

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie**



Analýza kumarinů plynovou chromatografií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:
Studijní obor:
Vedoucí práce:

Bc. Petr Studnička
Analytická chemie
doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

2023 Olomouc

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Bartáka, Ph.D. a že jsem použil zdroje, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěl podekovat svému vedoucímu panu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D., za jeho věcné a odborné rady a připomínky při praktickém provedení této diplomové práce. Dále za čas, který mi věnoval při vypracování práce. A za to, jakou mi byl inspirací a motivací v průběhu celého studia.

Také bych chtěl poděkovat všem zaměstnancům Katedry analytické chemie, za jejich vstřícný a profesionální přístup.

Zároveň v neposlední řadě bych rád poděkoval svým přátelům a rodině za jejich podporu a víru. Hlavní poděkování patří mé babičce za její neutuchající podporu a víru.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2022_023 a IGA_PrF_2023_027)

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Petr Studnička
Název práce: Analýza kumarinů plynovou chromatografií
Typ práce: Diplomová práce
Pracoviště: Katedra analytické chemie
Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Rok odevzdání práce: 2023

Anotace:

Kumariny jsou látky vyskytující se v řadě druhů rostlin. Vyskytují se i v dřevěných sudech, ve kterých se uchovávají různé alkoholické nápoje. V průběhu zrání jsou kumariny extrahovány do těchto nápojů z materiálu sudů a přispívají k vnímání hořkosti. Tato práce se zabývala identifikací a stanovením obsahu kumarinů ve vzorcích rumů, koňaků a whisky pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Byla optimalizována metoda pro úpravu odebraných vzorků zahrnující extrakci dichlormethanem v kyselém prostředí solanky a následné derivatizace pomocí hexamethyldisilazanu v pyridinu. Pro určení množství byly zkoumány tři metody kvantifikace. Nejlepších hodnot RSD bylo dosaženo metodou interního standardu m-nitrofenolu. Zkoumané vzorky nápojů obsahují zpravidla nejvíce skopoletin (0,016-0,94 µg/ml) a nejméně umbelliferonu (0,0005-0,01 µg/ml).

Klíčová slova: Kumarin, umbelliferon, 4-methyl-umbelliferon, skopoletin, fraxetin, eskuletin, GC-MS, extrakce, derivatizace, destiláty

Počet stran: 69

Počet příloh: 2

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Bc. Petr Studnička
Title:	Analysis of coumarins by gas chromatography
Type of thesis:	master's
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
The year of submission:	2023

Annotation:

Coumarins are substances occurring in number of plant species. They are also found in wooden barrels in which various alcoholic beverages are stored. Coumarins are extracted into these drinks during maturation from barrel material and contribute to the perception of bitterness. This thesis dealt with the identification and determination of coumarins content in rum, cognac and whiskey samples using gas chromatography with mass spectrometry. A method was optimized for treatment of the collected samples, including extraction with dichloromethane in an acidified solution of brine and subsequent derivatization using hexamethyldisilazane in pyridine. Three quantification methods were investigated to determine the amount of coumarins. The best RSD values were obtained using the m-nitrophenol as internal standard. The investigated samples of beverages usually contain the highest concentration (0,016-0,94 µg/ml) of scopoletine and the lowest concentration of umbelliferone (0,0005-0,01 µg/ml).

Keywords:	Coumarins, umbelliferone, 4-methyl-umbelliferone, scopoletine, fraxetone, esculetine, GC-MS, extraction, derivatization, beverages
-----------	--

Number of pages	69
Number of appendices:	2
Language:	Czech

Seznam zkratek

μ -SPE-PT	Mikroextrakce na pevné fázi ve špičce pipety
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CDA	chirální derivatizační činidlo
CNS	centrální nervová soustava
DE	diethylether
DLLME	disperzní mikroextrakce kapalina kapalina
ECD	detektor elektronového záchytu
EtAc	ethyl-acetát
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HF-LPME	mikroextrakce kapalné fáze pomocí dutého vlákna
HMDS	hexamethyldisilazan
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina kapalina
LLME	mikroextrakce kapalina kapalina
MEPS	mikroextrakce tuhou fází v mikrostríkačce
MIBK	methylisobutylketon
MIP	molekulárně vtištěné polymery
MMIP	magnetické molekulárně vtištěné polymery
RPM	otáčky za minutu
SDME	mikroextrakce do jedné kapky
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SFE	superkritická fluidní extrakce
SIM	vybraný sledovaný ion
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
TIC	celkový iontový proud
TMCS	trimethylchlorsilan
TMDSEA	trimethylsilyldiethylamin
TMS	trimethylsilyl
TMSIM	trimethylsilylimidazol

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Teoretická část	9
2.1.	Kumariny	9
2.1.1.	Význam kumarinů	11
2.1.2.	Kumariny v potravinách a nápojích	12
2.2.	Analýza kumarinů	14
2.2.1.	Extrakce	14
2.2.2.	Extrakce kapalina-kapalina	15
2.2.2.1.	Faktory ovlivňující LLE	15
2.2.2.2.	Aplikace LLE	16
2.2.3.	Extrakce na pevné fázi	17
2.2.3.1.	Aplikace SPE	18
2.2.3.2.	Aplikace MIP	19
2.2.4.	Mikroextrakční techniky	19
2.2.5.	Head-space extrakce	20
2.2.5.1.	Aplikace Head-space	20
2.2.6.	Superkritická fluidní extrakce	21
2.2.6.1.	Aplikace SFE	21
2.3.	Derivatizace	22
2.3.1.	Důvody derivatizace	23
2.3.2.	Používané deriváty	23
2.3.2.1.	Silanizační činidla	24
2.3.2.2.	Estery	25
2.3.2.3.	Acyl deriváty	26
2.3.2.4.	Ethery	26
2.3.2.5.	Cyklické deriváty	26
2.3.2.6.	Chirální deriváty	27
2.4.	Metody kvantitativního vyhodnocení	27
2.4.1.	Metoda vnějšího standardu	27
2.4.2.	Metoda standardního přídatku	27
2.4.3.	Metoda vnitřního standardu	28
3.	Experimentální část	29

3.1.1.	Chemikálie, přístroje a pomůcky	29
3.2.	GC-MS analýza.....	30
3.3.	Úprava vzorku.....	30
3.3.1.	Výtěžnost extrakce	31
3.3.2.	Vliv prostředí	31
3.3.3.	Volba extrakčního činidla	32
3.3.4.	Volba derivatizačního činidla.....	32
3.3.5.	Finální úprava	33
3.3.6.	Vliv retenčního gapu.....	33
3.4.	Kvantifikace	33
3.4.1.	Metoda standardního přídávku.....	34
3.4.2.	Metoda vnějšího standardu.....	34
3.4.3.	Metoda vnitřního standardu.....	34
3.4.4.	Opakovatelnost.....	35
3.5.	Analýza reálných vzorků.....	35
4.	Výsledky a diskuse	36
4.1.	Možnost GC-MS analýzy.....	36
4.2.	Úprava vzorku.....	36
4.2.1.	Výtěžnost extrakce	37
4.2.2.	Vliv prostředí	38
4.2.3.	Volba extrakčního činidla	41
4.2.4.	Volba derivatizačního činidla.....	42
4.2.5.	Vliv retenčního gapu.....	43
4.3.	Kvantifikace	43
4.3.1.	Metoda standardního přídávku.....	43
4.3.2.	Metoda vnějšího standardu	44
4.3.3.	Metoda vnitřního standardu	44
4.3.4.	Porovnání metod kvantifikace.....	46
4.3.5.	Opakovatelnost	47
4.4.	Analýza reálných vzorků.....	51
5.	Závěr	57
6.	Literatura	58
7.	Příloha 2: Tabulka ploch	63
8.	Příloha 2: Výstupy z GC-MS analýz	64

1. Úvod

Kumariny jsou v přírodě velmi rozšířené látky, mající typické aroma vanilkového lusku, a proto jsou využívány jako aromatické přídavné látky. Mají řadu významných vlastností pro farmaceutický průmysl. Také je ale diskutován jejich možný karcinogenní efekt, který zatím, ale nebyl u člověka prokázán. [1;10-14;24]

Kumariny jsou díky svému výskytu rozšířeny v jídle i nápojích. Vyskytují se hlavně v takových nápojích, které přichází do kontaktu s rostlinným materiálem a které obsahují organické složky (rozpouštědla), které mohou kumariny z daných materiálů extrahovat. Hlavními zástupci takových nápojů jsou alkoholy, které jsou uchovávány v sudech, ze kterých jsou právě kumariny extrahovány. Typickými zástupci jsou rumy, koňaky a whisky u kterých je přítomnost kumarinů více pravděpodobná vlivem zrání, a tedy delší době působení alkoholu na sud. [3;29] Podle jedné studie přítomnost kumarinů v těchto destilátech přispívá ke zvýšení vnímání hořkosti. [32]

Cílem této diplomové práce je vypracovat optimální způsob úpravy reálných vzorků, pro snížení obsahu matricových složek a následnou analýzu na GC-MS. Následně porovnání metod kvantifikace kumarinů. A v poslední řadě provést analýzu sady reálných vzorků rumů, koňaků a whisky.

2. Teoretická část

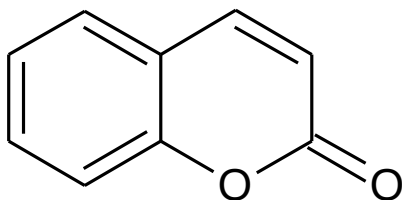
2.1. Kumariny

Kumariny patří do skupiny látek zvané fytochemikálie. Skupina těchto látek se vyznačuje biologickým významem. Příkladem látek spadajících do fytochemikálií jsou: karotenoidy, flavonoidy. Kumariny jsou 1,2-benzopyrony široce rozšířené v přírodě a představují důležitou součást vyskytujících heterocyklů obsahujících kyslík. [1] V rostlinných materiálech je řada netěkavých hydroxy-, a methoxy-substituovaných kumarinů a jejich glykosidů. [2] Bylo objeveno více než 1800 různých přírodních kumarinů převážně v rostlinách, některé však byly nalezeny i v mikroorganismech. Kumariny lze klasifikovat jako: jednoduché, furanokumariny, dihydrofuranokumariny, pyranokumariny, fenylkumariny a biskumariny. [3]

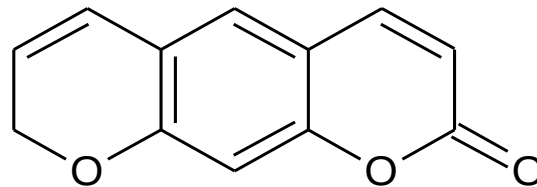
Jednoduché kumariny jsou tvořeny strukturou, kterou lze popsat benzenovým jádrem s dvěma sousedními vodíky substituovanými laktonovým řetězcem, tvořícím druhý šestičlenný heterocyklus. Obr.1. [4] Chemická struktura furanokumarinů (furokumarinů) obsahuje furanový kruh kondenzovaný s kumarinem. Obr.2. [6] Dihydrofuranokumariny mají totožnou strukturu s furanokumariny s tím rozdílem, že neobsahují násobnou vazbu ve furanovém heterocyklu. Obr.2. [6] Pyranokumariny obsahují pyranový heterocyklus spojený s kumarinovým základem. Obr. 4. [7] Fenylkumariny obsahují jednoduchý kumarin, na němž je připojen fenylový zbytek. Obr. 5. [8] Strukturu biskumarinů ukazuje obr. 6. [6] Typickými zástupci jednoduchých kumarinů substituovaných v poloze C-6 nebo polohách C-6 a C-7 jsou umbelliferon (Obr. 7) (odvozen od 4-kumarové kyseliny). Dále od umbelliferonu odvozený eskuletin (Obr. 10) (6,7-dihydroxykumarin), skopoletin (Obr.9) (7-hydroxy-6-methoxykumarin) a skoparon (6,7-dimethoxykumarin), tyto kumariny se vyskytují v malém množství v některých druzích ovoce a zeleniny. Eskuletin a skopoletin byly nalezeny v množství asi 1 mg/kg v mrkvi, celeru a dalších kořenových zeleninách i v některých druzích ovoce (meruňky). [2]

Název Kumarin pochází z francouzského výrazu pro fazole *Tonka* „*Coumarou*“. Semínka *Dipteryx odorata* byla jedním ze zdrojů, ze kterého byl poprvé kumarin izolován v roce 1820 jako přírodní produkt. Předpokládá se, že kumariny mají účel chemické obrany rostlin k odrazení predace. [9,11] Kumarin vůni připomíná čerstvý jetel a vzdáleně vanilku. [2] V literatuře je aroma kumarinů často popisováno, jako sladké, krémové aroma vanilkového lusu. [10] Později byly kumariny nalezeny v mnoha

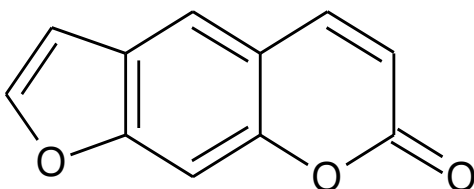
dalších rostlinách, jako: jetel sladký, vanilková tráva, skořice, ale i jahoda, černý rybíz, meruňka a třešeň. [12]



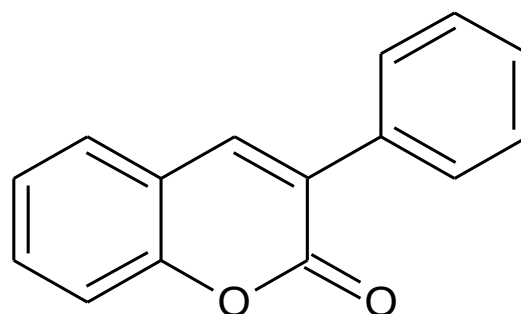
Obr. 1: Struktura jednoduchého kumarinu



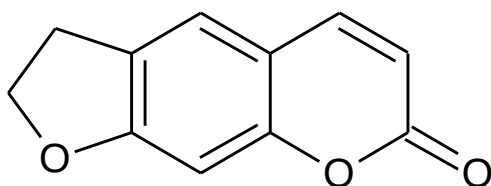
Obr. 4: Struktura pyranokumarinu



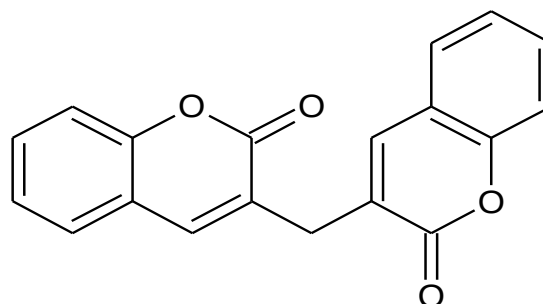
Obr. 2: Struktura furanokumarinu



Obr. 5: Struktura fenyلكumarinu

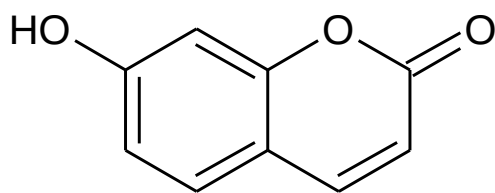


Obr. 3: Struktura dihydrofuranokumarinu

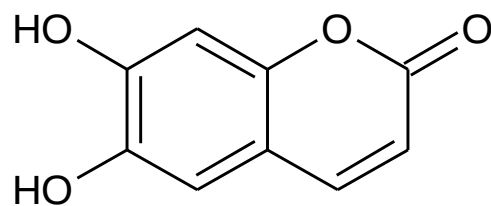


Obr. 6: Struktura biskumarinu

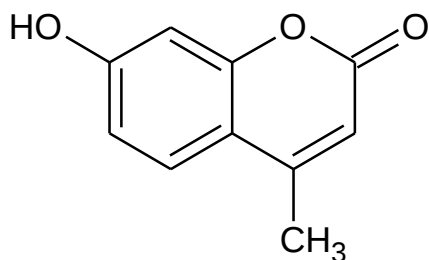
Příkladem derivátu jednoduchých kumarinů je umbelliferon (UMB). Využívá se jako farmaceutická substance a hojně se vyskytuje v čeledi Rutaceae a Apiaceae. [13] Obecně se má za to, že umbelliferon i furanokumariny jsou fytoalexiny, tedy hrají fungicidní roli v rostlinách. Čistý UMB vykazuje mírné antibakteriální účinky proti *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*. [14] Rozšířené jsou furanokumariny, ale relativně vzácné jsou pyranokumariny i fenyلكumariny. [2]



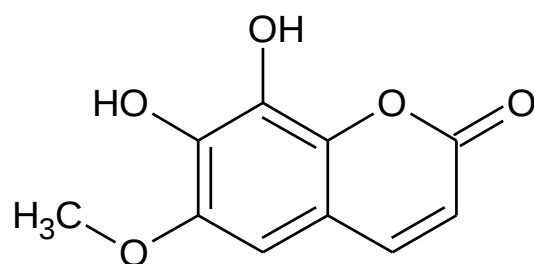
Obr. 7: Struktura umbelliferonu



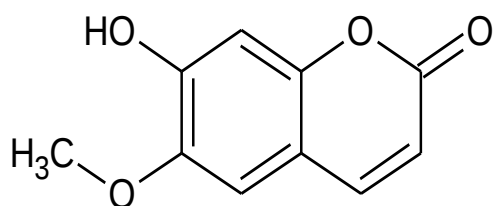
Obr. 10: Struktura eskuletinu



Obr. 8: Struktura 4-methyl-umbelliferonu



Obr. 11: Struktura fraxetinu



Obr. 9: Struktura skopoletinu

Obr.7-11 zobrazují struktury kumarinů zkoumaných v této práci

2.1.1. Význam kumarinů

Kumarin a jeho deriváty mají široký rozptyl biologických vlastností, které závisí hlavně na jejich chemické struktuře. [15] Z tohoto důvodu, byly aplikovány v široké škále farmaceutických aplikací jako antimikrobiální látky [16], antioxidanty [17], protizánětlivé látky [18], anti-HIV látky [19] aj. Mezi těmito farmaceutickými vlastnostmi, mají kumariny také silný účinek na centrální nervovou soustavu (CNS), který se zdá být velmi důležitým biologickým efektem. Z tohoto důvodu jsou kumariny potenciálním zdrojem pro prevenci a léčbu některých onemocnění. [20] Příkladem je Warfarin, který se prodává na předpis pod značkou Coumadin. Působí jako antikoagulant k inhibici tvorby krevní sraženiny. Dále se používá k terapii hluboké žilní trombózy a plicní embolie. [21]

Některé výzkumy naznačují, že kumariny mohou mít spojitost s rakovinou, avšak stále nebylo potvrzeno, že mají genotoxický účinek na lidi. [22,23] Kumariny jsou středně toxické látky pro játra a ledviny hlodavců se střední letální dávkou (LD50) 293 mg/kg u potkanů. [24] Lidé metabolizují kumarin převážně na 7-hydroxykumarin, sloučeninu s nižší toxicitou. Toxicky se furanokumariny pocházející z potravy mohou u člověka projevit v množství 0,14-0,38 mg na 1 kg tělesné hmotnosti, což při běžné spotřebě zdravé kořenové zeleniny nepřipadá v úvahu. Celkový denní příjem se odhaduje na 1,3 mg. [2;25] Kumariny se využívají v parfémtech, kosmetice a jako průmyslové přísady. Některé deriváty se používají, jako zesilovače aroma v tabáku a některých alkoholických nápojích. [26,27]

2.1.2. Kumariny v potravinách a nápojích

Roku 1868 byl kumarin poprvé syntetizován a uveden na trh, jako látka ovlivňující chuť a aroma. [28,23] Kumariny jsou přítomny v zelenině, ovoci, oříšcích a dalších zdrojích potravin. Vysoký obsah je ve skořici a skořice může být významným zdrojem kumarinů v potravě. [3] Kromě ovoce a zeleniny, i některé široce používané dietní produkty, jako oleje (olivový, sójový), káva, ořechy, víno a čaj obsahují kumariny. [29] Sproll a kol. zjistili, že ze zkoumaných potravinách je největší obsah kumarinů v pekařských produktech a snídaňových cereáliích (průměrně 9 mg/kg). Největší koncentrace, až 88 mg/kg byla objevena v některých sušenkách ochucených skořicí. [10]

Kumariny jsou obsaženy také v nápojích, ale ve velmi malém množství. [30] Ačkoliv byly kumariny detekovány v mnoha rostlinách, jejich přítomnost v čajových lístech je málo prozkoumána. Yang a kol. (2009) zjistili, že stonková část zeleného čaje obsahuje mnohem nižší koncentraci kumarinů než list, kde se nejvíce kumarinů vyskytovalo ve volné formě. [31] Kumariny se vyskytují ve víně, přestože nejsou obsaženy v hroznech. Jejich obsah je zapříčiněn zráním a skladováním vín v dřevěných sudech. Vína jsou konzumována po celém světě a jejich produkce má dlouhou historii v mnoha zemích. Kvůli značnému obchodnímu významu vín je kladen větší důraz na jejich kontrolu. [44] Winstel a kol. (2020) zkoumali přítomnost kumarinů (umbelliferon, fraxetin, eskuletin, skopoletin, kumarin, 4-methyl-umbelliferon) v extraktu z dubového dřeva a ve vzorcích vína (bílého i červeného), v destilátech (koňaku, brandy, rumu, whiskey, bourbonu). Zjistili, že je vyšší koncentrace kumarinů v destilátech než ve vzorcích vín, což je vysvětlitelné delší dobou zrání i vyšším obsahem alkoholu destilátů.

Při zkoumání senzorických vlastností vzorků vín a destilátů zjistili, že přítomnost kumarinů zvyšuje vnímání hořkosti takových vzorků. [32] Alkoholické nápoje prodávané v Evropské Unii jsou zákonem omezeny na obsah kumarinů o maximální koncentraci 10 mg/l. [33] K aromatizaci alkoholických nápojů (např. polské Zubrovky) slouží stéblo *Tomkovice* obsahující kumariny. [2]

Tato diplomová práce se zabývá stanovením kumarinů ve vzorcích alkoholických nápojů. Alkoholické nápoje obsahují těkavé látky ale i netěkavé komponenty, které nejsou v GC-MS zjistitelné. Tento odstavec tedy se zabývá inovativními způsoby analýzy alkoholů (vín) pomocí GC. Velký potenciál má použití uhlíkových sorbentů s nanostrukturou jako stacionární fázi. Tento sorbent má strukturu podobnou fullerenům a široký rozsah separovatelných látek. Použití takové nanotrubice pro separaci alkoholů a esterů v destilovaných lihovinách vedlo k dobré separaci a kvantifikaci. Právě analýza methanolu a ethanolu může být obtížná na běžných stacionárních fázích v důsledku nízké retence. Každopádně kolona s takovou stacionární fází, která je levnější a snadněji připravitelná, poskytuje výborné retence. Jejich nevýhoda je však v použití teploty. Takovou kolonu lze použít pro nízkovroucí látky (do 200 °C). Dále velký význam může mít použití iontových kapalin jako stacionární fáze. Iontové kapaliny jsou soli s bodem tání pod 100 °C. Výhoda takovéto stacionární fáze je schopnost separace jak polárních, tak i nepolárních látek. Byly také aplikovány pro chirální separace. Nejen použití inovativních kolon, ale větší důraz je kladen na úpravu vzorků. Nejčastějšími úpravy se myslí extrakce, derivatizace, které jsou popsány v samostatných kapitolách 2.2 a 2.3. [34]

2.2. Analýza kumarinů

Kumariny, jak bylo popsáno v předchozí kapitole jsou látky vyskytující se v řadě materiálů a vzorků. Mají také řadu zajímavých vlastností, které vybízí k jejich zkoumání. Kumariny jsou nejčastěji analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Jejich analýza si žádá řadu úprav vzorku před finální analytickou koncovkou, jelikož se vyskytují v maticích bohatých na další látky. Nejčastěji se využívá extrakčních technik, pro separaci a odstranění nežádoucích látek. Extrakce a různé druhy extrakčních technik, využívaných pro úpravu vzorků s příklady pro izolaci kumarinů jsou popsány níže v této kapitole.

