

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Blanka Horká

# GC-MS kvantifikace majoritních složek roztoků založená na využití molekulových fragmentů obsahujících těžké nuklidy běžných prvků

Quantification of main solution components by using fragments  
containing heavy nuclides of common elements

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anton Korban

Praha, 2022

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne 12. května 2022.

Podpis:

## Abstrakt

Kvantifikace majoritních složek metodou plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID) je zavedena v běžné laboratorní praxi. Detektor FID je považován za univerzální detektor pro plynovou chromatografii (GC), ale neposkytuje odezvu pro celou řadu látek a tento detektor poskytuje pouze kvantitativní data. Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je silným analytickým nástrojem, který poskytuje nejen kvantitativní data, ale i kvalitativní data o identitě látek. Při kvantifikaci metodou GC-MS je někdy problémem saturace detektoru, jelikož se jedná o detektor vysoce citlivý (na úrovni ppb). Jedním ze způsobů, jak zamezit přetížení detektoru je výrazné naředění roztoků, což způsobuje snížení mezí detekce a stanovitelnosti metody. Dalším přístupem, jak obejít saturaci detektoru je např. přerušování detekce během eluce rozpouštědla. Pro kvantifikaci majoritních složek roztoků lze aplikovat pouze první ze způsobů, jak saturaci detektoru obejít, ale jedná se o proces náročný na laboratorní práci, který zvětšuje nejistotu měření. Přerušování detekce při eluci rozpouštědla není pro účely kvantifikace majoritních složek použitelný, proto byl navrhnout a následně ověřen nový přístup kvantifikace majoritních složek roztoků pomocí M+1 iontů. Tyto ionty jsou měřeny díky přítomnosti těžkých nuklidů běžných prvků, především uhlíku  $^{13}\text{C}$ , jehož přírodní výskyt se pohybuje okolo 1,07 %. Kvantifikací těchto iontů dojde k výraznému snížení signálu majoritních složek a obejde se tak problém se saturací detektoru. Pro vyhodnocení kvantitativní GC-FID a GC-MS analýzy byla použita metoda externího standardu, kdy byl obsah majoritních složek v roztocích určován z rovnice regrese kalibrační křivky. Dále byla navržena metoda kvantifikace pomocí modifikované závislosti podílu ploch píků složek ku podílu hmotnostních zlomků jednotlivých složek. Pro přípravu kalibračních roztoků majoritních složek a porovnání metrologických vlastností GC-MS s GC-FID bylo zvoleno 8 párů běžně používaných rozpouštědel a pro demonstraci použitelnosti nově vyvíjené metody v praxi byl stanoven obsah ethanolu v 17 alkoholických nápojích.

## Abstract

Quantification of major components by gas chromatography with flame-ionization detector (GC-FID) is established in routine laboratory practice. The FID detector is considered as universal detector for gas chromatography (GC), but it does not provide a response for a wide range of compounds and GC-FID analysis provides only quantitative data. The coupling of gas chromatography with mass spectrometry is a powerful analytical tool that provides not only quantitative data but also qualitative data on the structure of substances. When quantified by GC-MS, the detector oversaturation is a problem as it is a highly sensitive detector (at ppb level). One way to avoid oversaturation of the detector is to significantly dilute the solutions, which causes a decrease in the sensitivity of the method. Another approach to bypass detector saturation is to interrupt detection during solvent elution. For quantification of the major components of solutions, only the first method of bypassing detector saturation can be applied, but it is a labor-intensive process that increases the measurement uncertainty. The interruption of detection during solvent elution is not applicable for the purpose of quantifying major components, so a new approach of quantifying major components of solutions using M+1 ions was proposed and subsequently validated. These ions are provided by the heavy nuclides of common elements, especially carbon  $^{13}\text{C}$ , whose natural abundance is around 1,07 %. Quantification of these ions will lead to a significant reduction in the signal of the main components, thus circumventing the problem of detector saturation. To evaluate the quantitative GC-FID and GC-MS analysis, an external standard method was used, where the major components content of the solutions was calculated from the regression equation of the calibration curve. Furthermore, a quantification method was proposed using a modified dependence of the ratio of the peak areas of the components to the weight fraction of each component. Eight pairs of commonly used solvents were selected for the preparation of major constituent calibration solutions and comparison of the metrological properties of GC-MS with GC-FID, and the ethanol abundance in 17 alcoholic beverages was determined for the application of the newly developed method in practice.

