstve
HPTLC	High-performance thin layer chromatography – Vysokoučinná chromatografia na tenkej vrstve
RI	retenčný index