2.2.1.Extrakce

Extrakční techniky jsou nejběžnějším způsobem úpravy vzorku pro izolování analytů z komplexní matrice. V tomto textu jsou zmíněny principy základních a použitelných extrakčních technik. Principem extrakce je převedení složky X z fáze A, do fáze B, která se s fází A nemísí. Extrahovaná část může být přímo analyzována, nebo může být podrobena dalším úpravám. Mezi fázemi se ustavuje rovnováha, kterou lze zapsat rovnicí (1).



Z této rovnovážné rovnice vychází Nernstův rozdělovací zákon (2)

$$K_D = \frac{[X]_B}{[X]_A} \quad (2)$$

Kde $[X]$ představuje koncentraci látky X v dané fázi. Čím větší je číslo K_D , tím je extrakce látky X do fáze B úspěšnější. V případě, kdy je K_D rovno jedné je koncentrace analytu X v obou fázích rovna. [35]

2.2.2.Extrakce kapalina-kapalina

V případě extrakce kapalina-kapalina (LLE) jsou fáze A i B kapalné a podmínkou je jejich nemísitelnost. V praxi se často využívá vodné fáze a druhé organické fáze. Extrakce je dosaženo, pokud má analyt příznivou rozpustnost v organickém rozpouštědle. [35]

Jednoduché praktické provedení má však ve svém principu zásadní nedostatek. A to chybějící obecné pravidlo výběru extrakčního činidla vhodného pro analyt v daném matricovém systému.

Při opakované extrakci lze pomocí rovnice (3) vypočítat výtěžek extrakce R_n , kde r je poměr objemů jednotlivých fází. Poměr r výhodný pro optimální extrakci v intervalu $1,5 > r > 1$. Při zvyšování koncentrace organické fáze nad určitou hodnotu je zvýšení výtěžnosti extrakce R_n již zanedbatelné. D_c rozdělovací poměr z rovnice (4). [38]

$$R_n = 1 - \left[\frac{1}{1 - r \cdot D_c} \right]^n \quad (3)$$

$$D_c = \frac{(c)_B}{(c)_A} \quad (4)$$

Pro účinnou extrakci je třeba, aby analyt byl alespoň z 95 % v extrahovatelné formě jako volná báze nebo kyselina. Z tohoto důvodu je třeba v řadě případů upravit pH vzorku.

Využití LLE může přinést další nadbytečné kroky úpravy vzorku. Např. pro odstranění toxického extrakčního činidla či činidla nevhodného z jiného důvodu pro přímou instrumentální analýzu je třeba toto činidlo odpařit do sucha. A odparek znovu rozpustit ve vhodném rozpouštědle. [35]

2.2.2.1. Faktory ovlivňující LLE

Míchání

LLE vyžaduje vzájemný kontakt dvou fází, kterého je dosahováno nejčastěji mícháním, třepáním nebo vířivým promícháním. Obecně vyšší rychlost míchání vede k rychlejšímu ustálení rovnováhy. A delší čas zajišťuje, že bylo dosaženo rovnováhy. Proces míchání by měl pokaždé být proveden za stejných podmínek, pro zajištění reprodukovatelnosti.

Vysolení

Přidání soli o vysoké koncentraci, jako například NaCl, často vede ke zvýšení extrakční účinnosti. Důvodem je snížení rozpustnosti organické sloučeniny ve vodné fázi vlivem zvýšení iontové síly.

Zvolené pH

Jelikož jsou analyty často slabé organické kyseliny či zásady může pH prostředí značně ovlivnit jejich rozpustnost ve vodné fázi. Pro zlepšení extrakční výtěžnosti kyselin, může být vodná fáze upravena na nižší pH, ideální o dva stupně nižší, než je pK_a daného analytu. Analogie platí pro báze se zvýšením pH.

Zvolená teplota

Zvýšení teploty může vést ke snížení distribuční konstanty, a tedy k nižšímu extrahovanému množství. Zároveň, ale při zvýšené teplotě je kinetika procesu rychlejší, tedy dochází ke zrychlení extrakce. Často je volba teploty rozhodnutím mezi nižší výtěžností a rychlejší extrakcí. Pro zajištění reprodukovatelných výsledků je nezbytné, aby všechny vzorky byly zpracovány za stejným teplotních podmínek.

Zvolené extrakční činidlo

Ideální extrakční rozpouštědlo by mělo vykazovat vysokou rozpustnost daných analytů a nízkou rozpustnost pro interferující látky. Extrakční fáze nesmí být mísitelná s původní fází. [39]

2.2.2.2. Aplikace LLE

Ochocka a kol. (1995) zkoumali přítomnost kumarinů v *Chrysanthemum segetum* kapilární elektroforézou. Usušené a rozemleté kořínky a nadzemní části rostliny byly extrahovány methanolem. Extrakt byl zakoncentrován pod vakuem. Vzniklý koncentrát byl zředěn 4 % vodným roztokem octanu olovnatého, o stejném objemu jako měl koncentrát. Roztok se nechal stát přes noc a vzniklá sraženina byla odstraněna filtrací. Filtrát byl opět zakoncentrován ve vakuu a extrahován chloroformem. Elektroforetickou separací byly získány signály pro herniarin, umbelliferon, aesculetin, dihydrokumarin a kyselina kumarinová. [36]

Sproll a kol. (2008) použili 15 g pevného vzorku potravin, který umístili do 50 ml širokohrdlé odměrné baňky. Baňku naplnili pod kalibrační rysku extrakčním roztokem (80 % methanol, V/V). Obsah baňky byl míchán magnetickým míchadlem po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Následovalo vytemperování baňky na 20 °C a doplnění po rysku extrakčním roztokem. Všechny vzorky byly filtrovány jednorázovými filtry a následně bylo 5 µl extraktu nadávkováno do HPLC. [10]

Rhim a kol. (2011) analyzovali 155 vzorků potravin (obsažené byly i nápoje). Pevné vzorky byly homogenizovány a extrahovány methanolem s následnou sonifikací v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Extrakty byly filtrovány a následně nadávkovány do GC. [37]

Salagoity-Augeste a kol. (1978) zkoumali kumariny obsažené ve víně a brandy. Pro jejich extrakci použili diethylether a následně nadávkovali extrakty na HPLC kolonu s reverzní fází. [41] Této extrakce využili také Fernández Izquierdo a kol. (2000) při porovnání HPLC a spektrofotometrické metody pro stanovení kumarinů v destilovaných nápojích. [42]

2.2.3.Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (SPE) využívá kolonky, kde je extrakční fáze tvořena práškovým silikagelem modifikovaným vhodnou hydrofobní funkční skupinou. Funkční skupina navázána na nosiči rozpouští hydrofobní látky ze vzorku působením van der Waalsových sil a extrahuje je tak z vodného roztoku. Běžně používaná extrakční náplň je tvořena silikagelem s chemicky vázanou oktadecylovou skupinou (C18). [40] Výhodou SPE je selektivnější izolace analytu než při použití LLE. [35]

SPE má oproti LLE řadu výhod: vysoká výtěžnost, účinné zkoncentrování, nižší spotřeba organických rozpouštědel, přečištění. SPE obnáší ale řadu nutných kroků pro extrakci, jako je kondicionace kolonky, promytí a následná eluce. Pro úspěšnou extrakci je nutné, aby analyt měl vyšší afinitu k fázi pevné než k matici vzorku

2.2.3.1. Aplikace SPE

Li a kol. (2019) využili SPE pro izolaci kumarinů z citrusové šťávy. Vzorky po centrifugaci byly extrahovány pomocí C-18 kolonky. Po promytí kolonky směsí, voda: acetonitril (75:25), byly analyty eluovány 5 ml ethyl-acetátu. Eluáty byly odpařeny do sucha při 35 °C pod proudem dusíku a následně rozpuštěny v methanolu a analyzovány HPLC metodou. [43]

Použitím různých SPE sorbentů pro izolaci kumarinů se zabývala Hroboňová a kol. (2020). Zkoumány byly vzorky bílého vína s putnovým¹ číslem 5 z různých oblastí Slovenska. Použity byly komerční sorbenty C18-Hydra; HR-P; HR-X; AFFiNiMP-phenolic a laboratorně připravený MIP-7-hydroxykumarin a Fe₃O₄/MIP-7-hydroxykumarin. **Konvenční SPE:** daný objem vzorku prošel kolonkou, následovalo promytí vodou a eluování analytů roztokem methanol/kys. octová (9:1, V/V). **Extrakce pomocí Fe₃O₄/MIP-7-hydroxykumarin:** 3 ml vzorku byly přidány k sorbentu (0,2 g) a míchány 30 minut magnetických míchadlem při 25 °C. Sorbent byl vytáhnut externím magnetem, propláchnut vodou a usušen za vakua při 60 °C. Dále byl sorbent smíchán s roztokem methanol/kyselina octová (9:1, V/V). **SPE špičkou pipety:** MIP-7-hydroxykumarin byl umístěn v 1 ml polypropylenové špičce, na obou koncích uzavřené vatou. Kondicionace sorbentu byla provedena methanolem a 10 % ethanolem. Byl vpraven vzorek a sorbent byl promyt vodou. Eluce analytů byly provedeny směsí methanol/kyselina octová (9:1, V/V). Ve všech případech byly extrakty filtrovány přes 0,45 µm nylonový membránový filtr a následně analyzovány HPLC metodou. [44]

Zvláštním typem SPE je využití molekulárně vtištěných polymerů (MIP). Tyto polymery jsou velmi selektivní pro daný analyt, což umožňuje citlivější a selektivnější kvantitativní analýzu. Příprava takových polymerů je několika-kroková syntéza, obnášející přípravu templátu a následnou polymeraci. K již zmiňovaným výhodám selektivity se řadí i možnost opakovaného použití. Klasická SPE je zatížená ekologickou nevýhodou, tedy použitím sorbentů, které jsou použitelné pouze jednou. [38]

¹ Putnové číslo podle počtu „puten“ nádob naplněných cibébami (bobule napadené ušlechtilou plísní). Počet přisýpaných cibéb má vliv na výslednou cukernatost vín. [45]

2.2.3.2. Aplikace MIP

Speciálním magnetickým typem MIP se zabývala Machyňáková a Hraboňová (2017). Zabývaly se přípravou speciálních magnetických MIP pro izolaci kumarinů ze vzorků skořicových tyčinek, mleté skořice, skořicových cereálií. Připravené MMIP byly kondicionovány roztokem methanol/kyselina octová (9/1, V/V) a následně 5 ml rozpouštědlem analytů. Sorbent byl oddělen externím magnetem. K aktivovanému MMIP bylo přidáno 1,25 ml (vodného) výluhu vzorku (1 g vzorku v 8 ml vody při 75 °C, s následnou centrifugací a filtrací nylonovým 0,45 µm filtrem). Směs byla míchána 30 minut. MMIP byly vytaženy externím magnetem, promyty vodou, vysušeny ve vakuu. Analyty byly eluovány roztokem methanol/kys. octová (9/1, V/V). [46]

2.2.4. Mikroextrakční techniky

Mikroextrakční techniky jsou v dnešní době hojně užívány a oblíbeny, hlavně z důvodu minimální spotřeby organického rozpouštědla.

Nejpočetnější skupinou těchto technik je mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (LLME). Možným způsobem provedení je extrakce do jediné kapky rozpouštědla (SDME) ve statickém či dynamickém provedení. Další provedení je mikroextrakce do kapalné fáze pomocí dutého vlákna (HF-LPME) a v neposlední řadě disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME). Ačkoli jsou tyto techniky využívány ve farmaceutickém a environmentálním průmyslu, jejich využití je hlavně ve vědecké sféře než v rutinní praxi. Širšímu využití brání doba potřebná pro ustálení rovnováhy, opatrná manipulace, či zajištění stability kapky a výběr správného rozpouštědla.

Mikroextrakce na pevné fázi má také řadu variant provedení. Mikroextrakce na pevné fázi ve špičkách pipet (µ-SPE-PT) a mikroextrakce tuhou fází v mikrostríkačce (MEPS) jsou do budoucna potencionálně slibné extrakční techniky. µ-SPE-PT extrakce probíhá ve špičkách pipet naplněných sorbentem. Výhodou této techniky je možnost přípravy sorbentu dle požadované aplikace. V případě MEPS je malé množství (1-4 mg) sorbentu vpraveno do injekční jehly, která je připojena ke speciální stríkačce a pohybem pístu je provedena extrakce. SPM, mikroextrakce na pevné fázi pracuje se speciálně upravenou stríkačkou, obsahující vlákno pokryté polymerem (často polydimethylsiloxan). Jedná se v podstatě o bez rozpouštědlovou techniku, kdy je vlákno vysunuto a vystaveno vzorku, dochází k adsorpci analytu. Vlákno je zasunuto a následně pro desorpci vysunuto. Nejčastěji jsou takto extrahované vzorky vpraveny do GC. [38]

2.2.5.Head-space extrakce

Tato diplomová práce se zabývá analýzou pomocí plynové chromatografie, a tedy je namístě zmínit princip a výhodu head-space extrakce. Principem head-space extrakce je odebrání těkavých látek, které se shromažďují nad kapalným či pevným vzorkem v uzavřené nádobce a nadávkování do GC systému. Evaporace těkavých látek může být usnadněna zahřátím vialky. Přenos vzorku plynné fáze může být proveden plynotěsnou injekční stříkačkou nebo dávkovací smyčkou, umístěnou mezi vialkou a GC. Jedním ze způsobů je sorpce těkavých složek na sorbent a následná desorpce do GC. [34] Provedení se dělí na statickou a dynamickou head-space extrakci.

Ve statické head-space extrakci dochází k vnesení kapalného či pevného vzorku do vialky (typicky 10 nebo 20 ml) a těkavé látky difundují do head-space prostoru vialky. Jakmile dojde k ustálení rovnováhy koncentrací analytů v head-space prostoru a matrici, je část plynné fáze z head-space prostoru přenesena do plynového chromatografu. Výhodou statického provedení je vložení vzorku do vialky a analýza bez další potřebné úpravy. V případě pevného vzorku je vhodné provést jeho rozetření pro zvětšení plochy povrchu dostupné pro těkavé analyty. V případě dynamické head-space extrakce dochází ke kontinuálnímu odebírání těkavých složek proudícím plynem. Tato metoda je oblíbenější, protože napomáhá k úplné extrakci analytů. [35] Analyty obsažené v plynu jsou zachyceny na sorbentu a následně desorbovány.

2.2.5.1. Aplikace Head-space

Maňáková (2019) se ve své diplomové práci zabývala zkoumáním přítomnosti a stanovením vonných látek v nečokoládových cukrovinkách, typu dropsů pomocí HS-SPME-GC-MS. Použila SPME-vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Vedle dalších vonných látek se jí podařilo pomocí GC-MS identifikovat také kumarin s retenčním časem 38,14 min. [47]

2.2.6. Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce (SFE) využívá výjimečných vlastností superkritických tekutin k separaci složitých materiálů, jako jsou složky životního prostředí, farmaceutických přípravků či potravin. Superkritické tekutiny vznikají zahřátím média nad kritickou teplotu a stlačením nad kritický tlak.

Tyto tekutiny kombinují vlastnosti kapalin a plynů. Nadkritická teplota zamezuje zkondenzování do kapalného stavu jednoduchým stlačením. Nejpoužívanějším médiem v SFE je oxid uhličitý při teplotě vyšší 31 °C a tlaku vyšším 7,38 MPa. Za těchto podmínek se molekuly CO₂ pohybují nezávisle na sobě, jako v plynu. Tato vlastnost přináší výhodu plynů, a to velkou difuzivitu oproti kapalinám. Další výjimečnou vlastností superkritických tekutin je velká hustota, která se blíží hustotě kapalin. Tato vlastnost přináší výhodu kapalin, a to velkou rozpouštěcí schopnost. Superkritické tekutiny umožňují rozpouštět velké netěkavé molekuly. [40]

Nejpoužívanějším superkritickým médiem je CO₂, který má řadu výhodných vlastností. Hlavním z výhod je nízká superkritická teplota a tlak, dále vysoká čistota, nízká toxicita, a nehořlavost. CO₂ jako nepolární molekula je vhodný pro extrakci nepolárních látek. Nepolární charakter přináší problém, a to v extrakci právě polárních sloučenin. Jiná média s polárním charakterem, která by se dala použít pro superkritickou extrakci (např. NH₃) mají ale řadu nevýhod. Hořlavost, toxicitu, vysoké superkritické hodnoty. Nepolárnost CO₂ se obchází přidáním modifikátoru (např. methanol, acetonitril aj.). [35]

Velkou výhodou a důvodem využívání SFE je zkrácení doby extrakce, v případě superkritické fluidní chromatografie (SFC) zkrácení času analýzy. [48]

2.2.6.1. Aplikace SFE

Superkritické fluidní extrakce využili Wang a kol. (2011) pro izolaci kumarinů z *Angelica dahurica*, což je tradiční čínské léčivo využívané k léčbě bolesti hlavy způsobené běžným nachlazením, astmatem aj. [49] Kumariny (imperatorin, isoimperatorin), jsou hlavními biologickými složkami, u kterých byly pozorovány protirakovinné, antibakteriální a „kodeinové“ účinky. [50;51] Usušené (ve vakuové sušárně) a rozmělněné kořeny rostlinného materiálu byly použity k extrakci. SFE extrakce byla provedena oxidem uhličitým po dobu 2 hodin při průtoku 25 l/h při tlaku 35 MPa a 50 °C. Extrakt z SFE byl smíchán s 50 ml petroletherem (LLE). Pro odstranění

nečistot byl roztok extrahován vodou. Finální extrakce byla provedena 60 % methanolem. Fáze byly odděleny a obsah kumarinů v methanolu byl stanoven pomocí HPLC. [52]

Jak lze vidět z uvedených příkladů aplikace, byla provedena izolace kumarinů různými způsoby extrakce. Tato práce se zabývá stavením kumarinů v destilátech, tedy by se nabízela možnost použití SPE kolonek. LLE však nebyla použita v této problematice v takové šíři. LLE je tedy zajímavou výzvou pro izolaci kumarinů z reálných vzorků.

2.3. Derivatizace

Plynová chromatografie využívá vysoké těkavosti analytů pro jejich separaci. Možnost ovlivnění těkavosti sloučenin byla zkoumána již od počátků plynové chromatografie. Tento výzkum umožnil jednak vznik inovativních chromatografických systémů, jako je vysokoteplotní plynová chromatografie, gradientova eluce s teplotním programem, superkritická fluidní chromatografie, či použití speciálních sorbentů v chromatografických kolonách, jedna umožnil vývoj metod chemické konverze cílové sloučeniny vzorku na vhodný derivát této sloučeniny. Derivatizace je výjimečný postup úpravy vzorku. V předchozích chromatografických systémech je retence solutu ovlivňována použitým charakteristickým systémem či pracovním programem. Derivatizace mění právě charakter sloučeniny jako takové. Právě kombinace plynové chromatografie a chemické derivatizace našla široký rozsah využitelnosti pro zkoumání biochemických, biomedicínských procesů a velkého počtu molekul, které by bez derivatizace nemohly být studovány plynovou chromatografií. [53]

Derivatizace se využívá i ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC). Nejrozšířenějším způsobem derivatizace v HPLC je mísení mobilní fáze (s analyty) vycházející z kolony s vhodnými činidly ve směšovací komůrce a následně v reaktoru, ve kterém dochází k vlastní reakci derivatizace. Dalšími technikami derivatizace v HPLC jsou: změna pH; použití tuhé látky (sloužící, jako vlastní reagent či nosič enzymu); fotochemické přeměny působením UV zářením a elektrochemická derivatizace. [54]

V chromatografických systémech je možná derivatizace předkolonová a postkolonová. Většina derivatizací v GC je prováděna předkolonově v „offline“ režimu. [55]

2.3.1. Důvody derivatizace

Karboxylové, hydroxylové, karbonylové, thiolové a amino skupiny, mají polární charakter, a tedy tendenci vytvářet vodíkové vazby. Následkem je jak nízká těkavost sloučenin obsahujících tyto skupiny, tak silná tendence adsorpce na nosič stacionární fáze a asymetrie eluovaných píků. Dalším problémem je tepelná či chemická nestabilita sloučenin, která zapříčiňuje ztrátu vzorku, tedy nekvantifikovatelné eluce či eluci produktů rozkladu vzorku.

Nejčastějším důvodem pro derivatizaci je již zmiňovaná změna těkavosti zkoumané látky. Přítomnost polárních skupin snižuje těkavost ještě více. Eliminací možných silných intermolekulárních interakcí polární skupiny či kompenzování jejich elektrického náboje může značně zvýšit těkavost molekuly. Zablokováním nepolárním substituentem může být získán derivát, který lze chromatografovat v plynné fázi, v kontrastu s netěkavou mateřskou molekulou. Důvod pro použití derivatizace může být i opačný, tj. snížit těkavost látky. Sloučeniny s vysokou těkavostí mohou vykazovat ztrátu v kvantifikaci, např. již během procesu přípravy vzorku. Příkladem může být analýza karboxylových kyselin ve vzorcích biologických materiálů.

Polární látky mají často tendenci se adsorbovat na chromatografický nosič nebo dochází k rozkladu při reakci s ním. Následkem je chvostování píků, což znesnadňuje či přímo znemožňuje kvantifikaci píků. To je další důvod pro využití derivatizační techniky. Asymetrie eluovaných píků může poukázat na překročení kapacity chromatografického systému. Tedy překročení kapacity stacionární fáze. V tomto případě právě chemická přeměna na derivát, s jinými adsorpčními vlastnostmi, může být prospěšná pro získání symetrického píku a možnosti pracovat v lineárním rozsahu. [53]

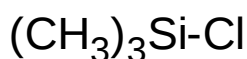
2.3.2. Používané deriváty

Již zmíněné funkční skupiny (karboxylové, hydroxylové, karbonylové, thiolové a amino), které jsou problematické pro GC stanovení, nabízí ve své podstatě řešení. Vysoká polarita těchto skupin umožňuje jejich reakci s činidly. V případě karboxylové skupiny je nejčastější derivatizační reakcí esterifikace.