**Klíčová slova**

Alkoholické nápoje  
Elektronová ionizace  
Ethanol  
Externí standard  
Fragmentace  
GC-MS  
GC-FID  
Hmotnostní spektrometrie  
Izotopy  
Kvantifikace  
Majoritní složky  
Plynová chromatografie  
Roztoky  
Těkavé sloučeniny  
Těžké nuklidy

**Keywords**

Alcoholic beverages  
Electron ionization  
Ethanol  
External standard  
Fragmentation  
Gas chromatography  
GC-FID  
GC-MS  
Heavy nuclides  
Isotopes  
Mass spectrometry  
Main components  
Solutions  
Quantification  
Volatile compounds

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Radomírovi Čabalovi, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Antonovi Korbanovi za ochotu a trpělivost při tvorbě této diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým přátelům, kteří mi poskytli podporu při studiu a psaní této práce.

## Obsah

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1.</b>  | <b>Úvod</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>2.</b>  | <b>Teoretická část</b> .....                                      | <b>11</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Plynová chromatografie</b> .....                               | <b>11</b> |
| 2.1.1      | GC-FID.....   | 12        |
| 2.1.2      | GC-MS .....   | 12        |
| <b>2.2</b> | <b>Stanovení majoritních složek metodou GC</b> .....              | <b>15</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Alkoholické produkty</b> .....                                 | <b>16</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Metody stanovení ethanolu v alkoholických produktech</b> ..... | <b>16</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Návrh na použití M+1 iontů pro GC-MS kvantifikaci</b> .....    | <b>23</b> |
| <b>3.</b>  | <b>Experimentální část</b> .....                                  | <b>26</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Seznam použitých chemikálií</b> .....                          | <b>26</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Instrumentace a podmínky měření</b> .....                      | <b>27</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Výpočty</b> .....  | <b>31</b> |
| 3.3.1      | Příprava roztoků .....  | 31        |
| 3.3.2      | Hodnocení naměřených GC dat.....                                  | 31        |
| 3.3.3      | Metody kvantifikace ethanolu .....                                | 32        |
| 3.3.4      | Objemová a hmotnostní procenta .....                              | 33        |
| 3.3.5      | Statistické hodnocení metod.....                                  | 34        |
| <b>4.</b>  | <b>Výsledky a diskuse</b> .....                                   | <b>35</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Pár oktan – toluen</b> .....                                   | <b>36</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Pár heptan – toluen</b> .....                                  | <b>37</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Pár tetrahydrofuran – diethylether</b> .....                   | <b>38</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Pár ethanol – diethylether</b> .....                           | <b>39</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Pár acetonitril – voda</b> .....                               | <b>40</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Pár acetonitril – methanol</b> .....                           | <b>41</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Pár tetrahydrofuran – methanol</b> .....                       | <b>42</b> |
| <b>4.8</b> | <b>Pár ethanol – voda</b> .....                                   | <b>43</b> |
| <b>4.9</b> | <b>Alkoholické nápoje</b> .....                                   | <b>45</b> |
| <b>5.</b>  | <b>Závěr</b> .....  | <b>54</b> |

## Seznam zkratek a symbolů

|        |  |
|--------|--|
| $a$    | směrnice kalibrační křivky   |
| $A_i$  | plocha píku [mV·min]   |
| ABV    | objemová procenta alkoholu (alcohol by volume)   |
| ACN    | acetonitril  |
| $b$    | úsek, který přímka vytíná na ose y   |
| CI     | chemická ionizace (chemical ionization)  |
| $c_i$  | molární koncentrace analytu  |
| DEE    | diethylether   |
| ECD    | detektor elektronového záchytu (electron capture detector)   |
| EI     | elektronová ionizace (electron ionization)   |
| ES     | externí standard (external standard)   |
| EtOH   | ethanol  |
| $F$    | odezvodový faktor  |
| FID    | plamenově ionizační detektor (flame ionization detector)   |
| $G$    | testovací kritérium Grubbsova testu  |
| $n$    | počet měření   |
| GC     | plynová chromatografie (gas chromatography)  |
| GC-FID | plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem<br>(gas chromatography-flame ionization detector) |
| GC-MS  | plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií<br>(gas chromatography-mass spectrometry)     |
| IS     | vnitřní standard (internal standard)   |
| IR     | infračervená spektrometrie (infrared spectroscopy)   |
| LOD    | limit detekce (limit of detection)   |
| $m$    | hmotnost [kg, g]   |
| MEK    | methylethylketon   |
| MetOH  | methanol   |
| MS     | hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)   |
| $m/z$  | poměr hmotnosti a náboje ionizované částice  |
| NIRS   | blízká infračervená spektroskopie (near-infrared spectroscopy)   |
| % obj. | objemová procenta  |
| $RRF$  | relativní odezvodový faktor (relative response factor)   |
| RSD    | relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)  |