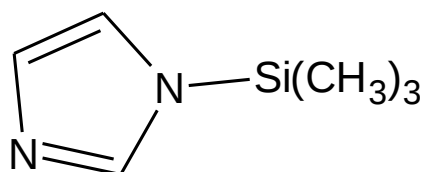
Hydroxylové skupiny mohou být derivatizovány vytvořením etherů. Snaha o vytvoření procesu, ve kterém by došlo k derivatizaci více či všech skupin v molekule v jedné reakci vedla k vývoji metod přípravy silanizovaných, acylovaných, isopropylových a jiných derivátů. [53]

2.3.2.1. Silanizační činidla

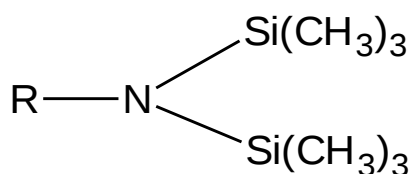
Jedná se o pravděpodobně nejpoužívanější deriváty pro netěkavé látky a pro blokování jejich funkčních skupin. Velkou výhodou těchto činidel je, že různé funkční skupiny sloučeniny jsou přeměněny v derivát v jednom kroku. K okamžitému použití jsou komerčně připravená činidla, směsi činidel a rozpouštědla dodávány pro metody na zpracování jednotlivých substrátů. [53] Mohou být používána čistá reakční činidla, či směs více činidel. Směs činidel poskytuje vyšší efektivitu při reakci se specifickou sloučeninou. Velký vliv na rychlost reakce má teplota. Zahřívání vzorku s činidlem při teplotě okolo 70 °C na 15 až 30 minut je běžně prováděno. Ačkoliv jsou silanizační derivatizační činidla oblíbená a reagují s různými funkčními skupinami, lze obecně říct, že nejlepší výsledky poskytují derivatizaci karboxylových a hydroxylových skupin. Obrázky 7-12 ukazují struktury často používaných silanizačních činidel. [55]



Obr. 12: Trimethylchlorsilan (TMCS)



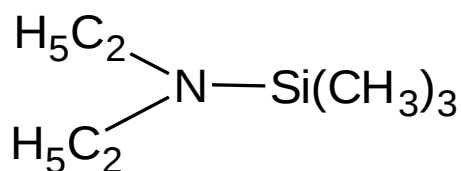
Obr. 15: Trimethylsilylimidazol (TMSIM)



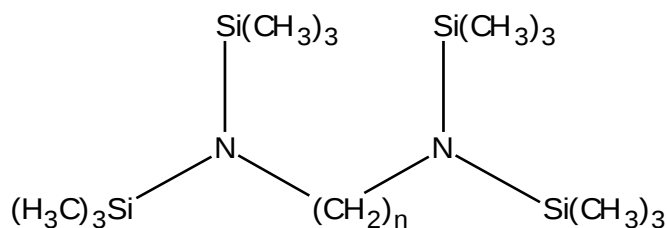
Obr. 13: N-Alkylhexamethyldisilazan



Obr. 6: Hexamethyldisilazan (HMDS)



Obr. 14: Trimethylsilyldiethylamin (TMDSEA)



Obr. 17: Tetrakis-TMS-diaminoalkan

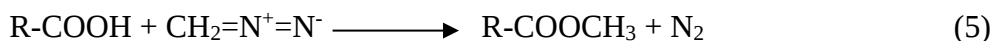
Běžně je reakce prováděna v prostředí rozpouštědla, které nemá aktivní vodík. [55] Pyridin či jiná rozpouštědla s velkou solvatační kapacitou (acetonitril, dimethylformamid) jsou často používána. Reakce probíhá v reakčních nádobkách uzavřených víčkem se silikonovým septem. Nadávkování vzorku do systému je prováděno přes septum dávkovací jehlou. [53]

Výhodná může být změna takto derivatizované sloučeniny pro její detekci za použití hmotnostní spektrometrie. Nicméně hmotnostní spektra mnoha derivátů silanizace nemusí být obsažena v knihovnách spekter. [55]

2.3.2.2. Estery

Estery jsou běžné deriváty karboxylových skupin. Nejčastěji užívané jsou methylestery, pro jejich dostačující těkavost dokonce i vyšších mastných kyselin obsažených v tucích. Je známo více metod pro přípravu methyl-esterů, elegantní metodou však jsou esterifikace diazomethanem nebo methanolovým roztokem BF₃. [53]

Diazomethanová metoda: Je popsáno více variací příprav derivátu touto metodou. Obecně lze derivatizaci popsat rovnicí (5). Základem, je příprava diazomethanu, rozkladem N-methylmočoviny, N-nitroso-N-methyl-p-toluensulfonamidu nebo další látky s podobnou konfigurací. Roztok takto připraveného diazomethanu je postupně přidávám k roztoku vzorku do trvalého žlutého zbarvení.



Methanolová metoda: zde také literatura uvádí více variací této derivatizace. Obecně derivatizaci popisuje rovnice (6). Základem metody je probublávání BF₃ methanolem. Takto připravený reagent se přidává k roztoku vzorku a směs se nechá vařit po dobu 2 minut. Po ochlazení jsou vzniklé estery extrahovány z reakční směsi diethyletherem. Extrakt je zakoncentrován při pokojové teplotě a chromatografován. Rizikem této metody jsou však nežádoucí reakce kvůli reaktivitě činidla na dvojných vazbách, nebo na reakčních centrech. [53]

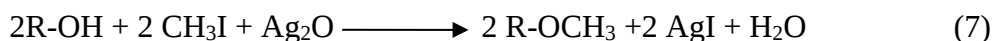


2.3.2.3. Acyl deriváty

Acyl deriváty jsou běžné deriváty hydroxylových, amino a thiolových skupin. Deriváty jsou méně polární než látky výchozí a s nahrazením aktivního vodíku skupiny podstatně klesá tendence tvořit vodíkovou vazbu. Důsledkem je zvýšení těkavosti i původně netěkavých sloučenin, nebo sloučenin termicky nestabilních. Příprava acyl derivátů nejčastěji zahrnuje reakci acylačního činidla (často anhydrid odpovídající kyseliny) v pyridinu, tetrahydrofuranu či jiném rozpouštědle schopném vázat produkovanou kyselinu. Reakční čas a teplota závisí na vlastnostech substrátu a reaktivitě použitého činidla. Může být v rozmezí od 15 minut po 1 hodinu či v případě teploty od pokojové teploty po bod varu. Při této derivatizaci je žádoucí udržovat bezvodé prostředí. [53]

2.3.2.4. Ethers

Ethers jsou používány pro blokování hydroxylové skupiny, avšak jejich význam není příliš velký a jsou využívány ve speciálních případech. Například hydroxylové skupiny polyhydroxylových sloučenin s vyšší molekulovou hmotností (např. cukry) jsou přeměny na ethers reakcí jodmethanu v přítomnosti oxidu stříbrného v dimethylformamidu, rovnice (7). [53]



2.3.2.5. Cyklické deriváty

Cyklické deriváty mohou vzniknout reakcí látky obsahující dvě funkční skupiny, s činidlem majícím také dvě funkční skupiny. Například cis-dioly (v polohách 1,2 nebo 1,3) mohou být derivatizovány alkylboronou kyselinou. Reakce probíhá v prostředí ethyl-acetátu či pyridinu. Díky charakteristickým hmotnostním spektrům jsou vhodné pro analýzu v kombinaci s hmotnostní spektrometrií.

Vhodným diaminem může být derivatizována molekula obsahující karboxylovou a karbonylovou skupinu v α -poloze. Reakcí vzniká heterocyklus, který nemá vhodné vlastnosti pro analýzu pomocí GC. Následuje modifikace takto vzniklé molekuly silanizací. Vlastností vhodných pro analýzu detektorem elektronového záchytu (ECD) může být dosaženo použitím diaminu substituovaného halogeny na benzenovém jádře. Přítomnost hydroxylové a α -amino skupiny v molekule zvyšuje možnost přípravy cyklických derivátů. [53]

2.3.2.6. Chirální deriváty

Obecně existují dva postupy separace enantiomerů chromatografií. Za prvé je to separace na opticky aktivní stacionární fázi. Za druhé jde o přípravu diastereomerního derivátu, který lze separovat na ne-chirální stacionární fázi. Derivatizace zahrnuje reakci enantiomerů s čistým enantiomerem chirálního derivatizačního činidla (CDA) za vzniku dvou diastereomerních derivátů. Diastereomery mají odlišné fyzikální vlastnosti a reaktivitu. [56]

2.4. Metody kvantitativního vyhodnocení

2.4.1. Metoda vnějšího standardu

Metoda také známá jako metoda kalibrační křivky je založena na měření série standardů o různé, ale známé koncentraci v definovaném rozmezí. Výsledkem je nalezení závislosti kalibrační funkce, a neznámá koncentrace analytu je určena pomocí vyhodnocovací funkce. Nejvýhodnější je pracovat s takovou sérií a metodou, při které je získána lineární funkce. Lineární funkce dává nejspolehlivější výsledky. Lineární závislost je dána rovnicí (8) ve které b je směrnice kalibrační přímky a vyjadřuje citlivost metody, a je úsek. [38]

$$x_i = a \pm bc_i \quad (8)$$

Metoda není vhodná pro analýzu složek složitých matric. Je vhodná pro stanovení, jsou-li vzorky i standardy svými vlastnostmi rovnocenné.

2.4.2. Metoda standardního přídávku

Tato metoda se využívá v případě práce s analytem ve složité matrici, kterou nelze napodobit. Dochází ke spíkování vzorku. Vzorek po homogenizaci je rozdělen na dvě části. Jedna část je analyzována podle dané metody. Ke druhé části je přidáno známé množství standardu analytu. Za předpokladu lineární závislosti jsou odezvy těchto měření použity pro výpočet koncentrace analytu. [40]

2.4.3. Metoda vnitřního standardu

Principem této metody je přidavek přesně známé koncentrace vnitřního standardu k roztoku analytu a k roztoku standardu. Vnitřní standard musí být látka, dobře oddělená od všech složek a měla by být eluována v blízkosti stanovované složky. Výhodou je interní standard s fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobnými analytu. [38]

Metodou vnitřního standardu se dosahuje nejvyšší přesnosti pro kvantitativní vyhodnocení při analýze plynovou chromatografií. Má výhodu kompenzace jistých chyb měření, které ovlivňují výsledný výstup všech interferentů a analytů stejně, např. kolísání průtoků, tlaku aj. [40]

Koncentrace analytu c_i ve vzorku se vypočte podle rovnice (9)

$$c_i = (A_i/A_{IS}) * c_{IS} * f_i \quad (9)$$

Kde A_i značí plochu analytu a A_{IS} plochu interního standardu, c_{IS} je koncentrace interního standardu a f_i je odezvový faktor dané látky. Odezvový faktor se vypočte z rovnice (10).

$$f_i = (A_{IS}/A_i) * (c_i/c_{IS}) \quad (10)$$

3. Experimentální část

3.1.1. Chemikálie, přístroje a pomůcky

4-methyl-umbelliferon (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Aceton (Penta, Praha, ČR)

BSTFA (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Dichlormethan (Penta, Praha, ČR)

Diethylether (Penta, Praha, ČR)

Esculetin (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Ethyl-acetát (Bc-Chemservis, Rožnov pod Radhoštěm, ČR)

Ethyl-formiát (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Fraxetin (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Heptan (Penta, Praha, ČR)

Hexan (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

HMDS (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Chloroform (Penta, Praha, ČR)

Chrysene-d₁₂ (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Isooktan (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Methanol (Penta, Praha, ČR)

Methylisobutylketon (Loba-Chemie indo Austranal co, Indie)

Methyl-terc-butylether (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

m-nitrofenol (Loba Fienchemie GmbH, Fischamend, Rakousko)

Pyridin (Penta, Praha, ČR)

Scopoletin (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Toluen (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Umbelliferon (Sigma Aldrich, St. Louis. Missouri, USA)

Centrifuga 5702 (Eppendorf, Hamburk, Německo)

Agilent Technologies 7890A GC systém (Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA)

Hettich Centrifuga Mikro 120 (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Blokový termostat SBH130 (Stuart, stone, Staffordshire, Velká Británie)

Heidoplh třepačka Reax Top (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Automatické pipety Eppendorf, plastové špičky, plastové Eppendorf zkumavky, vialky.

3.2. GC-MS analýza

Vzhledem k tomu, že se kumariny vyskytují v rostlinných, ale i dřevinných zdrojích, byly vybrány vzorky destilátů, které zrají v dřevěných sudech. Byly vybrány vzorky karibského rumu, koňaku a whisky.

Pro ověření možnosti či nemožnosti **přímé** analýzy na GC-MS byly připraveny standardy kumarinů. Byly připraveny zásobní roztoky navážením 1 mg standardu kumarinu; umbelliferonu; 4-methylumbelliferonu; skopoletinu; eskuletinu a fraxetinu a rozpuštěním v 1 ml methanolu. Připravené zásobní roztoky byly naředěny na koncentraci 50; 100 a 200 µg/ml a byla provedena analýza pomocí GC-MS

3.3. Úprava vzorku

Jelikož se tato práce zabývá vzorky alkoholických nápojů s bohatou matricí vlivem přípravy a zrání, byla zvolena extrakce, jako vhodná technika pro lepší izolaci hledaných kumarinů. Pokusy o optimalizaci úpravy vzorky byly provedeny na rumu *Dos Maderas P.X. 5+5*.

Prvním extrakčním činidlem byl ethyl-acetát, jakožto typické extrakční činidlo. K 5 ml vzorku rumu (v plastové zkumavce eppendorf) bylo přidáno 10 µl standardu o koncentraci (10 µg/ml) kumarinů. Do druhé zkumavky obsahující 5 ml vzorku nebyly přidány standardy. K roztokům byl přidán 1 ml ethyl-acetátu. Zkumavky byly protřepány a následně bylo přidáno 2,5 ml nasyc. roztoku NaCl pro vysolení. Zkumavky byly centrifugovány 2 min při 4400 RPM na centrifuze 5702 Eppendorf. Byla odebrána horní fáze do skleněných vialek. Do zkumavek byl opět přidán ethyl-acetát a extrakce byla provedena znova. Po centrifugaci byly odebrány horní fáze do příslušných vialek. Vialky byly zahřívány na topném bloku STUART 130 při 80 °C do sucha za současného odfoukávání dusíkem. K odparku bylo přidáno 100 µl pyridinu a 100 µl hexamethyldisilazanu (HMDS). Vialky byly uzavřeny krimpovacím víčkem a hodinu zahřívány při 80 °C. Po ochlazení byly roztoky doředěny 300 µl hexanu.

Jako další extrakční činidla, před detailnějším pohledem na vhodné činidlo, byla vybrána dvojice dichlormethan a chloroform. Nyní bylo použito menšího objemu vzorku. Do 4 plastových eppendorfků byl odpipetován 1 ml vzorku rumu. Do dvou zkumavek byl přidán přídatek 10 µl standardu kumarinů (10 µg/ml). Zkumavky byly uskupeny do dvojic obsahujících zkumavku s přídatkem a bez přídatku. Do jedné dvojice bylo odpipetováno 0,5 ml dichlormethanu a do druhé dvojice 0,5 ml chloroformu. Zkumavky

byly protřepány a následně centrifugovány na centrifuze Mikro 120 po dobu 2 minut při otáčkách 14 000 RPM. Do připravených vialek byla po centrifugaci odebrána spodní vrstva. Extrakce byla provedena ještě jednou se stejnými činidly. Po centrifugaci byly opět spodní fáze odebrány do určených vialek. Odebrané fáze byly zahřívány při 80 °C za současného odfoukávání dusíkem do sucha. K odparkům bylo přidáno 100 µl pyridinu a 100 µl HMDS. Vialky byly uzavřeny a hodinu při 80 °C zahřívány. Po ochlazení byl obsah vialek naředěn 300 µl hexanu.

Dalším krokem, již kvůli detailnějšímu pohledu, byla analýza vlivu rozpouštědla pro finální ředění, na analyty a vliv počáteční teploty programu měření. Do jedné eppendorfky obsahující 1 ml rumu bylo přidáno 10 µl standardu kumarinů o koncentraci (10 µg/ml) a do druhé zkumavky byl přidán pouze 1 ml rumu. Takto byly připraveny tři dvojice. Do všech připravených zkumavek bylo přidáno 0,5 ml dichlormethanu a bylo s nimi pracováno, jak je popsáno výše. Pouze ve finálním kroku byla jedna dvojice naředěna 300 µl pyridinem, druhá toluenem a třetí heptanem. Dále byla nastavena metoda pro počáteční teplotu 50; 70 a 90 °C.

3.3.1.Výtěžnost extrakce

Doposud byly dané vzorky vždy extrahovány dvakrát. Pro ověření tohoto postupu a jeho výhody byla zkoumána výtěžnost extrakce. Do zkumavky byl odpipetován 1 ml rumu, do kterého bylo přidáno 10 µl ze zásobních standardů kumarinů (1 mg/ml). Bylo přidáno 0,5 ml dichlormethanu. Roztok byl protřepán a následně centrifugován po dobu 2 minut při 14 000 RPM. Byla oddělena spodní fáze do určené vialky. Opět bylo přidáno do zkumavky 0,5 ml dichlormethanu a po centrifugaci byla spodní fáze odebrána do prázdné vialky. Extrakce byla provedena pětikrát a každá odebraná fáze byla odebrána do prázdné, čisté vialky. Následně s vialkami po extrakcích bylo zaházeno stejně, tedy odpaření do sucha, přídavek 100 µl pyridinu a HMDS, hodinové zahřívání při 80 °C a naředění 300 µl heptanem. Jednotlivé vialky byly analyzovány na GC-MS.

3.3.2.Vliv prostředí

Pro další práci byl vytvořen zásobní naředěný roztok kumarinů o koncentraci 200 µg/ml. Připraven byl odebráním 20 µl každého z kumarinů (umbelliferon, 4-methylumbelliferon, scopoletin, esculetin a fraxetin) o koncentraci 1 mg/ml bez následného ředění.

Jelikož pH a přítomnosti soli jsou faktory ovlivňující extrakci bylo provedeno zkoumání vlivu prostředí na efektivitu extrakce. Byla připravena pětice zkumavek obsahující 0,5 ml vzorku rumu a přídavek 1 μ l směsného roztoku kumarinů (200 μ g/ml). Druhá sada pětice obsahovala 0,5 ml vzorku rumu. Opět byly vytvořeny dvojice o uskupení vzorek a vzorek s přídavkem. Do každé dvojice bylo odpipetováno 0,5 ml příslušného roztoku pro úpravu prostředí. Zkoumaná prostředí byla: voda; nasyc. roztok NaCl; fosfátový pufr o pH 2,2; fosforečnanový pufr o pH 12; koncentrovaná HCl. Vzorky byly promíchány. Následně do nich bylo přidáno 0,5 ml dichlormethanu a postup úpravy byl stejným způsobem, s použitím heptanu jako finálního zředovacího rozpouštědla.

Následně bylo provedeno zkoumání vlivu kombinace kyselého prostředí s vysolovacím efektem. Do jedné dvojice zkumavek byl odpipetován 1 ml rumu. Dále byly připraveny dvě dvojice obsahující 0,5 ml rumu a opět jedna zkumavka z dvojice s přídavkem 1 μ l kumarinů (200 μ g/ml). Do druhé dvojice bylo odpipetováno 0,5 ml vody a do třetí bylo přidáno nasyc. roztoku NaCl okyseleného koncentrovanou HCl (44 μ l HCl (35 %) + 456 μ l nasyc. NaCl). Připravené roztoky byly promíchány a extrahovány 0,5 ml dichlormethanem. Vzorky byly dále upraveny podle postupu popsání výše. Opět při finálním ředění byl použit heptan.

3.3.3.Volba extrakčního činidla

Volba solanky a kyselého prostředí otevřela možnost použití dalších extrakčních činidel, která by bez tohoto prostředí nemusela oddělovat svá fázová rozhraní (např. ethyl-acetát). V rámci optimalizace úpravy vzorku byla sada zkumavek obsahující 0,5 ml rumu, 1 μ l kumarinů (200 μ g /ml) a 44 μ l HCl (35 %) s 456 μ l nasyc. NaCl extrahována různými rozpouštědly. Bylo napipetováno 0,5 ml vybraných zkoumaných činidel: hexan; isooktan; diethylether; chloroform; dichlormethan; methyl-terc-butylether, ethyl-acetát; toluen; ethyl-formiát; methylisobutylketon. Takto připravené roztoky byly extrahovány a upravovány stejným způsobem, jak bylo uvedeno výše.

3.3.4.Volba derivatizačního činidla

Dalším parametrem optimalizace úpravy vzorků byla volba derivatizačního činidla. Práce se zabývá silanizačními činidly, jakožto činidly s vysokou variabilitou funkčních skupin pro derivatizaci. Z tohoto důvodu bylo vybráno jako další možné činidlo BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid).

Byly opět vytvořeny dvě dvojice obsahující 0,5 ml rumu a jedna z dvojice s přídavkem 1 µl kumarinů (200 mg/ml). Bylo upraveno prostředí přidáním 44 µl HCl (35 %) a 456 µl nasyc. NaCl. Extrahovány byly přídavkem 0,5 ml dichlormethanu. Po protřepání následovala centrifugace 14 000 RPM po dobu 2 minut a následné odebrání spodní fáze. Extrakce byla opakována a opět po extrakci byla odebrána spodní fáze. Odebrané fáze byly zahřívány a odpařovány do sucha pod inertním dusíkem. Následně bylo přidáno 100 µl pyridinu a 100 µl HMDS do jedné dvojice a do druhé dvojice 100 µl BSTFA. Vialky byly uzavřeny a hodinu při 80 °C zahřívány. Po ochlazení byly naředěny 300 µl heptanu.

3.3.5.Finální úprava

K 0,5 ml odebraného vzorku bylo přidáno 44 µl HCl (35 %) a 456 µl nasyc. NaCl. Vzorek byl extrahován přidáním 0,5 ml dichlormethanu. Roztok byl promíchán třepáním a promísáním na třepačce Reax Top. Roztok byl následně centrifugován po dobu 2 minut při 14 000 RPM. Pipetou byla odebrána spodní fáze. Postup s daným vzorkem byl opakován ještě jednou. Odebraná spodní fáze byla při 80 °C odpařena do sucha, za současného foukání inertním dusíkem. Po odpaření bylo do vialky přidáno 100 µl pyridinu a 100 µl HMDS. Vialka byla uzavřena a hodinu při 80 °C zahřívána. Následně bylo přidáno 300 µl heptanu. V případě vzniku malých sraženin, částec, které by mohly ucpat dávkovací jehlu, byla provedena další centrifugace a odebrání kapalně části do nové vialky.

3.3.6.Vliv retenčního gapu

Po nalezení optimální úpravy vzorku byla na přístroji vyměněna kolona. Kolona s totožnou stacionární fází, avšak hlavní rozdíl byl v přítomnosti 5 m retenčního gapu. Byl zkoumán vliv tohoto retenčního gapu na retenční časy a na chování analytů při různých počátečních teplotách programu. Zkoumány byly teploty: 110; 100; 90; 80; 70; 60; 50 °C.

3.4. Kvantifikace

Po optimalizaci úpravy vzorků byla zkoumána řada kvantifikačních metod a jejich vhodnost a pravdivost. Pro přídavek standardů do vzorků či standardů kalibrační závislosti byl připraven zásobní směsný roztok odebráním 200 µl skopletinu (1 mg/ml) a 20 µl umbelliferonu, 4-methylumbelliferonu, eskuletinu a fraxetinu (1 mg/ml) do 1 ml

methanolu. Pro zkoumání metod kvantifikace na reálném vzorku byl vybrán vzorek karibského rumu *Dos Maderas* P.X. 5+5.

3.4.1. Metoda standardního přidavku

Byla použita metoda spikování vzorků standardy kumarinů. Byly připraveny tři zkumavky, všechny obsahující 0,5 ml vzorku karibského rumu. Do druhé zkumavky byl přidán 1 μ l standardu kumarinů (200 μ g/ml) a do třetí 2 μ l stejného standardu. Dále bylo prostředí vzorků upraveno přidavkem 44 μ l HCl (35 %) a 456 μ l nasyc. roztoku NaCl. Vzorky byly extrahovány dichlormethanem a upraveny, jak je popsáno v kapitole Finální úprava.

3.4.2. Metoda vnějšího standardu

Další metodou byla metoda kalibrační závislosti. Byl připraven zředěný roztok o koncentraci 5 μ g/ml (pro skopoletin), odebráním 25 μ l směsného roztoku (200 μ g/ml pro skopoletin) do 1 ml.

Kalibrační řada byla připravena odpipetováním příslušných objemů (Tab. I) ze směsného a zředěného roztoku kumarinů do 50 % ethanolu pro napodobení prostředí rumu. Do roztoků bylo přidáno 44 μ l HCl (35 %) a 456 μ l nasyc. roztoku NaCl. Roztoky byly upraveny jako vzorky tedy extrahovány 0,5 ml dichlormethanem, odebráním spodních fází, následné odpaření do sucha a silanizací za použití HMDS v pyridinu a zředění 300 μ l heptanu.

Tab. I: Příprava kalibrační řady

Koncentrace (μ g/ml)	Odebraný objem (μ l)	Použitý odebraný roztok (μ g/ml)
0,04	4	5
0,1	10	5
0,2	20	5
0,4	40	5
1	1	200
2	5	200

3.4.3. Metoda vnitřního standardu

Byl připraven zásobní roztok izotopově značeného standardu Chrysenu-d₁₂, navážením 1 mg a rozpuštěním v 1 ml acetonu. Dále byl připraven standard, podléhající derivatizaci a to m-nitrofenol. Připraven byl navážením 1 mg a rozpuštěním v 1 ml

methanolu. Zásobní roztoky byly zředěny na koncentraci 200 µg/ml. Byla připravena kalibrační řada, jak je popsáno výše (Tab. I), do každé vialky bylo odpipetováno 2,5 µl standardu m-nitrofenolu a chrysenu-d₁₂ (200 µg/ml). Stejný objem byl také přidán do roztoků vzorků před procesem extrakce.

3.4.4. Opakovatelnost

Po vyhodnocení kvantifikačních metod byla připravena série pro získání informace o odchylkách daných metod pro n vzorků. Byla připravena sada 5 zkumavek obsahujících 0,5 ml vzorku *Dos Maderas P.X. 5+5* a dalších 5 zkumavek s obsahem 0,5 ml *Dos Maderas P.X. 5+5* a 1 µl směšného roztoku kumarinů (200 µg/ml pro skopoletin). Takto připravené roztoky byly upraveny a extrahovány, jak bylo popsáno dříve. Byly provedeny tři nástriky do GC-MS z každé vialky.

3.5. Analýza reálných vzorků

Množství kumarinů obsažených v reálných vzorcích bylo zkoumáno na sadě různých druhů rumu, koňaku a whisky.

Ze vzorků rumů byly vybrány: *Pyrat XO Reserve* (0,7l 40 %); *Old Pascas Dark Rum* (0,7l 37,5 %); *Ron Zacapa Centenario 23* (1l 40%); *Don Papa 7y* (0,7l 40%); *Ron Cubay 10 Anejo* (0,7l 40%); *Royal Danish Navy Rum* (7l 55 %); *Božkov Tuzemský*; *Technologický vzorek rumu X*, *Technologický vzorek rumu A* a *Technologický vzorek rumu B*

Ze vzorků koňaků byly vybrány: *De luze vsop* (40 % 0,7l); *Camus Ile de Ré Fine Island* (0,7 l 40 %); *Claude Chatelier XO* (0,7 l 40 %) a *Armagnac Chateau du Tariquet Carafe XO Reserve* (0,7 l 40 %)

Ze vzorků whisky byly vybrány: *Tomatin 8 YO* (1 l 40 %); *Laphroaig 10 YO* (0,7l 40 %); *Caol ila 12 YO* (0,7 l 43 %); *Irisch mist honey liquer* (1 l 35 %); *Koval Millet* (0,5 l 40 %); *Scarabus 10 YO* (0,7l 57 %); *Hankey Bannister 12 YO* (0,7l 40 %); *Nikka Taketsuru Pure Malt* (0,7 l 43 %); *Scallywag blended malt scotch whisky* (0,7l 46 %)

Bylo odebráno 0,5 ml z každého vzorku. Dalších 0,5 ml do zkumavky s přídatkem standardů kumarinů (1 µl směšného roztoku (200 µg/ml pro skopoletin)). Prostředí všech zkumavek bylo upraveno podle kapitoly Finální úprava. Po zředění heptanem byly vzorky analyzovány na GC-MS a obsah kumarinů byl vyhodnocen zkoumanými kvantifikačními metodami.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Možnost GC-MS analýzy

Nástřikem jednotlivých zředěných standardů kumarinů byla potvrzena teorie vycházející z kapitoly 2.3.1. V kapitole je vysvětleno, že látky obsahující polární skupiny jsou hůře analyzovatelné pomocí GC-MS. Jak ukazuje Obr. 26 standardy neposkytují odezvu. Pouze kumarin při koncentraci 100 µg/ml vykazoval náznak signálu.

Z tohoto důvodu byla provedena derivatizace, a to konkrétně silanizace. Byla vybrána silanizační derivatizace z důvodu rychlé reakce a širšího portfolia derivatizovatelných funkčních skupin, jak pojednává kapitola **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..** Derivatizace standardů byla provedena činidlem BSTFA. Jak ukazuje Obr. 27 derivatizované standardy již poskytují signál. Dále v práci však bylo pracováno s činidlem HMDS, které je jedno z nejpoužívanějších činidel, rychle reagující s různými skupinami.

4.2. Úprava vzorku

Během prvního pokusu úpravy reálných vzorků byla zjištěna nevýhoda použití ethyl-acetátu. Nevýhodou bylo nutnost použití vysolovacího efektu nasyc. roztokem NaCl, protože nedocházelo k oddělení fází. Další nevýhodu ukázala analýza výsledného roztoku, a to nesymetrické píky.

V druhém zkoumání vhodnějšího extrakčního činidla byl použit chloroform a dichlormethan. Tato rozpouštědla jsou těžší než voda, a tedy byla odebírána spodní fáze. Odebrání spodní fáze je jednodušší a je také zatíženo menší pravděpodobností nechtěného odebrání nežádoucí (horní) vrstvy, než tomu bylo při odebrání horní vrstvy v případě ethyl-acetátu. Z těchto dvou extrakčních činidel byl vybrán dichlormethan, jako vhodnější činidlo. Výsledky analýzy totiž ukázaly, že byly získány píky lepší odezvy a symetrie.

Vzorky dosud ředěné hexanem vykazovaly štěpení při zvyšující se teplotě chromatografického systému. Z toho důvodu byly připraveny vzorky, které byly při finální úpravě ředěny jinými rozpouštědly (heptan, pyridín, toluen). Píku nejlepší symetrie pro scopoletin bylo dosaženo při použití heptanu, jak ukazuje Obr. 28. Při použití pyridinu docházelo k rozštěpení píku a při použití toluenu byl získán nesymetrický

pík. Chování použitých rozpouštědel bylo sledováno i v závislosti na počáteční teplotě chromatografického systému (50; 70; 90 °C). Při nízké teplotě, tj. 50 °C docházelo ke štěpení ve všech rozpouštědlech, jak ukazuje Obr. 29 a tedy tato teplota se ukázala jako nevhodná. Již komentovaný Obr. 28 zobrazuje chování píků při 70 °C. A při 90 °C (Obr. 30) byly získány relativně symetrické píky pro všechna rozpouštědla. Pík nejlepší symetrie a nejvyšší odezvy byl však pro skopoletin nařazený heptanem. Získané informace tedy vedly k závěru použití heptanu, jako finálního zředovacího rozpouštědla. Srovnání chování píků skopoletinu v heptanu při různých teplotách lze vidět na Obr. 31. Na tomto obrázku lze vidět, že k nejvyšší odezvě píku skopoletinu dochází při 90 °C. Z tohoto důvodu byla metoda nastavena na počáteční teplotu 90 °C.

4.2.1. Výtěžnost extrakce

Práce stále byla provedena tak, že byl vzorek podroben extrakci dvakrát. Pro potvrzení či vyvrácení nutnosti dvojité extrakce byla provedena analýza pěti extrakčních frakcí z jedné zkumavky. Jak ukazuje Tab. II, frakce z druhé extrakce vykazuje výtěžnost extrakce 98,42 %. Při první extrakci je získána efektivita extrakce 87,08 %. Tedy podrobit vzorek dvojité extrakce má z pohledu výtěžnosti dostačující význam.

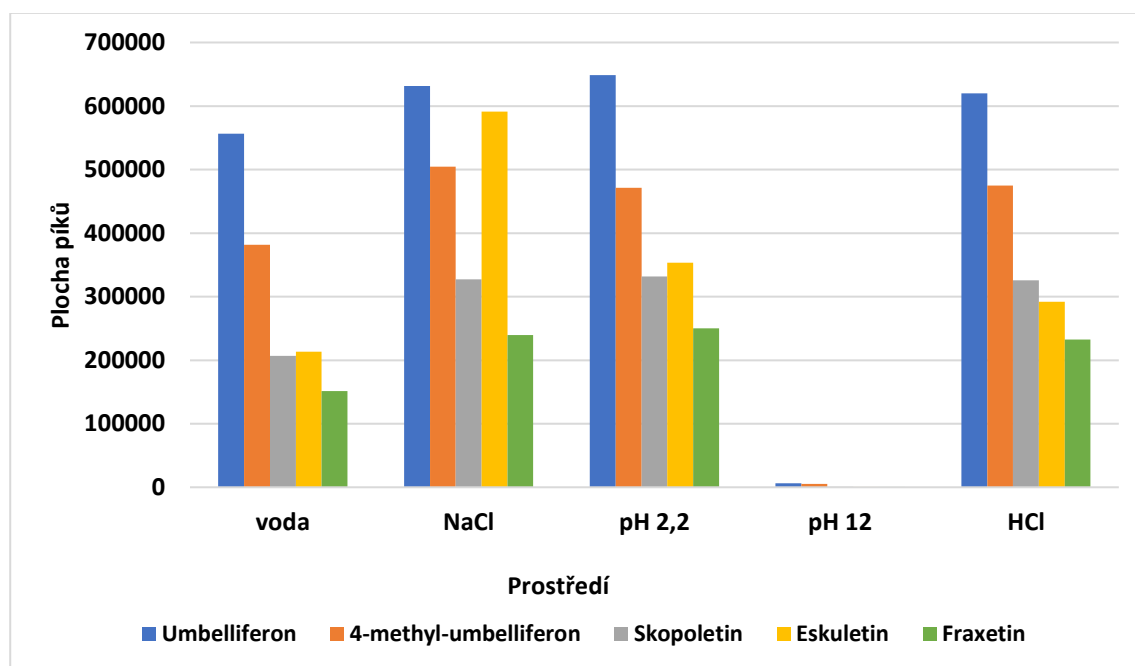
Tab. II: Vyhodnocení výtěžnosti pěti extrakcí skopoletinu, TMS, s přídatkem 10mg/ml (SIM, 264 m/z)

n-extrakce	Plocha píku	Průměr ploch	Recovery	Kumulativně
1. Extrakce	13073182	12841377,667	0,8708	0,8708
	13044477			
	12406474			
2. Extrakce	1687865	1658862,333	0,8777	0,9842
	1659732			
	1628990			
3. Extrakce	212114	202906,333	0,9268	0,9988
	199133			
	197472			
4. Extrakce	14558	14846,333	0,8720	0,9999
	15009			
	14972			
5. Extrakce	1825	1899,667		
	2073			
	1801			

4.2.2. Vliv prostředí

Následující obrázky zobrazují získané plochy píků kumarinů pro daná prostředí. Z předpokladu disociace kumarinů byl zkoumán vliv prostředí: zředění, vysolení, kyselého a zásaditého pH. Z Obr. 18 je zřejmé, že kyselé prostředí zvyšuje výtěžnost extrakce a podporuje disociaci kumarinů. Na druhou stranu pufr o zásaditém pH radikálně snižuje výtěžnost extrakce.

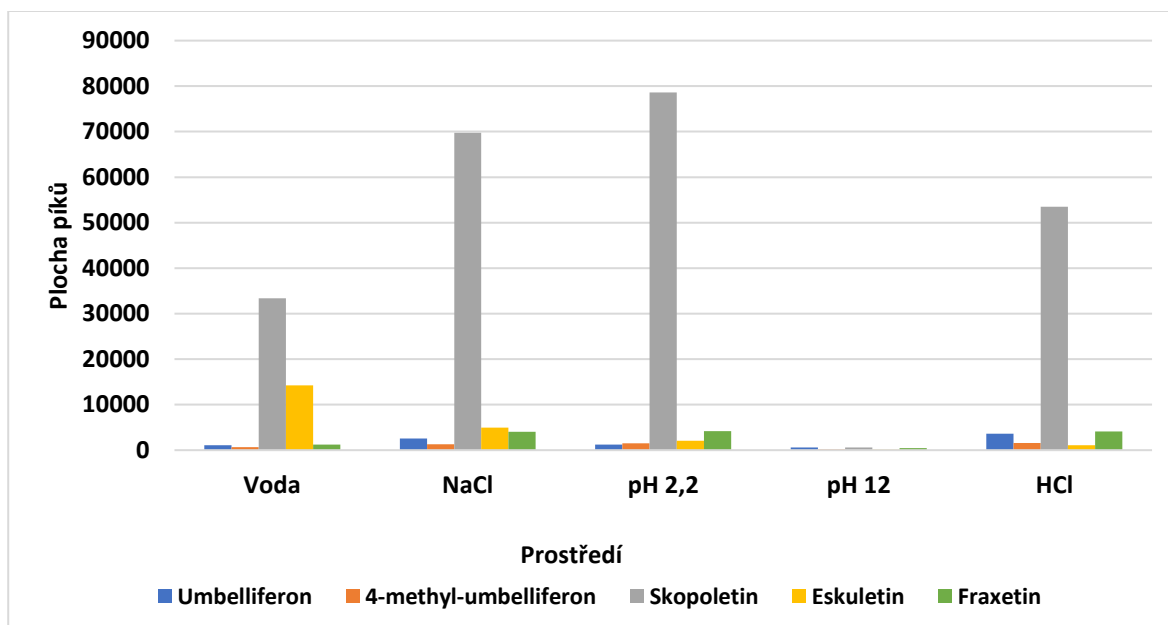
Z Obr. 18 zobrazujícího roztoky vzorku s přidavkem standardů, je patrné snížení ploch píků v zásaditém prostředí. Proto se práce dále zásaditým prostředím nezabývala. Zvýšená pozornost byla věnována kyselému a solnému prostředí. Kyselý pufr či přímo použití kyseliny chlorovodíkové vede ke zvýšení extrakce. Rozdíl mezi kyselým pufrem a HCl není nijak markantní a je dosaženo podobných výsledků. Hlavní rozdíl přichází v prostředí NaCl. Lze vidět značné zvýšení plochy píků hlavně pro eskuletin. Dále také došlo k minoritnímu zvýšení pro 4-methyl-umbelliferon.



Obr. 14: Vliv prostředí na extrakci vzorků s přidavkem standardů

Obr. 19 ukazuje, jaký vliv má prostředí na vzorky bez přidavku standardů. Z obrázku je patrné, že největší zastoupení ve vzorku rumu má skopoletin. V případě čistých vzorků je opět potvrzeno nevyhovující použití zásaditého prostředí kvůli značnému snížení extrakční účinnosti. Oproti Obr. 18 lze vidět, že nejvyššího signálu eskuletinu se nedosahuje při vysolení ale při zředění vodou. Byť by tedy mohla být použita pouze voda, i zde jsou vidět výhody kyselého prostředí a použití solanky.

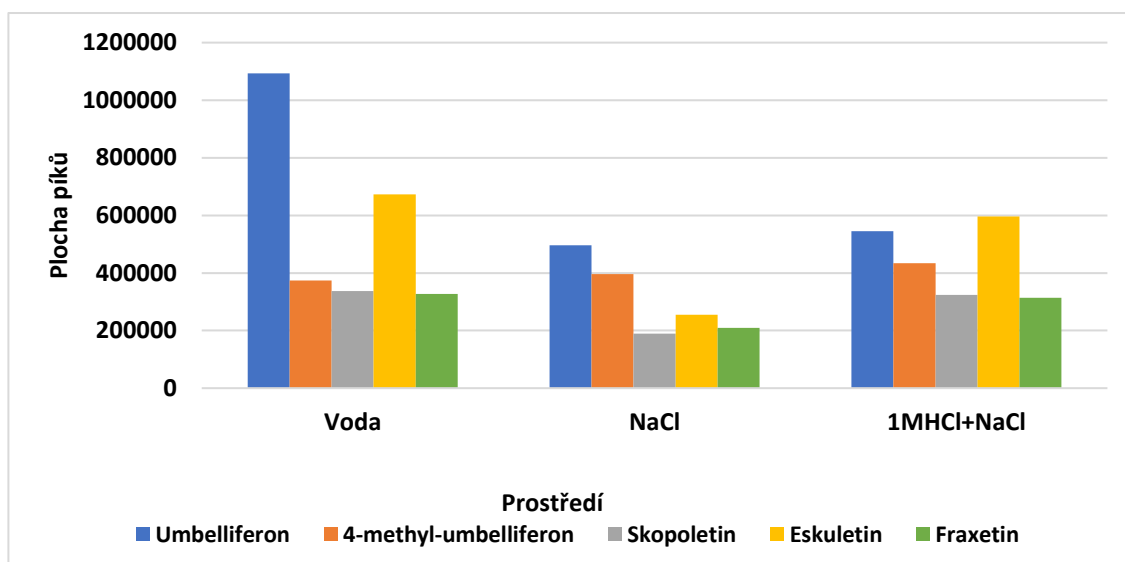
Dochází ke zvyšování ploch píků, hlavně skopoletinu, kdežto v případě vodného prostředí dochází ke zvyšování pouze eskuletinu. Přínos zředění ovšem zůstává zachován, jelikož pro vysolení se použil nasycený vodný roztok NaCl.



Obr. 15: Vliv prostředí na extrakci nativních vzorků

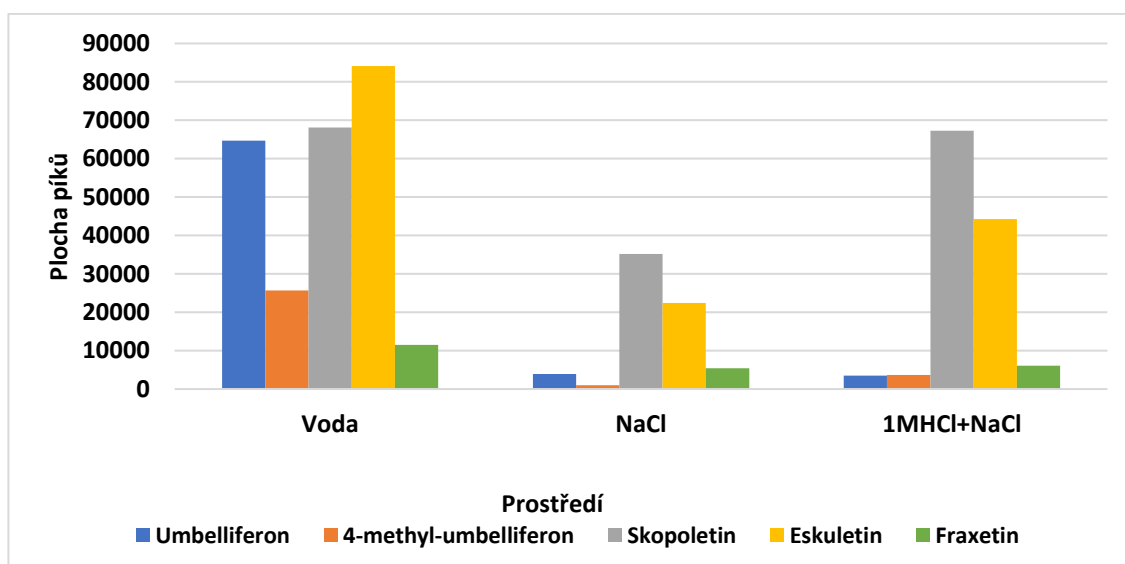
Jak bylo popsáno při vyhodnocení Obr. 18, kyselé prostředí a vysolení má pozitivní vliv na extrakci. Z toho důvodu byla zkoumána kombinace nasyc. roztoku NaCl a koncentrované HCl.

Obr. 19 graficky zobrazuje vliv zředění a okyseleného roztoku solanky a je z něj patrné, že použití vysolení v kyselém prostředí má pozitivní vliv. Jak bylo vypořádováno z Obr. 18, i zde dochází k výraznému zlepšení extrakce pro eskuletin. Tyto pozitivní vlastnosti podpořily úvahu a postup, pracovat se vzorky v kyselém prostředí za současného vysolení nasyc. roztokem NaCl. Práce s nasyc. roztokem má zároveň výhodu v rozšíření možných extrakčních činidel. Jak bylo zjištěno při výběru takového činidla, právě ethyl-acetát se fázově neodděloval, dokud nedošlo k přidání jistého množství solanky.



Obr. 16: Zobrazení vlivu vody a kyselé solanky na extrakci vzorku s přidavkem standardů

Obr. 21 ukazuje vliv zkoumaných prostředí na extrakci vzorků bez standardů kumarinů. Jako v případě Obr. 20 je potřeba brát v úvahu, že vzorek čistého rumu měl dvojnásobný objem (nebyl zředěn) a tedy vykazuje vyšší hodnoty. Opět je zde potvrzeno, že použití kombinace kyseliny a solanky zvyšuje výtěžnost, zejména skopoletinu a eskuletinu. Tyto poznatky opět podporují předchozí získané úvahy o použití takové kombinace vhodné pro úpravu vzorků.