|                      |  |
|----------------------|--|
| $R^2$                | koeficient determinace   |
| SIM                  | monitorování vybraného/ých iontu/ů (single ion monitoring)             |
| $s$                  | směrodatná odchylka  |
| TCD                  | tepelně vodivostní detektor (thermal conductivity detector)            |
| THF                  | tetrahydrofuran  |
| TIC                  | celkový iontový proud (total ion current)                              |
| $T(A_{\lambda 1})$   | hodnota absorbance při vlnové délce $\lambda 1$ po vhodné transformaci |
| UV/VIS               | ultrafialová a viditelná oblast (UV/visible)                           |
| $w$                  | hmotnostní procenta [%]  |
| XIC                  | extrahovaný iontový chromatogram (extracted ion chromatogram)          |
| $\bar{x}$            | průměrná hodnota   |
| $Y_{\max}, Y_{\min}$ | maximální a minimální hodnota ze sady měření                           |
| $\rho_{20 i}$        | hustota látky $i$ při 20 °C  |
| $\delta$             | nejistota měření   |
| $t_{0,05}$           | Studentův koeficient pro pravděpodobnost 0,95                          |

## 1. Úvod

Častým typem analýz, se kterým se v analytické laboratoři setkáváme, je kvantitativní analýza, která zahrnuje stanovení minoritních a majoritních složek v různě složitých vzorcích s rozdílnou citlivostí [1]. Existují různé metody kvantitativní analýzy, které fungují na základě různých fyzikálně-chemických procesů. Mezi tyto metody patří například gravimetrie [2], volumetrie [3], polarimetrie [4], refraktometrie [5], UV/VIS [6] a IR [7] spektrofotometrie, kapalinová [8] a plynová chromatografie [9] atd. Velká část analytické práce v klinických, farmaceutických, environmentálních a průmyslových laboratořích zahrnuje metody kvantitativního stanovení konkrétních cílových analytů, jako je například přímé a selektivní stanovení obsahu ethanolu v alkoholických produktech pyknometrickou metodou, refraktometrií, spektrometrickým stanovením v infračervené oblasti či plynovou chromatografií [1,10–13]. Tyto metody jsou běžně používány pro stanovení ethanolu v alkoholických produktech, ale každá z nich má své limitace a nevýhody při stanovení, ať je to časová náročnost na laboratorní práci či následné vyhodnocení dat. Proto je snaha vyvinout nové metody, dostatečně robustní s odezvou ethanolu v širokém lineárním rozsahu, které nebudou vyžadovat předúpravu vzorku a obejdou se bez komplikovaného vyhodnocování dat [10–13].

Cílem diplomové práce bylo ověřit nový přístup kvantifikace majoritních složek roztoků metodou plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem (GC-MS) s využitím molekulových fragmentů obsahující těžké nuklidy běžných prvků, především uhlíku  $^{13}\text{C}$  a ověřit možnost aplikace této metody pro kvantifikaci ethanolu v alkoholických produktech [14].

## 2. Teoretická část

### 2.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC z anglického „gas chromatography“) je vynikající analytický nástroj pro separaci, kvalitativní a kvantitativní stanovení široké škály sloučenin, které lze definovaným způsobem převést do plynného stavu, v různých oblastech výzkumu, chemického a petrochemického průmyslu a kontroly kvality potravin atd. Hlavní výhodou této metody je relativně rychlé a jednoduché provedení analýzy, malé množství vzorku potřebné k analýze a účinná separace látek [15,16]. Pro potřeby detekce sloučenin v širokém koncentračním rozmezí za různých analytických podmínek byla vyvinuta celá řada detektorů, například plamenově ionizační detektor (FID), hmotnostně spektrometrický detektor (MS), tepelně vodivostní detektor (TCD) či detektor elektronového záchytu (ECD). V této práci byla použita plynová chromatografie ve spojení s plamenově ionizačním detektorem a hmotnostně spektrometrickým detektorem [16–20].