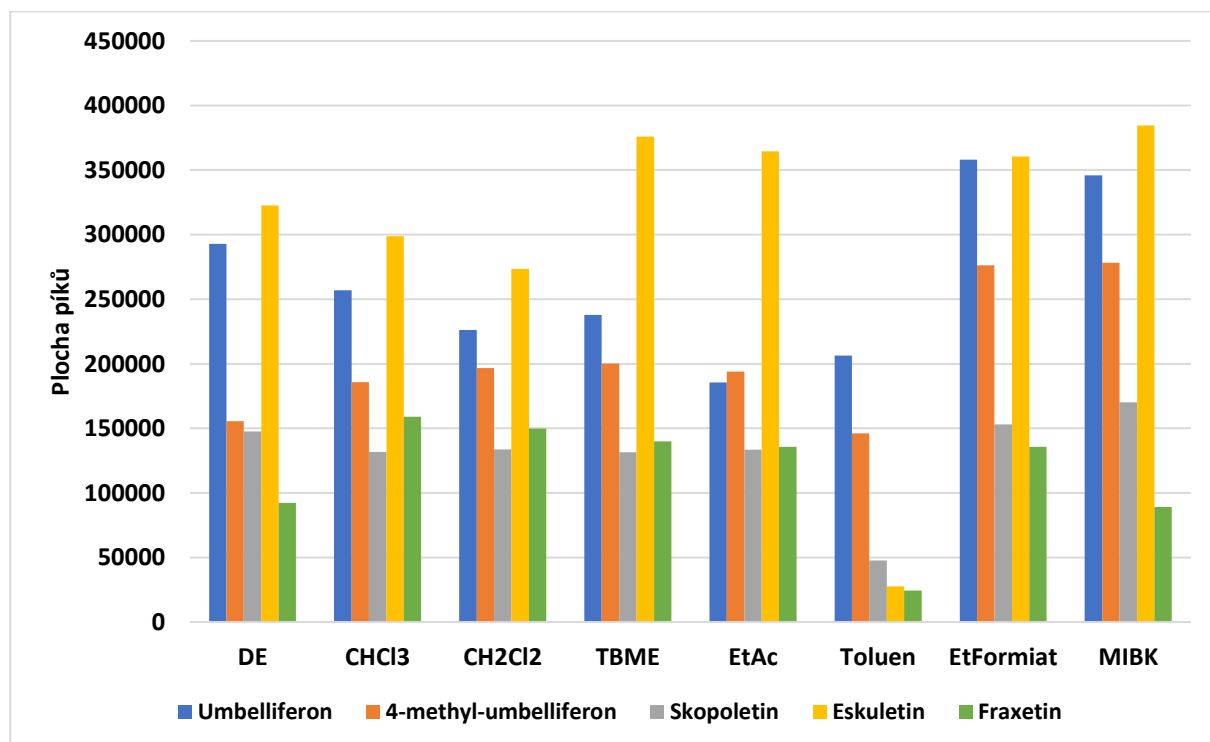


Obr. 17: Zobrazení vlivu vody a kyselé solanky na extrakci nativních vzorků

4.2.3. Volba extrakčního činidla

Finální volba použití solanky a HCl pro úpravu prostředí a zvýšení efektivity extrakce otevřela možnost použití dalších extrakčních činidel. Jak třeba právě v prvním pokus bylo zjištěno ethyl-acetát se fázově od vzorku bez přítomnosti solanky neodděluje. Bylo zjištěno, že z použitých rozpouštědel hexan a isooktan neextrahují dané látky, jak lze vidět v Tab. XV nebyly dané kumariny detekovány (ND).

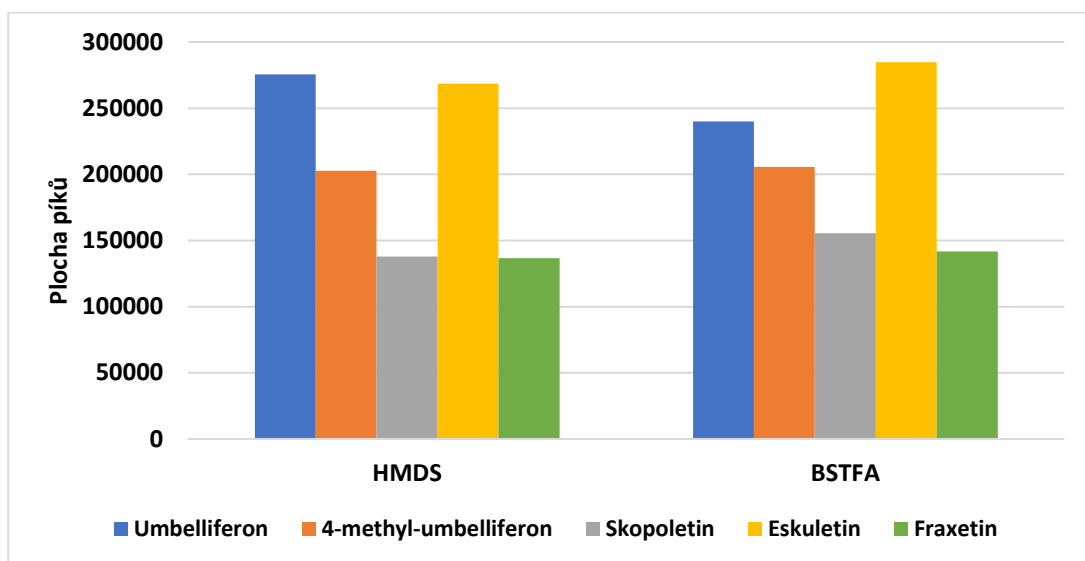
Tab. XV, graficky zobrazená na Obr. 22. Na první pohled je zřejmé, že toluen není vhodným extrakčním činidlem z důvodu nízkých ploch píků. Ostatní činidla vykazují minoritní změny vůči sobě, kromě poslední dvojice (ethyl-formiát a methylisobutylketon). Poslední dvojice vykazuje zlepšení extrakce umbelliferonu, methyl-umbelliferonu a esculetinu. Nevýhodou methylisobutylketonu je však vyšší teplota varu (116 °C). Ethyl-acetát zvyšuje extrakci eskuletinu, avšak extrakce umbelliferonu a 4-methyl-umbelliferonu snižuje. Pro nepříliš velké rozdíly ostatních extrakčních činidel byl pro práci dále vybrán dichlormethan, který přináší výhodu nízké teploty varu (39,6 °C).



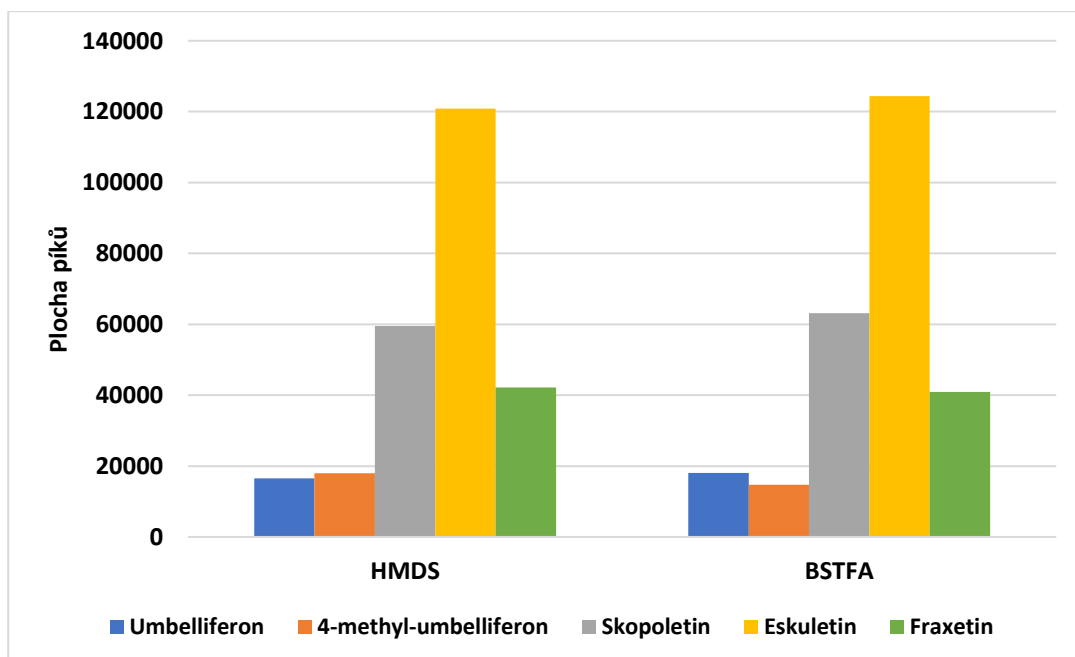
Obr. 18: Efektivita extrakčních činidel

4.2.4. Volba derivatizačního činidla

Pro silanizace analytů byla testována dvě činidla: HMDS a BSTFA. Získané hodnoty píků zaznamenává Obr. 23. Je zde patrné, že použití těchto dvou činidel nevede k markantně rozdílným výsledkům. Stejný závěr lze usoudit z Obr. 24 při derivatizaci vzorků bez přídavku standardu. Nevýhodou použití BSTFA je zvýšení počtu signálů v matici, jak je patrné z TIC záznamu Obr. 32. Nové signály identifikovala MS knihovna převážně, jako deriváty sacharidů. Závěrem je tedy výhodnější použití HMDS, jako selektivnějšího činidla.



Obr. 19: Porovnání ploch píků dvou derivatizačních činidel v nativním vzorku



Obr. 20: Porovnání ploch píků dvou derivatizačních činidel v nativním vzorku

4.2.5.Vliv retenčního gapu

V průběhu práce došlo k výměně kolony v GC. Nová kolona obsahující stejnou stacionární fázi obsahovala navíc i retenční gap o délce 5 m. Přítomnost retenčního gapu byla využita pro zkoumání jeho vlivu na posun retenčních časů, také hlavně na vliv symetrie signálu způsobenou fokusací (zakoncentrováním) analytů. Dále byl zkoumán vliv retenčního gapu na odezvu signálů analytů při různých teplotách. Na Obr. 33 jsou porovnány odezvy signálu skopoletinu. Je patrné, že nejvyšší odezvy je dosaženo při teplotě 70 °C. Pro potvrzení, že stejnou vlastnost budou mít i ostatní kumariny byly porovnány odezvy fraxetinu Obr. 34. I zde je nejvyšší odezvy dosaženo při 70 °C. Tab. III porovnává retenční časy kumarinů s původní kolonou a kolonou obsahující retenční gap. Prodloužení časů je zřejmé z prodloužené kolony o 5 m retenčního gapu. Avšak také snížení teploty, pro nejvyšší odezvu signálu, což je způsobeno zakoncentrováním analytů, a hlavně dřívějším odpařením rozpouštědla.

Tab. III: Změna retenčních časů

Kumarin	Původní RT při 90 °C (min)	RT s retenčním gapem při 70 °C (min)
Umbelliferon	14,15	16,47
4-methylumbelliferon	15,61	18,03
Skopoletin	16,06	18,45
Eskuletin	16,62	18,97
Fraxetin	17,2	19,53

4.3. Kvantifikace

Byly porovnány tři kvantifikační metody pro zjištění koncentrace vybraných kumarinů v reálných vzorcích destilátů.

4.3.1.Metoda standardního přídatku

Z metody vnějšího standardu byla zjištěna lineární závislost analytů z kalibrační řady. Tato lineární závislost byla potvrzena na metodě standardního přídatku, kdy byl připraven vzorek rumu bez přídatku a s dvěma přídatky kumarinů. Získané rovnice závislosti jsou vypsány v Tab. IV.

Tab. IV: Získané závislosti z metody STD přídávku

Kumarin	Rovnice závislosti
Umbelliferon	$y=661520x + 3499,1$
4-methyl-umbelliferon	$y=71720x + 12920$
Skopoletin	$y=617350x + 78579$
Eskuletin	$y=57854x + 33116$
Fraxetin	$y=475970x + 1878,9$

4.3.2. Metoda vnějšího standardu

Byla změřena kalibrační řada zkoumaných kumarinů, připravená podle Tab. I. Takto připravená řada měla pro každý z kumarinů lineární charakter a lineární regresi byla zobrazena rovnice dané přímkou a korelační koeficient R^2 . Získané hodnoty ukazuje Tab. V.

Tab. V: Získané rovnice a korelační koeficienty

Kumarin	Rovnice	R^2
Umbelliferon	$y=556837,749x - 27,760$	0,99397
4-methyl-umbelliferon	$y=731852,536x - 1712,264$	0,99141
Skopoletin	$y=576602,774x - 23594,448$	0,99272
Eskuletin	$y=482518,872x - 1483,883$	0,99534
Fraxetin	$y=322457,734x - 476,760$	0,99902

4.3.3. Metoda vnitřního standardu

Pro m-nitrofenol a chrysen- d_{12} byly získány lineární závislosti a lineární regresi byly získány rovnice korigovaných přímek a korelační koeficienty. Získané rovnice a korelační koeficienty pro korekci kalibrační řady na m-nitrofenol zobrazuje Tab. VI.

Tab. VI: Rovnice přímkou a korelační koeficient s korelací na m-nitrofenol

Kumarin	Rovnice	R^2
Umbelliferon	$y=2,7397x + 0,0068$	0,9947
4-methyl-umbelliferon	$y=3,5942x - 0,0004$	0,9974
Skopoletin	$y=2,83x - 0,0412$	0,9947
Eskuletin	$y=2,3716x - 0,0008$	0,9921
Fraxetin	$y=1,5918x + 0,0023$	0,9770

Získané rovnice a korelační koeficienty s korekcí na chrysen-d₁₂ zobrazuje Tab. VII.

Tab. VII: Rovnice přímky a korelační koeficient s korelací na chrysen

Kumarin	Rovnice	R ²
Umbelliferon	$y=0,1918x - 0,0003$	0,9903
4-methyl-umbelliferon	$y=0,252x - 0,0009$	0,9871
Skopoletin	$y=0,1983x - 0,0101$	0,9888
Eskuletin	$y=0,166x - 0,0007$	0,9921
Fraxetin	$y=0,1108x + 0,0003$	0,9983

Druhým pohledem byl výpočet odezvových faktorů pro daný kumarin s daným interním standardem, a tedy možnosti analýzy kumarinů bez následné přípravy kalibrační řady. Získané odezvové faktory pro m-nitrofenol a chrysen jsou vypsány v Tab. VIII.

Tab. VIII: Odezvové faktory interních standardů

Kumarin	Průměrný odezvový faktor m-nitrofenolu ± Smodch	Průměrný odezvový faktor chrysenu ± Smodch
Umbelliferon	0,3345 ± 0,0487	4,9815 ± 1,0798
4-methyl-umbelliferon	0,2872 ± 0,0393	4,2514 ± 0,7452
Skopoletin	0,4425 ± 0,1197	6,3645 ± 0,8232
Eskuletin	0,4980 ± 0,1244	7,1779 ± 0,8083
Fraxetin	0,7253 ± 0,2036	10,3693 ± 1,0103

4.3.4. Porovnání metod kvantifikace

Obsah zkoumaných kumarinů byl stanoven ve vzorku karibského rumu *Dos Maderas P.X. 5+5*. Obsah kumarinů byl porovnán všemi kvantifikačními metodami. Výsledné hodnoty obsahu zobrazuje Tab. IX.

V Tab. IX lze vidět v prvním sloupci koncentrace kumarinů při použití metody standardního přídatku. Metoda standardního přídatku se zdá být vhodnou metodou vyhodnocení, díky lineárnímu chování při zvyšujících se přídatcích a také jisté kompenzaci maticového efektu. Metoda vnějšího standardu se zdá být nevhodnou, a to z hlavního důvodu chybějící korekce odezvy signálu na maticový efekt. Pravděpodobně hlavně z tohoto důvodu, je při metodě vnějšího standardu také získáno rozdílných koncentrací kumarinů. Korekci na maticový efekt vnáší metoda interního standardu. Korekce kalibrační závislosti na m-nitrofenol se zdá být výhodnější variantou než korekce na chrysen. Ačkoli chrysen- d_{12} je izotopově značený standard, který se nevyskytuje v matici vzorku, ve srovnání s m-nitrofenolem poskytuje koncentrace, které se více odlišují od hodnot získaných metodou standardního přídatku. Výhodnou vlastností m-nitrofenolu, může být právě taktéž probíhající derivatizace, tedy podléhání stejným reakcím jako u zkoumaných kumarinů. Obdobné závěry lze usoudit i z výpočtu koncentrace pomocí odezvového faktoru daného interního standardu. I zde je patrné, že lepších výsledků, které jsou méně vzdálené od výsledků ze standardního přídatku je dosaženo při vyhodnocení m-nitrofenolem.

Závěrem lze říct, že použití kalibrační řady bez korekce na interní standard je zcela nevhodné pro velký rozdíl výsledných koncentrací. Pro laboratorní měření pár vzorků destilátů je pak méně pracné použití metody standardního přídatku. Pro měření většího počtu vzorků je výhodnější použití kalibrační řady, avšak s korekcí na interní standard, a to konkrétně spíše m-nitrofenol než chrysen. Dále by se nabízela i možnost určení koncentrace pomocí přepočtu odezvového faktoru, opět ideálně na m-nitrofenol. Avšak tento způsob vyhodnocení udává více odlišné výsledky, než je tomu u metody kalibrační řady s korekcí na m-nitrofenol.

Tab. IX: Porovnání obsahů kumarinů metodami kvantifikace

Kumarin	STD přídavek	Kalibrační řada	Kalibrační řada ISTD nitrofenol	Kalibrační řada ISTD chrysen	odezvový faktor nitrofenol	Odezvový faktor chrysen
Umbelliferon	0,083	0,0071	0,0033	0,0089	0,0053	0,0070
4-methyl-umbelliferon	0,0179	0,0206	0,0151	0,0226	0,0155	0,0203
Skopoletin	0,1273	0,186	0,134	0,2018	0,1495	0,1904
Eskuletin	0,0572	0,0745	0,0591	0,0785	0,0693	0,0885
Fraxetin	0,0039	0,0098	0,0059	0,0060	0,0079	0,0100

4.3.5. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla vyhodnocena z pěti stejným způsobem upravených vzorků obsahujících stejný druh rumu. Každý ze vzorků byl nastříknut a vyhodnocen třikrát. Z jednotlivých nástřiků byl vyhodnocen obsah daného kumarinu. Opakovatelnost byla vyhodnocena z průměru třech koncentrací daného vzorku a jejich směrodatné odchylky. Tyto hodnoty zobrazuje Tab. X. Odchyly jednotlivých kvantifikačních metod byly přepočteny na relativní směrodatnou odchylku (RSD). Získané RSD zobrazuje Tab. XI

Tab. X: Průměrné hodnoty koncentrací kumarinů se směrodatnou odchylkou pro dané kvantifikační metody

Kumarin	Vzorek	STD přídavek ± smodch (µg/ml)	Kalibrační řada ± smodch (µg/ml)	Kalibrační řada IST nitrofenol ± smodch (µg/ml)	Kalibrační řada IST chrysen ± smodch (µg/ml)	odezvnový faktor nitrofenol ± smodch (µg/ml)	odezvnový faktor chrysen ± smodch (µg/ml)
Umbelliferon	1	0,00303 ± 0,00015	0,00206 ± 0,00009	0,00140 ± 0,00028	0,01575 ± 0,00146	0,00356 ± 0,00146	0,01355 ± 0,00146
	2	0,01439 ± 0,0010	0,00509 ± 0,00019	0,00571 ± 0,00046	0,03062 ± 0,00272	0,00751 ± 0,00272	0,02776 ± 0,00272
	3	0,00900 ± 0,00041	0,00394 ± 0,00021	0,00366 ± 0,00039	0,02335 ± 0,00115	0,00563 ± 0,00115	0,02082 ± 0,00115
	4	0,00172 ± 0,00014	0,00089 ± 0,00004	0,00137 ± 0,00004	0,00702 ± 0,00036	0,00102 ± 0,00036	0,00521 ± 0,00036
	5	0,00402 ± 0,0006	0,00192 ± 0,00022	0,00012 ± 0,00035	0,01139 ± 0,00079	0,00216 ± 0,00079	0,00939 ± 0,00079
4-methyl-umbelliferon	1	0,122 ± 0,0236	0,0154 ± 0,00004	0,02533 ± 0,0011	0,0955 ± 0,0062	0,0260 ± 0,0011	0,0985 ± 0,0067
	2	0,2609 ± 0,0644	0,0171 ± 0,0003	0,0242 ± 0,0005	0,0888 ± 0,0059	0,0249 ± 0,0005	0,0914 ± 0,0064
	3	0,0948 ± 0,0127	0,0144 ± 0,0003	0,0191 ± 0,0004	0,0708 ± 0,0008	0,0196 ± 0,0004	0,0720 ± 0,0008
	4	0,0643 ± 0,0263	0,0125 ± 0,0003	0,0137 ± 0,0004	0,0700 ± 0,0007	0,0140 ± 0,0004	0,0711 ± 0,0008
	5	0,0676 ± 0,0380	0,0131 ± 0,0008	0,0138 ± 0,0013	0,0605 ± 0,0016	0,0141 ± 0,0013	0,0610 ± 0,0017
Skopoletin	1	0,1264 ± 0,0025	0,109 ± 0,001	0,146 ± 0,005	0,529 ± 0,030	0,164 ± 0,006	0,603 ± 0,037
	2	0,1714 ± 0,0144	0,113 ± 0,004	0,132 ± 0,007	0,467 ± 0,036	0,147 ± 0,008	0,526 ± 0,046
	3	0,1458 ± 0,0138	0,1093 ± 0,003	0,123 ± 0,001	0,434 ± 0,005	0,135 ± 0,002	0,483 ± 0,006
	4	0,1176 ± 0,0181	0,101 ± 0,003	0,094 ± 0,003	0,440 ± 0,010	0,100 ± 0,004	0,491 ± 0,013
	5	0,1481 ± 0,0369	0,110 ± 0,004	0,103 ± 0,008	0,419 ± 0,005	0,110 ± 0,010	0,464 ± 0,006
Eskuletin	1	0,0493 ± 0,0004	0,0490 ± 0,0008	0,5000 ± 0,0176	0,3276 ± 0,0201	0,1046 ± 0,0037	0,3854 ± 0,0240
	2	0,1648 ± 0,0077	0,0543 ± 0,0006	0,4709 ± 0,0105	0,2999 ± 0,0223	0,0985 ± 0,0022	0,3523 ± 0,0265
	3	0,0708 ± 0,0136	0,0502 ± 0,0004	0,4207 ± 0,0116	0,2685 ± 0,0058	0,0879 ± 0,0024	0,3148 ± 0,0069
	4	0,0485 ± 0,0108	0,0435 ± 0,0014	0,3041 ± 0,0091	0,2673 ± 0,0039	0,0635 ± 0,0019	0,3134 ± 0,0147
	5	0,0572 ± 0,0126	0,0487 ± 0,0027	0,3256 ± 0,0275	0,2450 ± 0,0044	0,0680 ± 0,0058	0,2869 ± 0,0052
Fraxetin	1	0,0054 ± 0,0003	0,00693 ± 0,00016	0,00741 ± 0,00012	0,02989 ± 0,00313	0,01022 ± 0,00014	0,03745 ± 0,00360
	2	0,0077 ± 0,00024	0,00746 ± 0,00013	0,00689 ± 0,00030	0,02703 ± 0,00238	0,00963 ± 0,00035	0,03416 ± 0,00274
	3	0,0058 ± 0,00041	0,00723 ± 0,00010	0,00627 ± 0,00034	0,02484 ± 0,00116	0,00891 ± 0,00039	0,3165 ± 0,00134
	4	0,0049 ± 0,0005	0,00644 ± 0,00025	0,00402 ± 0,00032	0,02418 ± 0,00072	0,00631 ± 0,00037	0,03089 ± 0,00083
	5	0,0055 ± 0,00145	0,00692 ± 0,00061	0,00435 ± 0,00088	0,02160 ± 0,00222	0,00669 ± 0,00101	0,02793 ± 0,00255

Tab. XI: Získané RSD kvantifikačních metod

Kumarin	Vzorek	STD přídavek RSD (%)	Kalibrační řada RSD (%)	Kalibrační řada IST nitrofenol RSD (%)	Kalibrační řada IST chrysen RSD (%)	odezvodový faktor nitrofenol RSD (%)	odezvodový faktor chrysen RSD (%)
Umbelliferon	1	4,95	4,51	20,08	9,28	41,08	10,78
	2	6,95	3,75	8,02	8,89	36,27	9,81
	3	4,56	5,35	10,57	4,94	20,51	5,55
	4	8,14	4,9	3,05	5,2	35,78	7,00
	5	14,93	11,63	5,36	6,93	36,54	8,41
4-methyl- umbelliferon	1	19,34	0,25	4,22	6,52	4,24	6,77
	2	24,68	1,55	1,98	6,68	1,99	6,96
	3	13,4	2,26	1,92	1,1	1,94	1,16
	4	40,9	2,69	3,06	1,03	3,09	1,09
	5	56,21	5,82	9,48	2,66	9,56	2,83
Skopoletin	1	1,98	1,02	3,27	5,61	3,64	6,21
	2	8,4	3,14	4,93	7,79	5,54	8,74
	3	9,47	2,54	1,13	1,17	1,28	1,32
	4	15,39	2,64	3,1	2,26	3,67	2,56
	5	24,92	3,77	7,48	1,11	8,71	1,26
Eskuletin	1	0,81	1,72	3,52	6,14	3,53	6,22
	2	4,67	1,08	2,24	7,42	2,25	7,53
	3	19,21	0,73	2,75	2,14	2,77	2,18
	4	22,27	3,18	2,99	1,45	3,01	4,69
	5	22,03	5,51	8,45	1,78	8,5	1,81
Fraxetin	1	5,56	2,36	1,58	10,48	1,32	9,61
	2	3,12	1,73	4,38	8,82	3,62	8,02
	3	7,07	1,32	5,44	4,68	4,42	4,22
	4	10,2	3,96	7,88	2,98	5,79	2,68
	5	26,36	8,79	20,19	10,28	15,15	9,14

Z tabulek je patrné, že nízkých relativních směrodatných odchylek je dosaženo při použití vyhodnocení kalibrační křivky, jak samotné, tak i s korekcí na interní standardy. Také vyhodnocení pomocí odezvových faktorů má nízké RSD hodnoty. Nejvyšších hodnot RSD až 56,21 % (4-methyl-umbelliferonu) je dosaženo při vyhodnocení metody standardního přídatku, která se v souvislosti s úpravou vzorku a vnášením chyby zdála být nejvhodnější, jak je popsáno v odstavci Porovnání kvantifikačních metod. Z pohledu zisku opakovatelnosti výsledků, je tedy nevhodné využít metodu standardního přídatku. Na první pohled se může zdát nejvhodnější použít metodu vnějšího standardu kdy se dosahuje RSD do 12 %. Metoda vnějšího standardu však s sebou nese nevýhodu, a to chybějící korekci na matici vzorku. Pro korekci matricového efektu je ovšem výhodnější a přesnější použití kalibračních modelů s interním standardem. Konkrétně z pohledu výsledných koncentrací a také vlastností interních standardů již diskutovaných v odstavci Porovnání kvantifikačních metod, je vhodnější použití m-nitrofenolu, který má RSD do 21 % (fraxetin). Ačkoliv při metodě vnitřního standardu chrysenu je dosaženo RSD do 11 % (fraxetin), chrysen není látka podobných vlastností jako kumariny, tj. neprobíhá na ní derivatizace. Vhodné by bylo i použití odezvového faktoru. Zde však oba použité interní standardy vykazují o něco vyšší hodnoty RSD (až do 42 % v případě umbelliferonu), než je tomu v případě kalibračních modelů. RSD 41,02 % umbelliferonu v případě výpočtu pomocí odezvového faktoru na m-nitrofenol však může být způsoben jen obecnou nízkou koncentrací ve vzorcích.

Závěrem při vyhodnocení opakovatelnosti metody je pro opakované výsledky s relativně nízkou hodnotou RSD vhodné použít metodu vnitřního standardu. Vnitřní standard m-nitrofenol poskytuje nízké RSD, pouze v jednom měření je dosaženo 20,19 %. Také dosahuje 20,08 % u umbelliferonu, ale tento kumarin se ve vzorcích vyskytuje v malém obsahu, tedy případné fluktuace výsledných signálů mohou způsobovat jeho vyšší RSD (i v případě jiných kvantifikačních metod).

4.4. Analýza reálných vzorků

Tab. XII-XIV ukazují získané koncentrace v reálných vzorcích vybraných rumů, koňaků a whisky. Získané koncentrace jsou opět vypočteny pro porovnání výsledků všemi kvantifikačními metodami dosud uvažovanými.

Optimalizovaným postupem úpravy vzorků bylo zjištěno, že všechny vybrané vzorky destilátů obsahují jisté množství zkoumaných kumarinů. Z vybraných kumarinů, je většinou nejmenší koncentrace dosaženo pro umbelliferon. Vypočtená koncentrace umbelliferonu v některých případech dosahuje i záporných hodnot, což je způsobeno právě jeho nízkou koncentrací, a tedy dosažením limitu detekce. Druhým extrémem je skopoletin. Což koresponduje s prací Winstel a kol. (2020) [32]. V jejich práci bylo tak, jako v této diplomové práci zjištěn nejnižší obsah umbelliferonu a vysoký obsah skopoletinu. Skopoletin v jejich práci vykazoval různé koncentrace pro dané vzorky, což autoři přisuzují materiálu a původu sudu, ve kterém byl daný vzorek skladován. Skopoletin je nejvíce zastoupeným kumarinem ve vzorcích rumů a whisky. V případě koňaku je získána vysoká koncentrace eskuletinu. V těchto vzorcích je koncentrace skopoletinu a eskuletinu přibližně rovna. Také z pohledu vyhodnocení lze vidět že je dosaženo podobných výsledků při využití metody standardního přídatku a kalibrační závislosti s korekcí na m-nitrofenol, či odezvoový faktor na m-nitrofenol. Samotná kalibrační závislost poskytuje převážně odlišné výsledky, od metody standardního přídatku či metody interního standardu, z důvodu zmiňovaného matricového efektu, který není v tomto případě korigován. Dále vzorky whisky mají oproti rumu vyšší koncentraci fraxetinu a eskuletinu. Stále nejvíce zastoupeným zůstává skopoletin. Zvýšené koncentrace kumarinů mohou, jak již bylo uvedeno, být způsobeny materiálem a původem použitých sudů.

Obecně lze odpozorovat vyšší obsah kumarinů ve kvalitních vzorcích rumu. Ceny zkoumaných rumů se pohybují okolo 1000 Kč a více. Byl, ale vybrán i rum nižší ceny, Božkov Tuzemský, který má nižší koncentraci skopoletinu i eskuletinu oproti ostatním cenově vyšším rumům.

Tab. XII: Koncentrace kumarinů ve vzorcích rumů

Vzorek	Kumarin	STD přídavek (µg/ml)	Kalibrační řada (µg/ml)	kalibrační řada + nitrofenol (µg/ml)	kalibrační řada + Chrysen (µg/ml)	Odezvový faktor nitrofenol (µg/ml)	odezvový faktor chrysen (µg/ml)
Pyrat	Umbelliferon	0,0016	0,0011	-0,0011	0,0040	0,0012	0,0023
	4--methyl-umbelliferon	0,0054	0,0053	0,0062	0,0114	0,0045	0,0084
	Skopoletin	0,1377	0,1305	0,1322	0,2621	0,1473	0,2666
	Eskuletin	0,0475	0,0554	0,0689	0,1274	0,0810	0,1468
	Fraxetin	0,0194	0,0245	0,0276	0,0497	0,0335	0,0602
Ron Cubay	Umbelliferon	0,0020	0,0013	-0,0010	0,0041	0,0014	0,0024
	4-methyl-umbelliferon	0,0010	0,0032	0,0024	0,0062	0,0017	0,0028
	Skopoletin	0,0570	0,0643	0,0440	0,0997	0,0369	0,0616
	Eskuletin	0,0314	0,0196	0,0211	0,0385	0,0245	0,0409
	Fraxetin	0,0133	0,0110	0,2194	0,0154	0,2550	0,0208
Don Papa	Umbelliferon	0,0150	0,0107	0,0100	0,0220	0,0115	0,0196
	4-methyl-umbelliferon	0,0007	0,0030	0,0019	0,0056	0,0013	0,0022
	Skopoletin	0,2782	0,2498	0,2597	0,4519	0,3070	0,5060
	Eskuletin	0,0787	0,0848	0,0961	0,1610	0,1131	0,1868
	Fraxetin	0,0276	0,0381	0,0404	0,0661	0,0483	0,0791
Ron Zacapa	Umbelliferon	0,0099	0,0086	0,0061	0,0025	0,0079	0,0009
	4-methyl-umbelliferon	0,0173	0,0162	0,0201	0,0048	0,0149	0,0013
	Skopoletin	0,4173	0,3719	0,3489	0,0522	0,4187	0,0016
	Eskuletin	0,1266	0,1278	0,1261	0,0068	0,1485	0,0031
	Fraxetin	0,0285	0,0386	0,0350	-0,0003	0,0421	0,0028
Old Pascas	Umbelliferon	0,0015	0,0005	-0,0018	0,0025	0,0006	0,0009
	4-methyl-umbelliferon	0,0021	0,0025	0,0014	0,0048	0,0009	0,0013
	Skopoletin	0,0109	0,0416	0,0155	0,0522	0,0011	0,0016
	Eskuletin	0,0089	0,0044	0,0022	0,0068	0,0022	0,0031
	Fraxetin	0,0146	0,0036	0,0003	-0,0003	0,0021	0,0028
Technologický vzorek rumu X	Umbelliferon	0,0020	0,0023	0,0005	0,0055	0,0027	0,0038
	4-methyl-umbelliferon	0,0014	0,0036	0,0032	0,0065	0,0023	0,0032
	Skopoletin	0,0354	0,0750	0,0595	0,1109	0,0563	0,0757
	Eskuletin	0,0161	0,0251	0,0294	0,0430	0,0343	0,0462
	Fraxetin	0,0058	0,0130	0,0126	0,0161	0,0162	0,0216
Technologický vzorek rumu A	Umbelliferon	0,0199	0,00909	0,00993	0,01656	0,01138	0,01433
	4-methyl-umbelliferon	0,0013	0,00258	0,00140	0,00465	0,00092	0,00116
	Skopoletin	0,0591	0,06841	0,05239	0,09660	0,04738	0,05764
	Eskuletin	0,0050	0,00640	0,00490	0,00973	0,00539	0,00657
	Fraxetin	0,0063	0,00809	0,00646	0,00690	0,00913	0,01104

Vzorek	Kumarin	STD přídavek (µg/ml)	Kalibrační řada (µg/ml)	kalibrační řada + nitrofenol (µg/ml)	kalibrační řada + Chrysen (µg/ml)	Odezvový faktor nitrofenol (µg/ml)	odezvový faktor chrysen (µg/ml)
Technologický vzorek rumu B	Umbelliferon	0,0073	0,00525	0,00282	0,01051	0,00486	0,00855
	4--methyl- umbelliferon	0,0022	0,00358	0,00249	0,00641	0,00174	0,00304
	Skopoletin	0,0688	0,08674	0,06134	0,12979	0,05858	0,09952
	Eskuletin	0,0255	0,03106	0,02887	0,05237	0,03370	0,05738
	Fraxetin	0,0076	0,01244	0,00883	0,01473	0,01186	0,02003
Royal Danish navy	Umbelliferon	0,0221	0,02305	0,02975	0,04344	0,02954	0,04002
	4--methyl- umbelliferon	0,0184	0,02152	0,03825	0,03925	0,02839	0,03823
	Skopoletin	0,2582	0,31155	0,39471	0,54449	0,47605	0,62291
	Eskuletin	0,0822	0,14958	0,20583	0,27131	0,24270	0,31825
	Fraxetin	0,0211	0,03958	0,05060	0,06532	0,06009	0,07815
Božkov Tuzemský	Umbelliferon	0,0026	0,00202	-0,00022	0,00481	0,00207	0,00310
	4--methyl- umbelliferon	0,0008	0,00256	0,00116	0,00461	0,00075	0,00111
	Skopoletin	0,0061	0,04492	0,01916	0,05753	0,00576	0,00833
	Eskuletin	0,0022	0,00491	0,00244	0,00725	0,00249	0,00361
	Fraxetin	0,0014	0,00386	0,00032	-0,00015	0,00204	0,00294

Tab. XIII: Koncentrace kumarinů (µg/ml) ve vzorcích koňaků

Vzorek	Kumarin	STD přídavek (µg/ml)	Kalibrační řada (µg/ml)	kalibrační řada + nitrofenol (µg/ml)	kalibrační řada + Chrysen (µg/ml)	Odezvový faktor nitrofenol (µg/ml)	odezvový faktor chrysen (µg/ml)
De luze	Umbelliferon	0,0018	0,0018	-0,0008	0,0045	0,0015	0,0028
	4-methyl-umbelliferon	0,0042	0,0063	0,0058	0,0106	0,0042	0,0075
	Skopoletin	0,0316	0,0688	0,0409	0,0961	0,0330	0,0569
	Eskuletin	0,0312	0,0494	0,0440	0,0792	0,0516	0,0894
	Fraxetin	0,0159	0,0287	0,0233	0,0400	0,0286	0,0491
Camus	Umbelliferon	0,0016	0,0014	-0,0010	0,0039	0,0013	0,0023
	4-methyl-umbelliferon	0,0012	0,0029	0,0016	0,0053	0,0011	0,0019
	Skopoletin	0,0172	0,0526	0,0271	0,0715	0,0156	0,0260
	Eskuletin	0,0182	0,0233	0,0220	0,0399	0,0256	0,0425
	Fraxetin	0,0112	0,0181	0,3251	0,0251	0,3770	0,0319
Claude Chatelier	Umbelliferon	0,0024	0,0023	0,00001	0,0055	0,0023	0,0037
	4-methyl-umbelliferon	0,0071	0,0091	0,0111	0,0159	0,0082	0,0132
	Skopoletin	0,0518	0,0850	0,0633	0,1269	0,0611	0,0959
	Eskuletin	0,0578	0,0806	0,0861	0,1379	0,1012	0,1593
	Fraxetin	0,0212	0,0344	0,0338	0,0526	0,0407	0,0636
Tariquete	Umbelliferon	0,0045	0,0041	0,0011	0,0045	0,0032	0,0028
	4-methyl-umbelliferon	0,0304	0,0264	0,0302	0,0106	0,0224	0,0075
	Skopoletin	0,2154	0,2171	0,1706	0,0961	0,1954	0,0569
	Eskuletin	0,3105	0,2123	0,1854	0,0792	0,2185	0,0894
	Fraxetin	0,0499	0,0814	0,0682	0,0400	0,0804	0,0491

Tab. XIV: Koncentrace kumarinů (µg/ml) ve vzorcích whisky

Kumarin	Kumarin	STD přídavek (µg/ml)	Kalibrační řada (µg/ml)	kalibrační řada + nitrofenol (µg/ml)	kalibrační řada + Chrysen (µg/ml)	Odezvový faktor nitrofenol (µg/ml)	odezvový faktor chrysen (µg/ml)
Tomatin	Umbelliferon	0,0020	0,0017	-0,0007	0,0047	0,0016	0,0030
	4--methyl-umbelliferon	0,0052	0,0059	0,0062	0,0114	0,0045	0,0084
	Skopoletin	0,1348	0,1347	0,1182	0,2370	0,1298	0,2349
	Eskuletin	0,0524	0,0742	0,0788	0,1452	0,0927	0,1680
	Fraxetin	0,0224	0,0333	0,0326	0,0589	0,0394	0,0708
Laphroaig	Umbelliferon	0,0023	0,0017	-0,0009	0,0048	0,0015	0,0031
	4-methyl-umbelliferon	0,0049	0,0050	0,0044	0,0097	0,0031	0,0065
	Skopoletin	0,4978	0,2806	0,2498	0,5235	0,2946	0,5965
	Eskuletin	0,2587	0,1332	0,1279	0,2608	0,1507	0,3057
	Fraxetin	0,0453	0,0497	0,1513	0,0908	0,1764	0,1074
Caol Ila	Umbelliferon	0,0013	0,0009	-0,0016	0,0035	0,0008	0,0019
	4-methyl-umbelliferon	0,0036	0,0043	0,0037	0,0090	0,0026	0,0059
	Skopoletin	0,1952	0,1556	0,1371	0,3127	0,1534	0,3303
	Eskuletin	0,0555	0,0733	0,0753	0,1645	0,0885	0,1909
	Fraxetin	0,0214	0,0290	0,0269	0,0582	0,0327	0,0700
Iscaig mist	Umbelliferon	0,0015	0,0011	-0,0014	0,0119	0,0010	0,0099
	4-methyl-umbelliferon	0,0044	0,0050	0,0048	0,0362	0,0035	0,0350
	Skopoletin	0,1631	0,1704	0,1564	2,5415	0,1776	3,1433
	Eskuletin	0,0503	0,0861	0,0912	1,1571	0,1073	1,3737
	Fraxetin	0,0218	0,0319	0,0308	0,6957	0,0372	0,8024
Koval	Umbelliferon	0,0044	0,0038	0,0014	0,0119	0,0035	0,0099
	4-methyl-umbelliferon	0,0150	0,0137	0,0169	0,0362	0,0125	0,0350
	Skopoletin	0,8082	0,9335	0,9376	2,5415	1,1559	3,1433
	Eskuletin	0,1975	0,4164	0,4271	1,1571	0,5041	1,3737
	Fraxetin	0,1275	0,2524	0,2557	0,6957	0,2968	0,8024
Scarabus	Umbelliferon	0,0036	0,0024	-0,0001	0,0069	0,0022	0,0051
	4-methyl-umbelliferon	0,0077	0,0069	0,0074	0,0151	0,0054	0,0123
	Skopoletin	0,2887	0,1915	0,1736	0,4025	0,1992	0,4438
	Eskuletin	0,1508	0,1096	0,1127	0,2529	0,1327	0,2963
	Fraxetin	0,0659	0,0789	0,0790	0,1764	0,0929	0,2057
Hankey bannister	Umbelliferon	0,0021	0,0012	-0,0012	0,0044	0,0012	0,0027
	4-methyl-umbelliferon	0,0035	0,0036	0,0028	0,0077	0,0020	0,0044
	Skopoletin	0,1389	0,0968	0,0796	0,1929	0,0815	0,1792
	Eskuletin	0,0506	0,0412	0,0447	0,1011	0,0524	0,1154
	Fraxetin	0,0182	0,0195	0,0184	0,0409	0,0229	0,0501

Vzorek	Kumarin	STD přídavek (µg/ml)	Kalibrační řada (µg/ml)	kalibrační řada + nitrofenol (µg/ml)	kalibrační řada + Chrysen (µg/ml)	Odezvový faktor nitrofenol (µg/ml)	odezvový faktor chrysen (µg/ml)
Pure malt	Umbelliferon	0,0043	0,0026	0,0002	0,0079	0,0024	0,0061
	4-methyl- umbelliferon	0,0113	0,0081	0,0089	0,0188	0,0065	0,0163
	Skopoletin	0,3233	0,1641	0,1402	0,3532	0,1573	0,3815
	Eskuletin	0,4472	0,1673	0,1675	0,4071	0,1975	0,4801
	Fraxetin	0,0319	0,0353	0,0320	0,0784	0,0387	0,0932
Scallywag	Umbelliferon	0,0037	0,0022	-0,0002	0,0068	0,0021	0,0050
	4-methyl- umbelliferon	0,0159	0,0102	0,0124	0,0239	0,0091	0,0218
	Skopoletin	0,1499	0,1112	0,0892	0,2233	0,0935	0,2175
	Eskuletin	0,1129	0,0775	0,0794	0,1868	0,0933	0,2176
	Fraxetin	0,0278	0,0336	0,0316	0,0740	0,0381	0,0882

5. Závěr

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat metodu úpravy vzorků pro použití plynové chromatografie, jako analytické koncovky a následná kvantifikace kumarinů v reálných vzorcích.

Podařilo se vytvořit optimální úpravu vzorků, a to extrakci dichlormethanem za použití okyseleného nasyc. roztoku NaCl. Extrakce byla provedena dvakrát pro lepší výtěžnost. Pro možnost užití plynové chromatografie byla provedena derivatizace odpařeného extraktu za použití HMDS v pyridinu. Takto upravený vzorek poskytoval signál pro dané kumariny, tj. umbelliferon, 4-methyl-umbelliferon, skopoletin, fraxetin a eskuletin.

Pro kvantifikaci byly zkoumány 3 kvantifikační metody. Přičemž nejvhodnější metodou se ukázala metoda interního standardu a to m-nitrofenolu. Tato použitá metoda má nízké hodnoty RSD (do 21 %) při opakování a získané koncentrace blízké ke koncentracím získaným metodou standardního přídatku. Výhodou metody je korekce na vliv matrice a také, že m-nitrofenol podléhá, tak jako kumariny, derivatizaci.

Při analýze reálných vzorků rumů, koňaků a whisky bylo zjištěno, že všechny vzorky obsahují v největším zastoupení skopoletin (0,016-0,94 µg/ml) a nejméně umbelliferon (0,0005-0,01 µg/ml). Jednotlivé druhy alkoholů se následně liší obsahem eskuletinu a fraxetinu.