V plynové chromatografii se koncentrace analytu určuje relativně odečtením plochy píku a pro vyhodnocení kvantitativní analýzy existují různé výpočtové metody, například metoda externího standardu, která byla použita v této práci. Tato metoda je nazývána externím standardem, jelikož žádná látka o známé koncentraci do zkoušeného vzorku přidávána není a na rozdíl od interního standardu nebo jiných postupů, je v tomto případě standard oddělený od vzorku. Série standardních roztoků, která obsahuje postupně rostoucí známou koncentraci analytu, je proměřena a sestrojena je kalibrační křivka. Body kalibrační závislosti se většinou prokládají pomocí modelu lineární regrese. Vznikne model popsáný rovnicí  $y = ax + b$ , kde  $a$  (směrnice přímky) vyjadřuje citlivost a  $b$  (úsek na ose  $y$ ) signál pozadí. Rovnici lze použít pro výpočet koncentrace neznámého vzorku ( $x$  – nezávislá proměnná) ze změřené odezvy ( $y$  – závislá proměnná). Je-li kalibrační křivka nelineární (například exponenciální, logaritmická či polynomická), bývá stanovení zatíženo větší chybou. Zároveň má výsledná rovnice regrese složitější matematický zápis a je náročnější s ní operovat [9,19–25].

Existují i další kvantitativní výpočtové metody. V případě metody vnitřního standardu je ke zkoušenému a porovnávacímu roztoku přidána látka o stejném množství, která není obsažena ve zkoušeném roztoku, lze ji od zkoumaného analytu rozlišit a nijak s ním nereaguje. Tuto látku nazýváme vnitřním standardem. Její signál porovnáme se signálem analytu o neznámé koncentraci a provede se normalizace vydělením signálu analytu

signálem vnitřního standardu. Pro výpočet koncentrace analytu lze použít jednoduchý vzorec (2.1), kde  $A_x$  je plocha signálu analytu,  $A_s$  je plocha signálu vnitřního standardu,  $c_x$  je koncentrace analytu,  $c_s$  je koncentrace vnitřního standardu a  $F$  se označuje jako odezvový faktor [9,21–23,25].

$$\frac{A_x}{c_x} = F \frac{A_s}{c_s} \quad (2.1)$$

Metoda standardního přídavku je založena na porovnání dvou analyzovaných vzorků, z nichž do jednoho bylo přidáno známé množství látky, která se má stanovovat. Oba roztoky jsou doplněny na stejný objem a proměřeny. Zvýšení hodnoty měřené veličiny je přímo úměrné přidanému množství a z této závislosti dopočítáme obsah složky ve vzorku [20,23].

Metoda vnitřní normalizace byla v této práci použita pro dopočítání čistoty zásobních roztoků po GC-FID analýze (viz kapitola 3.3.1).

### 2.1.1 GC-FID

FID umožňuje analyzovat rozsáhlé spektrum organických látek v širokém koncentračním rozmezí a obecně má vlastnosti ideálního detektoru pro GC. Jedná se o relativně levný detektor s extrémně rychlou odezvou při analýze, širokým lineárním dynamickým rozsahem ( $10^7$ ), pracovním rozsahem 0,1 až 100 000 ppm a minimálním detekovatelným množstvím  $10^{-11}$  g. Odezva FID závisí na počtu iontů produkovaných sloučeninou, proto GC-FID analýzou získáme pouze kvantitativní informace a kvalitativní informace o struktuře látky zcela chybí [16,19,26–28]. Tento detektor je citlivý na organické látky, které jsou při pyrolýze v plameni schopny vytvářet kationty a elektrony [22,29]. FID je považován za univerzální detektor i přesto, že celá řada látek proto nebude detekována, konkrétně mezi ně patří vodík, kyslík, dusík, voda, sirovodík, oxid siřičitý, kyselina mravenčí, amoniak a oxid uhličitý [19,22,29–31].