6. Literatura

1. K. N. Venugopala a B. Odhav. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**, 1-14
2. J. Velíšek a J. Hajšlová. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
3. A. Lacy. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2004, **10**(30), 3797-3811 .
4. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 323, Coumarin; dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/323>.
5. M. Nic, J. Jirat, B. Kosata: <http://goldbook.iupac.org> (2005-2023) ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook. Version: 3.0.1, Updated: 2019-07-01, doi: 10.1351/goldbook.
6. I. Cazin, E. Rossegger, G. Guedes de La Cruz, T. Griesser a S. Schlogl. Recent Advances in Functional Polymers Containing Coumarin Chromophores. *Polymers* [online]. 2021, **13**(1).
7. K. Elasaad, R. Alkhatib, T. Hennebelle, B. Norberg a J. Wouters. *Determination of the Absolute Configuration of Aegelinol by Crystallization of Its Inclusion Complex with β -Cyclodextrin*. *Crystals* [online]. 2012, **2**(4), 1441-1454.
8. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 70385, 3-Phenylcoumarin; [cit. 2022-08-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Phenylcoumari>.
9. M. F. M. Borges, BORGES, F.M.F. Roleira, N. J.S.P. Milhazes a E. U. Villare.. *Simple Coumarins: Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry*. ATTA-UR-RAHMAN, Allen B. REITZ a M. IQBAL CHOUDHARY, ed. *Frontiers in Medicinal Chemistry - (Volume 4)* [online]. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2012, 2012-03-27, s. 23-85.
10. C. Sproll, W. Ruge, C. Andlauer, R. Godelmann a D.W. Lachenmeier. *HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods*. *Food Chemistry* [online]. 2008, **109**(2), 462-469.
11. F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana a E. Uriarte. *Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity*. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2005, **12**(8), 887-916.

12. I. Yahaya, N. Seferoglu a Z. seferoglu. *Improved one-pot synthetic conditions for synthesis of functionalized fluorescent coumarin-thiophene hybrids: Syntheses, DFT studies, photophysical and thermal properties*. Tetrahedron [online]. 2019, **75**(14), 2143-2154.
13. O. Mazimba. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University [online]. 2017, **55**(2), 223-232.
14. Shakeel-U-Rehman, R. Khan, K. A. Bhat, A. F. Raja, A. S. Shawl a M. S. Aalam. Isolation, characterisation and antibacterial activity studies of coumarins from *Rhododendron lepidotum* Wall. ex G. Don, Ericaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia [online]. 2010, **20**(6), 886-890.
15. N. Robledo-O'ryan, M. J. Matos, S. Vazquez-Rodriquez, et al. *Synthesis, antioxidant and antichagasic properties of a selected series of hydroxy-3-arylcoumarins*. Bioorganic & Medicinal Chemistry [online]. 2017, **25**(2), 621-632.
16. Y. K. Al-Majedy, A. A. H. Kadhum, A. A. Al-Amiery a A. B. Mohamad. Coumarins: The Antimicrobial agents. Systematic Reviews in Pharmacy [online]. 2017, **8**(1), 62-70.
17. A. Witaicenis, L. N. Seito, A. Da Silveira Chagas, L. D. De Almeida, A. C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, S. H. Cestari a L. C. Di Stasi. *Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives*. Phytomedicine [online]. 2014, **21**(3), 240-246.
18. L. Z. Chen, W. W. Sun, L. Bo, et al. *New arylpyrazoline-coumarins: Synthesis and anti-inflammatory activity*. European Journal of Medicinal Chemistry [online]. 2017, **138**, 170-181.
19. Y. Liu, G. Yan, Y. Xie, et al. *Bioactive prenylated coumarins as potential anti-inflammatory and anti-HIV agents from *Clausena lenis**. Bioorganic Chemistry [online]. 2020, **97**.
20. A. Fallarero, P. Oinonen, S. Gupta, P. Blom, A. Galkin, C. Mohan a P. Vourela. Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106. Pharmacological Research [online]. 2008, **58**(3-4), 215-221.
21. The American Society of Health-System Pharmacists. Archived from the original on 12 June 2018. Retrieved 8 January 2017. [cit. 2022-08-09]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/monograph/warfarin.html>
22. E. L. Maistro, E. De Souza Marques , R. P. Fedato, F. Tolentino, Ch. de A. C. Da Silva, M. S. F. Tsuboy, F. A. Resende a E. A. Varanda. *In Vitro Assessment of Mutagenic And Genotoxic Effects of Coumarin Derivatives 6,7-Dihydroxycoumarin and 4-Methylesculetin*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A [online]. 2014, **78**(2), 109-118.
23. Krüger, S.; Winheim, L.; Morlock, G.E. Planar chromatographic screening and quantification of coumarin in food, confirmed by mass spectrometry. Food Chem. 2018, **239**, 1182–1191
24. J. D. Vassallo, S. M. Hicks, G. P. Daston a L. D. Lehman-mckeeman. *Metabolic Detoxification Determines Species Differences in Coumarin-Induced Hepatotoxicity*. Toxicological Sciences [online]. 2004, **80**(2), 249-257.

25. B. G. Lake. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. Food and Chemical Toxicology [online]. 1999, **37**(4), 423-453.
26. A. Fais, M. Corda, B. Era, et al. *Tyrosinase Inhibitor Activity of Coumarin-Resveratrol Hybrids*. Molecules [online]. 2009, **14**(7), 2514-2520 [cit. 2022-02-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules14072514.
27. M. Matos, Maria, S. Vazquez-rodriguez, L. Santana, E. Uriarte, C. Fuentes-edfuf, Y. Santos a A. Munos-Creco. *Synthesis and Structure-Activity Relationships of Novel Amino/Nitro Substituted 3-Arylcoumarins as Antibacterial Agents*. Molecules [online]. 2013, **18**(2), 1394-1404.
28. F. Woehrlin, H. Fry, K. Abraham a A. Preiss-Weigert. *Quantification of Flavoring Constituents in Cinnamon: High Variation of Coumarin in Cassia Bark from the German Retail Market and in Authentic Samples from Indonesia*. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2010, **58**(19), 10568-10575.
29. V. Ferrone, S. Genovese, M. Carlucci, et al. *A green deep eutectic solvent dispersive liquid-liquid micro-extraction (DES-DLLME) for the UHPLC-PDA determination of oxyprenylated phenylpropanoids in olive, soy, peanuts, corn, and sunflower oil*. Food Chemistry [online]. 2018, **245**, 578-585.
30. M. E. Fernández Izquierdo, J. Q. Granados, M. Villalón Mir a M.C. López Martinez. *Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages*. Food Chemistry [online]. 2000, **70**(2), 251-258.
31. Z. Yang, Ziyin, T. Kinoshita, A. Tanida, H. Sayama, A. Morita a N. Watanabe. *Analysis of coumarin and its glycosidically bound precursor in Japanese green tea having sweet-herbaceous odour*. Food Chemistry [online]. 2009, **114**(1), 289-294.
32. D. Winstel, E. Gautier a A. Marchal. *Role of Oak Coumarins in the Taste of Wines and Spirits: Identification, Quantitation, and Sensory Contribution through Perceptive Interactions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2020, **68**(28), 7434-7443.
33. Y. WANG, B. Avula, J. Zhao, TJ Smillie, N. Nanayakkara a I. Khan. *Characterization and Distribution of Coumarin, Cinnamaldehyde and Related Compounds in Cinnamomum spp. by UPLC-UV/MS Combined with PCA*. Planta Medica [online]. 2010, **76**(05), s-0030-1251793.
34. C. F. POOL. Gas chromatography. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12-385540-4.
35. S. Mitra. *Sample preparation techniques in analytical chemistry* / edited by Somenath Mitra. 2003. ISBN 0471328456.
36. R. J. Ochocka, D. Rajzer, P. Kowalski a H. Lamparczyk. *Determination of coumarins from Chrysanthemum segetum L. by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A [online]. 1995, **709**(1), 197-202.

37. A. A. Rahim, B. Saad, H. Osman, N. Hashim, S. Yahay a K. Md Talib. *Simultaneous determination of diethylene glycol, diethylene glycol monoethyl ether, coumarin and caffeine in food items by gas chromatography*. Food Chemistry [online]. 2011, **126**(3), 1412-1416.
38. L. Nováková, M. Douša a P. Česla. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi (díl 2.)*, 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8560-6.
39. H. M. McNair, a James M. Miller. *Basic gas chromatography*. 2nd edition. New Jersey: Wiley-Interscience, 2009. ISBN 978-0470439548.
40. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler a S. R. Crouch. *Analytická chemie*. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KŘÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
41. M. Salagoity-Auguste, Ch. Tricard a P. Sudraud. *Dosage simultané des aldéhydes aromatiques et des coumarines par chromatographie liquide haute performance*. Journal of Chromatography A [online]. 1987, **392**, 379-387.
42. M. E. Fernández Izquierdo, J. Q. Granados, M. V. Mir a M. C. López Martinez. *Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages*. Food Chemistry [online]. 2000, **70**(2), 251-258.
43. G. Li, H. Wu, Y. Wang, W. Hung a R. L. Rouseff. *Determination of citrus juice coumarins, furanocoumarins and methoxylated flavones using solid phase extraction and HPLC with photodiode array and fluorescence detection*. Food Chemistry [online]. 2019, **271**, 29-38.
44. K. Hroboňová a E. Brokešová. *Comparison of different types of sorbents for extraction of coumarins*. Food Chemistry [online]. 2020, 332.
45. SEDLÁČEK, Milan. *Znalec Vín*. Znalec Vín [online]. 2006 [cit. 2022-08-08]. Dostupné z: <http://www.znalecvin.cz>
46. A. Machyňáková, a K. Hroboňová. *Preparation and application of magnetic molecularly imprinted polymers for the selective extraction of coumarins from food and plant samples*. Analytical Methods [online]. 2017, **9**(14), 2168-2176.
47. A. MAŇÁKOVÁ, *Ověření metody stanovení alergenních vonných látek v nečokoládových cukrovinkách*. diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně Brno 2019. Fakulta chemická. Vedoucí práce Vítová Eva.
48. P. Klouda. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
49. Y. Chen, Y. Jin, Y. Chen, Y. Jin, X. Liu a L. Wang. *A Novel HPLC Method to Analyze Imperatorin and Isoimperatorin of Angelica dahurica Oils Obtained by Supercritical Fluid*

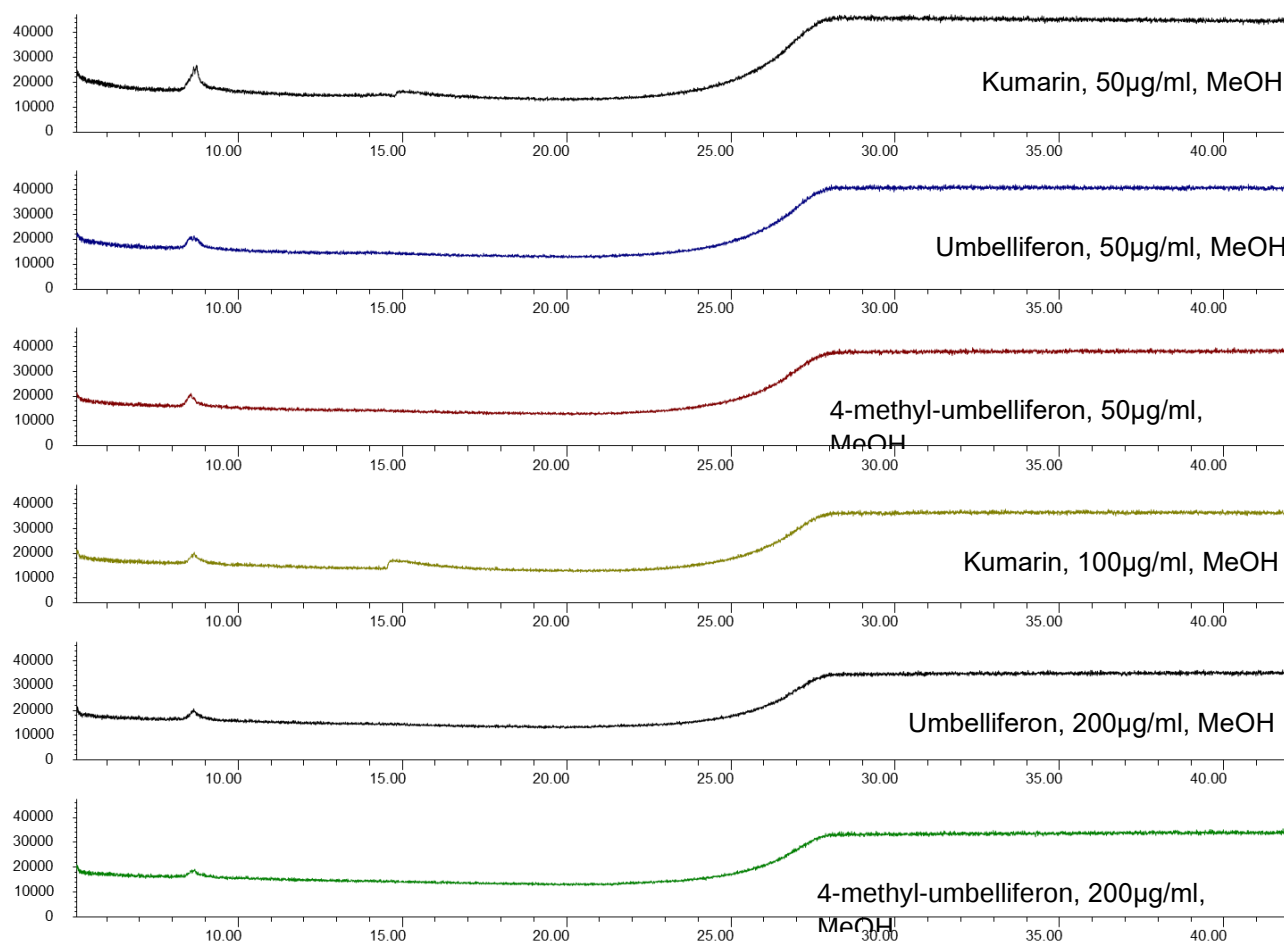
- Extraction*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies [online]. 2009, **32**(16), 2384-2395.
50. T J. Kang, S. Y. Lee, R. P. Singh, R. Agarwal a D. S. Yim . *Anti-tumor activity of oxypeucedanin from Ostericum koreanum against human prostate carcinoma DU145 cells*. Acta Oncologica [online]. 2009, **48**(6), 895-900.
 51. H. Nie, L. Meng, J. Zhou, X. Fan, Y. Luo a G. Zhang. *Imperatorin is responsible for the vasodilatation activity of Angelica Dahurica var. Formosana regulated by nitric oxide in an endothelium-dependent manner*. Chinese Journal of Integrative Medicine [online]. 2009, **15**(6), 442-447.
 52. L. Wang, Y. Mei, F Wang, Xue-Song Liu a Y. Chen. *A novel and efficient method combining SFE and liquid-liquid extraction for separation of coumarins from Angelica dahurica*. Separation and Purification Technology [online]. 2011, **77**(3), 397-401.
 53. J. Drozd a J. P. Novák. *Chemical derivatization in gas chromatography*. New York: Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier/North-Holland, 1981. ISBN 0-44441917-9.
 54. L. Nováková, M. Douša a P. Česla. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi. (díl 1.) 2. přepracované a rozšířené vydání*. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
 55. P. Kusch ed. *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application* [online]. IntechOpen, 2019 [cit. 2022-08-03]. ISBN 978-1-83881-865-4. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.73339.
 56. M. Ali Mohd, ed. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* [online]. InTech, 2012 [cit. 2022-08-24]. ISBN 978-953-51-0298-4. Dostupné z: doi:10.5772/251

7. Příloha 2: Tabulka ploch

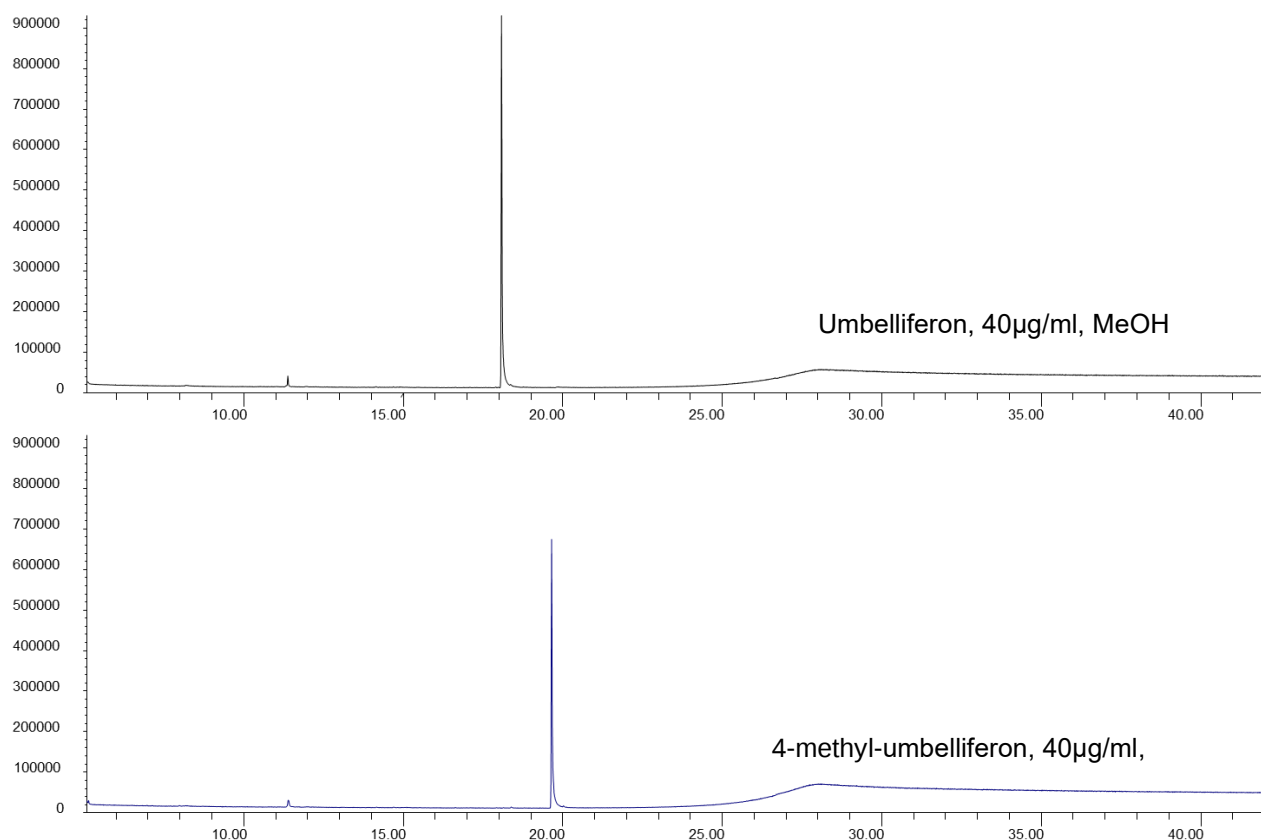
Tab. XV: Získané plochy píků při použití různých extrakčních činidel.

Extrakční činidlo	Přídavek (µg/ml)	Kumarin	Umbelliferon	4-methyl- umbelliferon	Skopoletin	Eskuletin	Fraxetin
		RT (min)	14,01	15,61	16,06	16,56	17,21
		SIM (m/z)	234	248	264	322	352
Plochá píků							
Hexan	0,4		ND	ND	ND	ND	ND
			ND	ND	ND	ND	ND
isoOktan	0,4		ND	ND	ND	ND	ND
			ND	ND	ND	ND	ND
DE	0,4		290809	155152	146507	323921	92472
			295081	155976	148866	321392	92301
CHCl3	0,4		256765	186537	133289	300469	160071
			257005	184968	129984	296993	157870
CH2Cl2	0,4		227215	199328	132942	277063	151602
			225050	194173	134434	270136	147928
TBME	0,4		241165	198341	133691	376981	140844
			234598	201716	129211	374753	139024
EtAc	0,4		194202	195948	132838	368393	136077
			176643	191772	133971	360528	135341
Toluen	0,4		204129	147141	47494	27822	24361
			208374	145013	47614	27597	24290
EtFormiat	0,4		365748	278554	154750	368354	136201
			350520	273935	151116	352935	135297
MIBK	0,4		339035	276889	168646	381351	86917
			352643	279752	171438	387910	91443