### 2.1.2 GC-MS

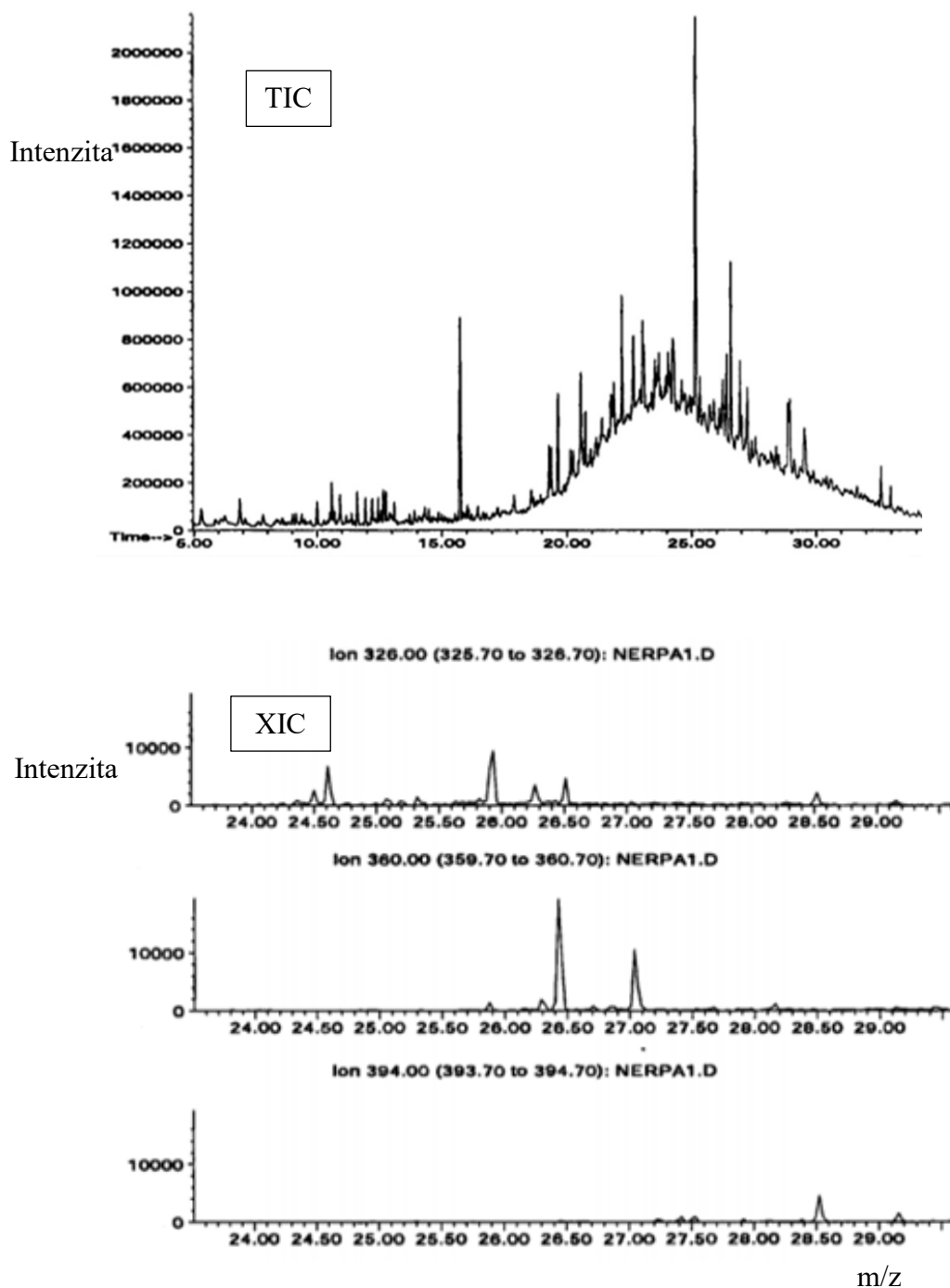
Plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) je synergická kombinace dvou výkonných analytických technik. Hmotnostní spektrometrie je nejvýkonnější detektor GC, poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace s vysokou citlivostí a rozlišuje definovaných podmínek různé látky se stejným retenčním časem [22,31]. Lze ji rozdělit na dva samostatné procesy: ionizaci a hmotnostní separaci a záznam vytvořených iontů. Různé způsoby ionizace (elektronová ionizace (EI)) a

chemická ionizace (CI)) mohou být kombinovány s různými typy analyzátorů (kvadrupól, magnetický sektorový analyzátor, 3D a lineární iontová past, analyzátor doby letu, iontová cyklotronová rezonance, orbitrap atd.) v závislosti na typu látek a požadavcích analýzy [19,32,33]. Kvadrupól se řadí mezi hmotnostní analyzátory s nižším rozlišením, vysokou citlivostí, rychlým snímáním v milisekundových intervalech a umožňuje dva typy MS záznamů – scan a SIM [19,32,33].

Skenování v nastaveném rozsahu hmot  $m/z$  lze použít k identifikaci látek. Intenzita signálu hmotnostního spektrometru odpovídající zvolenému rozsahu hodnot  $m/z$  v závislosti na čase se označuje jako chromatogram celkového iontového proudu – TIC (total ion current). Tento záznam je téměř analogický k chromatogramu získanému GC-FID analýzou, ale v případě GC-MS lze z TIC záznamu extrahovat chromatogram určitého charakteristického iontu, který se nazývá extrahovaný iontový chromatogram (XIC – extracted ion chromatogram) a slouží k rozlišení možných koelucí nebo iontů chromatografického pozadí (Obr. 2.1) [23,34,35].

Naprogramováním přístroje GC-MS lze sledovat několik vybraných iontů současně v různých časových intervalech (SIM – selected ion monitoring). V tomto režimu hmotnostní spektrometr netraví čas skenováním celého rozsahu  $m/z$ , ale zaznamenává iontový proud pouze při vybraných hodnotách  $m/z$ . Monitorováním pouze vybraných iontů lze dosáhnout vysoké citlivosti a specifity. Tato metoda umožňuje kvantitativní analýzu na úrovni ppb a v porovnání s GC-FID analýzou je výrazně citlivější. Typickým příkladem použití SIM je kvantitativní stanovení specifických sloučenin v komplexní směsi, zvláště když jsou přítomny v nízkých koncentracích [14,19,31–38].

TIC, XIC a SIM jsou díky vysoké citlivosti využívány v cílené a stopové analýze, kdy je známá struktura sledovaných látek. Skenování v nastaveném rozsahu hmot  $m/z$  je méně citlivé než SIM, protože na proměření každého z iontů je k dispozici menší množství času. Zvýšení citlivosti SCAN je dosaženo snížením skenovaného hmotnostního rozsahu [23,34,35].



Obr. 2.1: Obrázek zobrazující celkový záznam signálu TIC (1) a záznam extrahovaných iontů  $m/z$  326, 360 a 394 (XIC) z původního TIC, (Převzato z [39]).

Výsledkem jedné GC-MS analýzy je chromatografický záznam včetně hmotnostního spektra, díky kterému porovnáním s knihovnami hmotnostních spekter, např. NIST nebo Wiley, získáme informace o identitě látky. Potenciál analytických schopností spojení GC-MS je doprovázen vysokými požadavky na instrumentaci, které jsou spojeny s výraznou finanční zátěží [19,22,23,31–33].

## 2.2 Stanovení majoritních složek metodou GC

Aplikační oblast kvantitativního stanovení metodou plynové chromatografie zahrnuje široké spektrum analýz, například kontrolu kvality paliv, stanovení uhlovodíkových směsí v potravinářském průmyslu, petrochemickém průmyslu, farmaceutickém průmyslu a další jiné analýzy. Pojem „majoritní složka“ je pouze relativní, jelikož konkrétní definice neexistuje, ale někteří autoři uvádí, že jako majoritní složku lze považovat látku s koncentrací vyšší než 1 % [40,41]. V rámci této práce jsme definovali majoritní složku jako látku zastoupenou z více než 15 % z celkového obsahu složení roztoku.

Příkladem kvantitativního stanovení majoritních složek metodou GC je stanovení hlavních složek bioplynu – methanu (50-85 %) a oxidu uhličitého (25-55 %), jejichž množství závisí na původu a kvalitě paliva. Pro stanovení těchto složek se používá převážně plynová chromatografie s tepelně vodivostním detektorem (GC-TCD) či plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID) za použití dusíku či argonu jako nosného plynu [42–44].