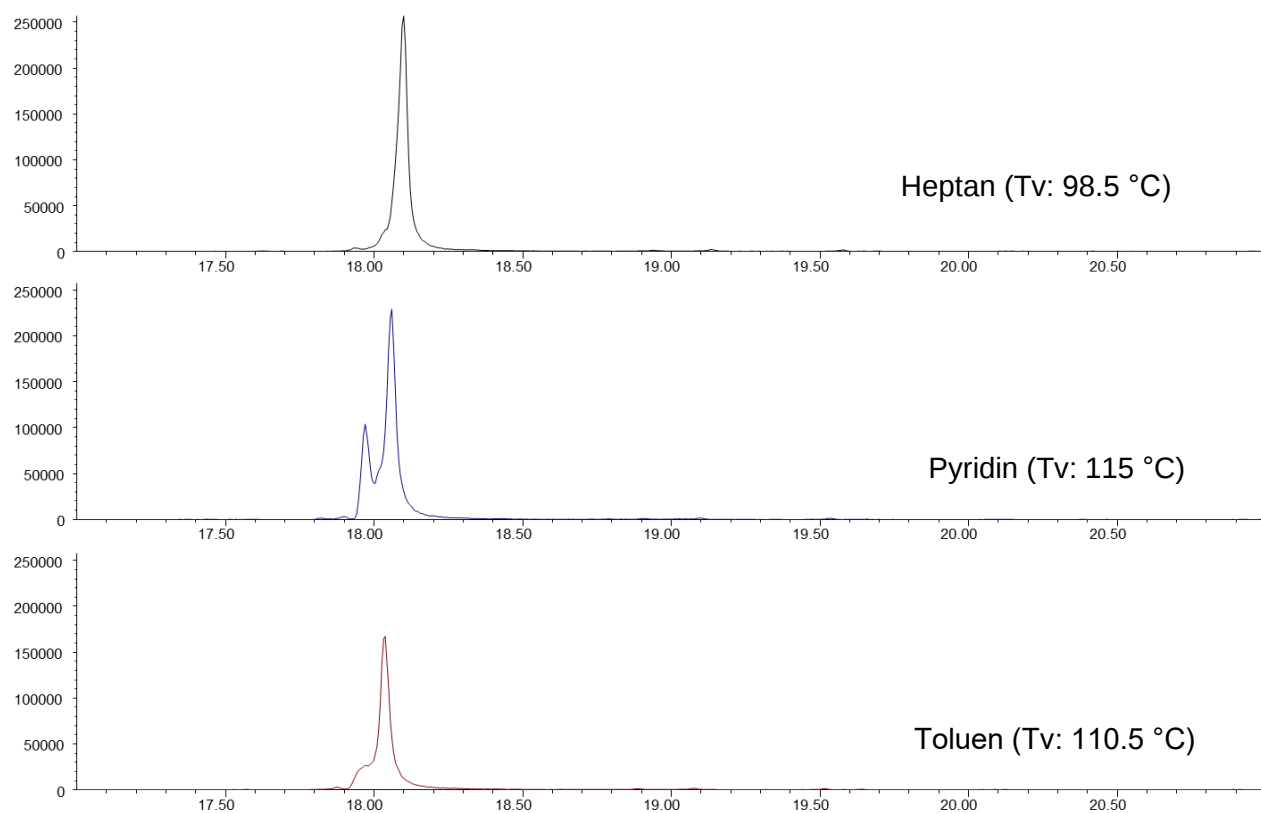
8. Příloha 2: Výstupy z GC-MS analýz



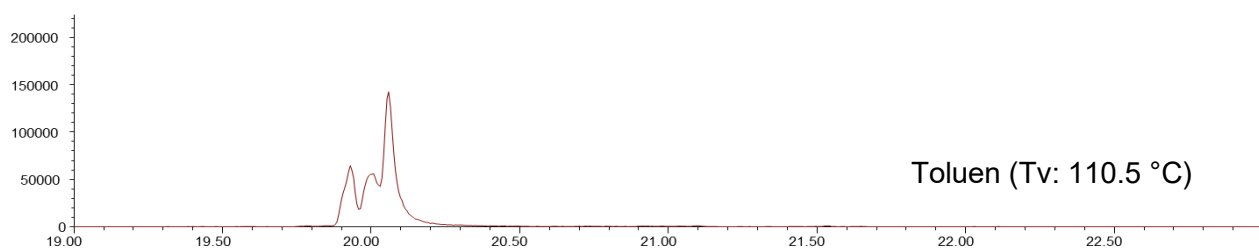
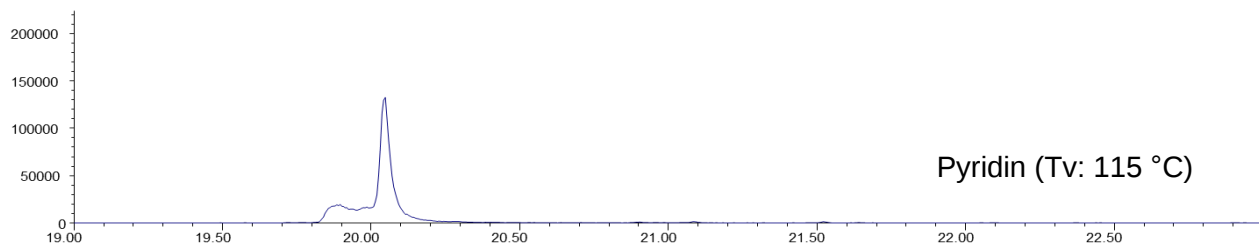
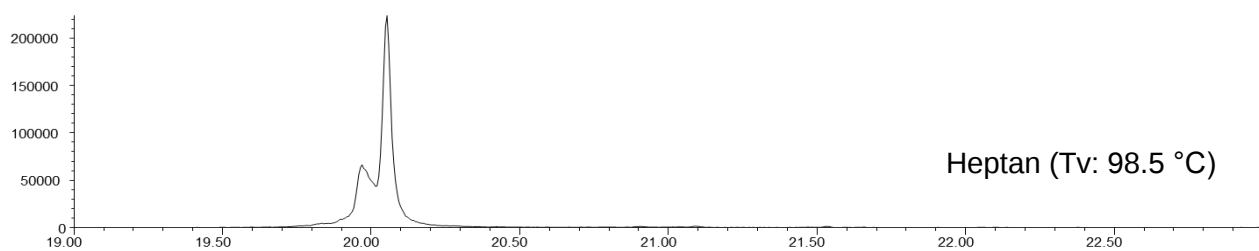
Obr. 21: TIC výstup analýzy jednotlivých standardů kumarinů



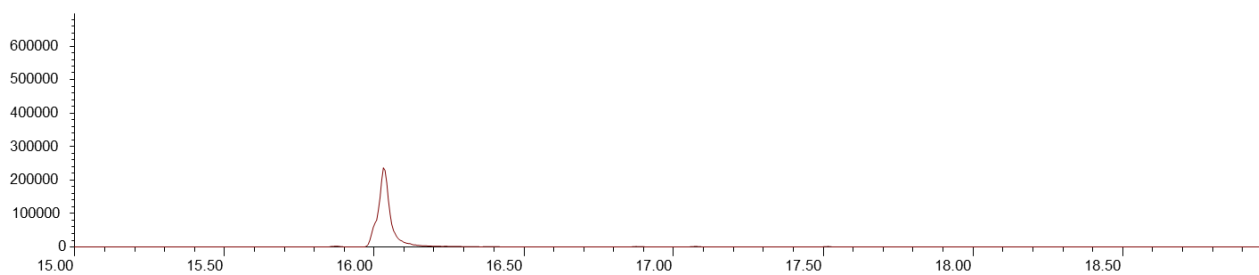
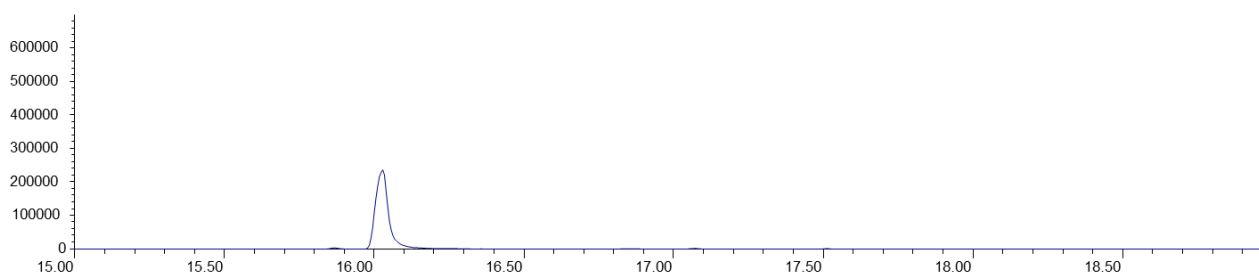
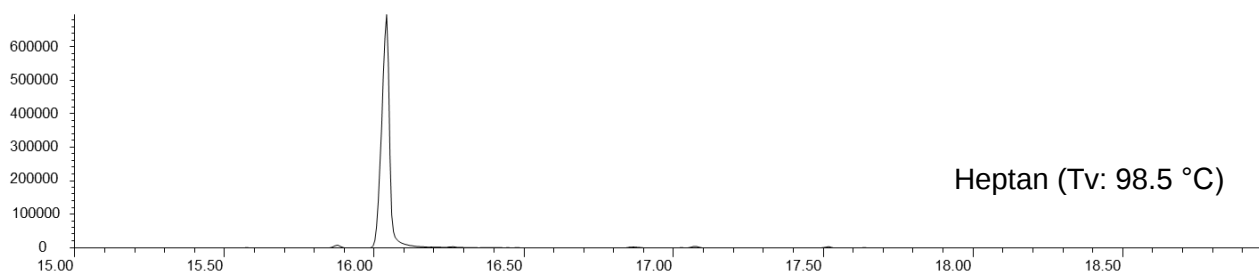
Obr. 22: TIC výstup standardů po derivatizaci činidlem BSTFA, v Pyridinu



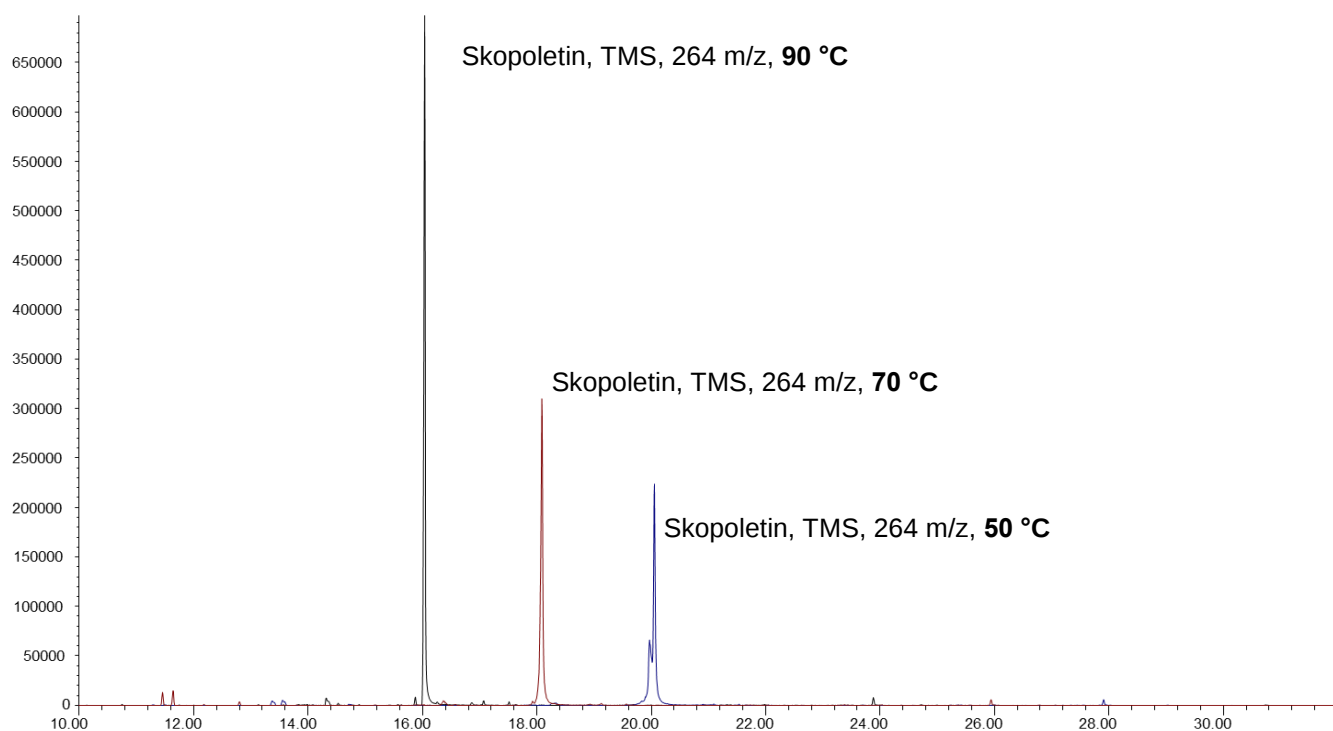
Obr. 23: SIM skopoletinu (TMS) (264 m/z) v různých rozpouštědlech s tep. programem (70 °C start)



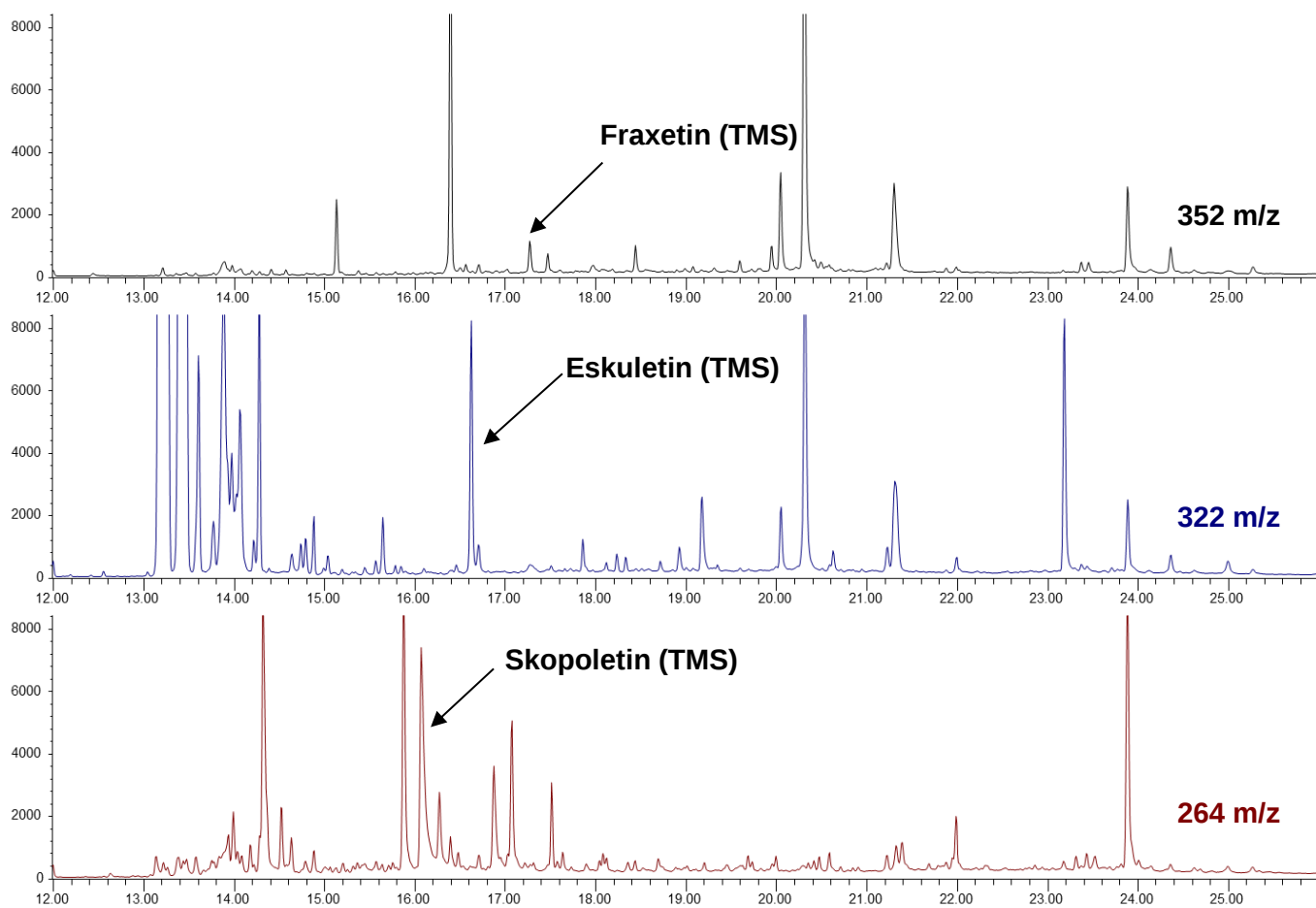
Obr. 24: SIM skopoletinu (TMS) (264 m/z) v různých rozpouštědlech s tep. programem (50 °C start)



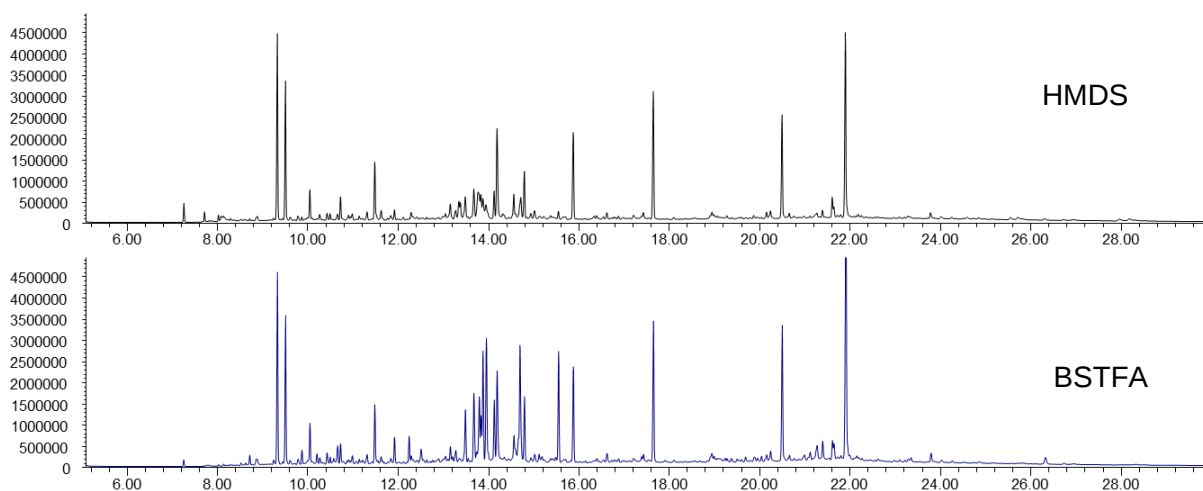
Obr. 25: SIM skopoletinu (TMS) (264 m/z) v různých rozpouštědlech s tep. programem (90 °C start)



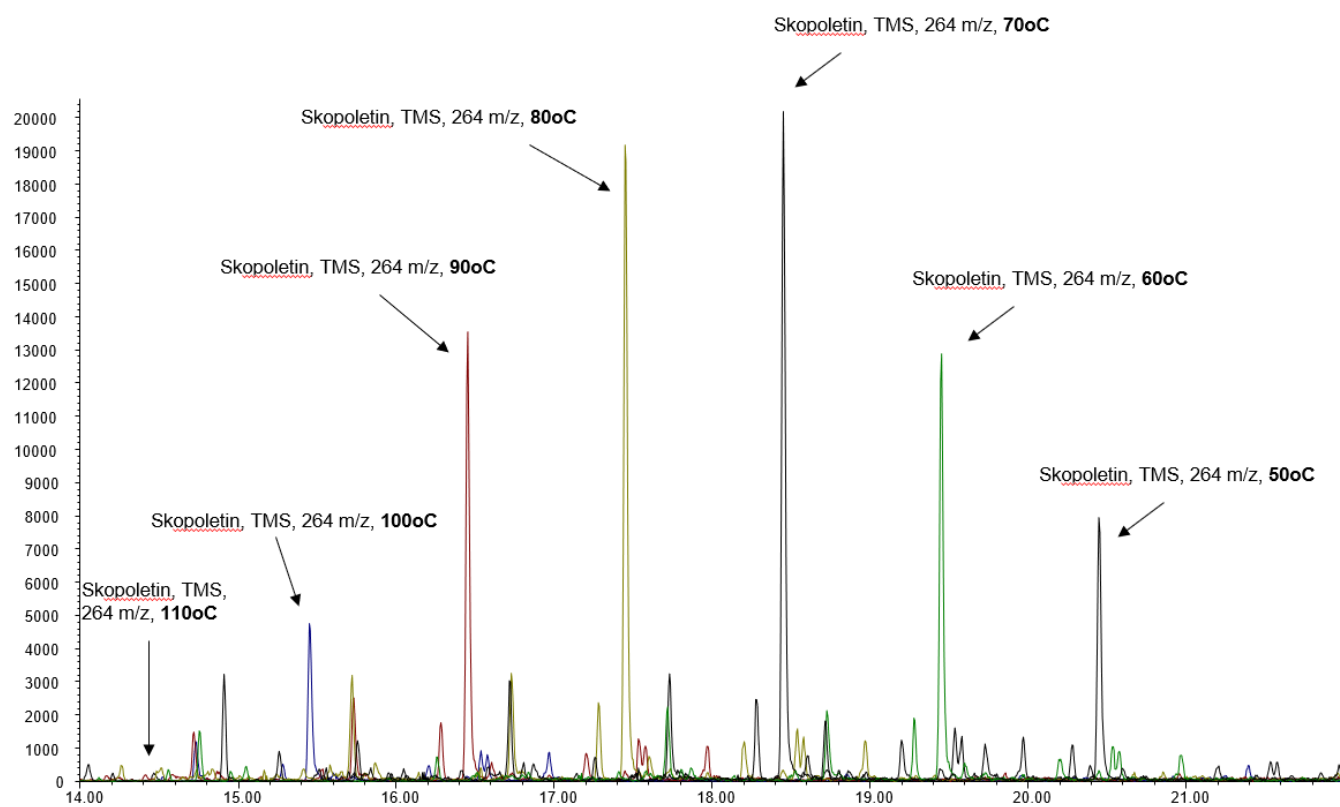
Obr. 26: Porovnání SIM Skopoletinu v heptanu (264 m/z) v heptanu při různých počátečních teplotách analýzy



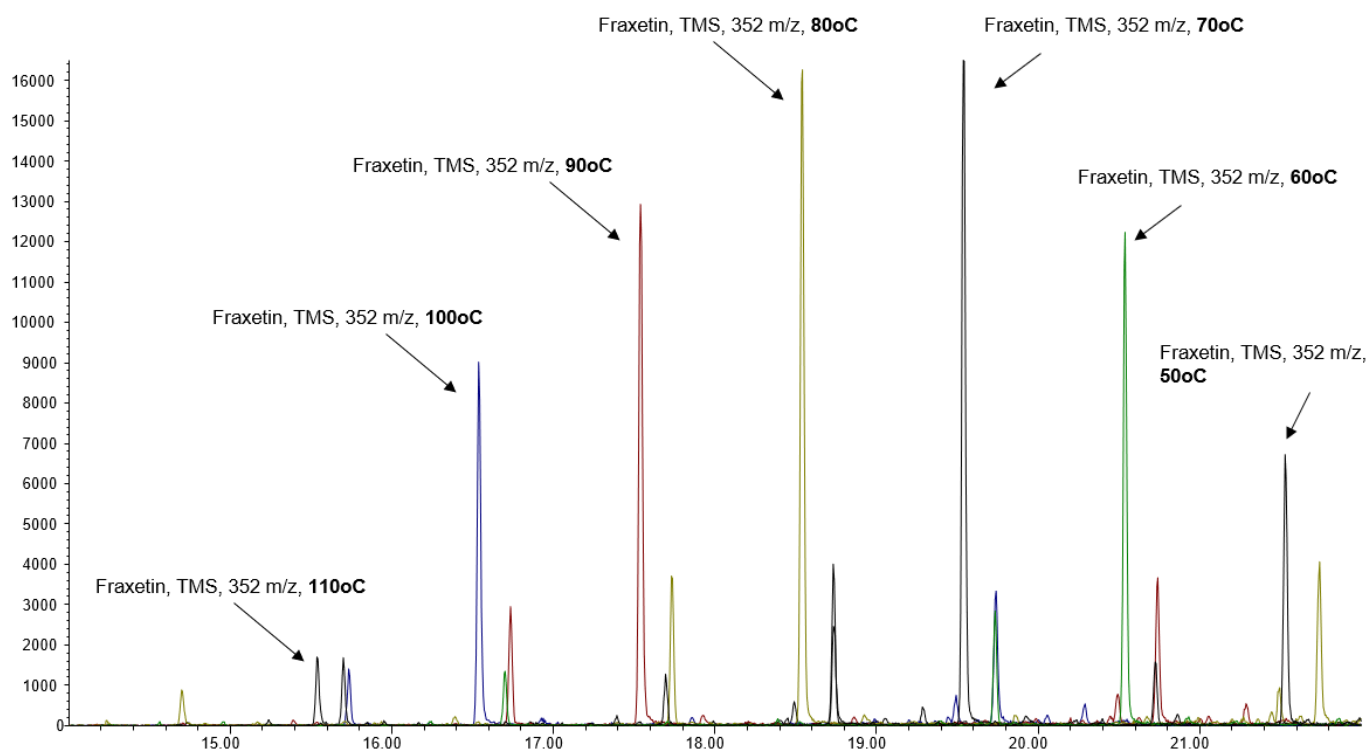
Obr. 27: SIM třech zástupců kumarinů ve vzorku rumu



Obr. 28: TIC výstup dvou derivatizačních činidel



Obr. 29: SIM záznam skopoletinu (TMS) při různých počátečních teplotách



Obr. 30: SIM záznam fraxetinu (TMS) při různých počátečních teplotách