Dai a spol. vyvinuli analytickou metodu pro současné stanovení nikotinu a hlavních složek kapalně i aerosolové fáze elektronických cigaret – propylenglykolu a glycerinu, které tvoří více než 80 % náplně e-cigarety. Po předúpravě vzorků, která zahrnovala ředění methanolem, zadržování na vzduchovém filtru a extrakci methanolem byly oba typy vzorků analyzovány pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID). Analýzy byly hodnoceny použitím přístupu MCT (mass change tracking), kdy se sledují změny hmotnosti pro zjištění skutečné hmotnostní bilance mezi kontaminanty uvolňovanými při používání e-cigaret a kontaminanty původně obsaženými v e-tekutinách [45,46]. V této studii byl zvolen jako vnitřní standard chinolin. Kvantifikace vzorků náplně e-cigarety byla provedena pomocí dvou různých kalibračních metod, pomocí metody kalibrační křivky a metody standardního přídatku. Bylo zjištěno, že metoda kalibrační křivky poskytuje lepší opakovatelnost, reprodukovatelnost a nižší relativní směrodatnou odchylku (RSD: přibližně  $\leq 2$  %). Limity detekce (LOD) majoritních složek byly stanoveny jako 0,72 ng pro propylenglykol a 8,15 ng glycerinu u kapalných vzorků. U vzorků aerosolů byl LOD 0,96 ng propylenglykolu a 3,99 ng glycerinu. Celkově byla tato metoda dostatečně spolehlivá pro stanovení těchto analytů jak u kapalných, tak u aerosolových vzorků.

V další studii je popsáno stanovení hlavní složky eukalyptového esenciálního oleje – eukalyptolu (1,8-cineolu), který zastupuje 60-85% celkového složení oleje. Každý vzorek

byl rozpuštěn v hexanu v poměru 4:200. Vzorčky byly zředěny a analyzovány plynovým chromatografem spojeným s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID). Kvantitativní stanovení eukalyptolu a vedlejších složek silice je nezbytné pro zaručení kvality komerčně dostupných esenciálních olejů [47]. Bylo prokázáno, že tato metoda je specifická a selektivní pro stanovení eukalyptolu v eukalyptovém oleji.

### **2.3 Alkoholické produkty**

Alkoholické nápoje jsou ve velikém množství konzumovány a vyráběny po celém světě. Podle definice se za alkoholický nápoj považuje jakákoli pitná tekutina obsahující ethanol zemědělského původu v rozsahu 0,5 až 70 % (obj.). Existuje široká škála nápojů s různým obsahem alkoholu (alcohol by volume – ABV), technologickým postupem při výrobě, zastoupením minoritních složek apod. Kromě ethanolu obsahují alkoholické nápoje rozmanité spektrum látek, protože zdroje surovin pro výrobu těchto produktů jsou různé, jsou jimi obiloviny, ovoce (švestky, hrušky, hroznové víno, jablka), brambory, rýže, maniok, cukrová třtina a další. Při kvalitativní analýze jsou sledovány především těkavé kyseliny, aldehydy, methanol, vyšší alkoholy (například 2-methyl-butan-1-ol), estery karboxylových kyselin (methylacetát, ethylacetát, ethyl-formiát), taniny a sacharidy. Například v brandy může být obsaženo až 100 různých látek [14,48–54].

Úroveň zastoupení některých složek alkoholických nápojů je předmětem legislativních omezení. Během kontroly kvality potravin je těmto složkám věnována pozornost, aby bylo zajištěno, že nepřekračují hranici maximálního povoleného množství. Podle mezinárodních legislativních dokumentů byly stanoveny obecné výrobní postupy a limity analytického složení destilátů a byly určeny referenční metody používané pro rozbor lihovin. Jednou z referenčních metod je GC-FID, která je obecně určena pro stanovení těkavých látek, tedy i ethanolu [14,48–51,55–58].

### **2.4 Metody stanovení ethanolu v alkoholických produktech**

Alkoholické produkty (s přihlédnutím ke všem minoritním složkám) lze popsat jako binární směs dvou majoritních složek, ethanolu a vody. Množství ethanolu v těchto výrobcích je jasně definovaná a sledovaná hodnota, která podléhá mezinárodním standardům a nařízením, které stanovují referenční metody kvantifikace ethanolu v alkoholických nápojích, chemických a technických přípravcích, farmakách atp. Obsah alkoholu v alkoholických nápojích je parametrem pro stanovení výše daní, které jsou na

alkoholické produkty uvalovány. Čím vyšší je obsah alkoholu v prodávané lihovině, tím vyšší je spotřební daň [59].

Jednou z referenčních metod je GC-FID, která je obecně určena pro stanovení těkavých látek, tedy i ethanolu [14,48–51,55–58]. GC-MS se k zavedeným referenčním metodám neřadí, ale existuje celá řada vědeckých článků, které se věnují kvantifikaci ethanolu v alkoholických nápojích [14,60,61].

Některé studie [14,60,61] se věnovaly možnému použití ethanolu jako vnitřního standardu (IS) pro kvantifikaci těkavých látek v lihovinách metodou GC-MS. Tato metoda byla porovnána s metodou používající 1-pentanol jako interní standard, která se běžně používá při kontrole kvality alkoholických výrobků. Byly navrženy dva možné přístupy, jak se vyhnout saturaci detektoru při detekci ethanolu. První z nich spočíval v použití méně zastoupených iontů  $m/z$  47 pro kvantifikaci ethanolu. Tyto ionty odpovídají především nefragmentovaným těžkým molekulám ethanolu obsahujícím jeden izotop  $^{13}\text{C}$ . Druhá metoda spočívala ve snížení napětí elektronového násobiče MS, které mělo vliv na průběh kalibračních křivek, jelikož byly získány závislosti s exponenciálním průběhem. I když je tuto metodu možné použít pro kvantifikaci ethanolu v alkoholických produktech, byla tato metoda vyhodnocena jako méně vhodná, jelikož metoda za využití izotopového přístupu prokázala dobrou linearitu. Použití kvantifikačních  $M+1$  iontů bylo vyhodnoceno jako jedno z vhodných způsobů, jak získat kvantitativní data pro analýzu ethanolu a ostatních těkavých látek v alkoholických produktech [14,60,61].

V rámci dohody o spolupráci mezi Katedrou analytické chemie PřF UK a firmou Rudolf Jelínek jsme se obrátili na zástupce této firmy s dotazem, jakým způsobem stanovují obsah ethanolu v alkoholických produktech, jelikož se jedná o jednu z největších výroben destilátů v České republice, která má v portfoliu více než 200 různých receptur alkoholických nápojů. Obsah ethanolu je stanovován přístrojem od firmy Anton Paar – Alcolyzer ME (fungující na základě blízké infračervené spektroskopie) v kombinaci s polarimetrem a hustoměrem, který umožňuje velice rychle, efektivně a přesně změřit obsah alkoholu ve vzorcích jakými jsou pivo, víno, cider, kombucha apod. Alcolyzer dosahuje přesnosti  $\pm 0,1$  % obj. alkoholu a opakovatelnosti  $\pm 0,01$  % obj. alkoholu [13,62–64].

Blízká infračervená spektroskopie (NIRS, z anglického Near-infrared spectroscopy) je rychlá a přesná nedestruktivní technika, která je používána k analýze řady zemědělských a potravinářských výrobků a umožňuje přímé stanovení alkoholu v hotovém produktu bez nutnosti destilace. Při průchodu optického záření absorbujícím

prostředím dochází k poklesu jeho intenzity. NIR spektroskopie patří mezi tzv. sekundární metody, kdy koncentraci složek nelze určit pouze na základě spektroskopických měření. K nalezení příslušných vztahů a vhodného postupu zpracování spektrálních měření je nutné použít výsledky referenční, dobře reprodukovatelné metody. Sada vzorků se zanalyzuje referenční metodou a následně jsou výsledky sekundární metody porovnány s výsledky srovnávací metody. Čím více se blíží výsledky sekundární metody k výsledkům metody referenční, tím lépe je tato nová metoda vyvinuta. Pro spektroskopické stanovení obsahu ethanolu v pivu se ukázala jako úspěšná metoda MLR (multivariační lineární regrese), pomocí které lze získat rovnici (2.2), kde  $C$  vyjadřuje koncentraci ethanolu ve vzorku piva,  $a_i$  jsou koeficienty ( $i = 1 \dots n$ ),  $T(A_{\lambda_i})$  je hodnota absorbance při vlnové délce  $\lambda_i$  po vhodné transformaci (derivace apod.) [13,62,63].

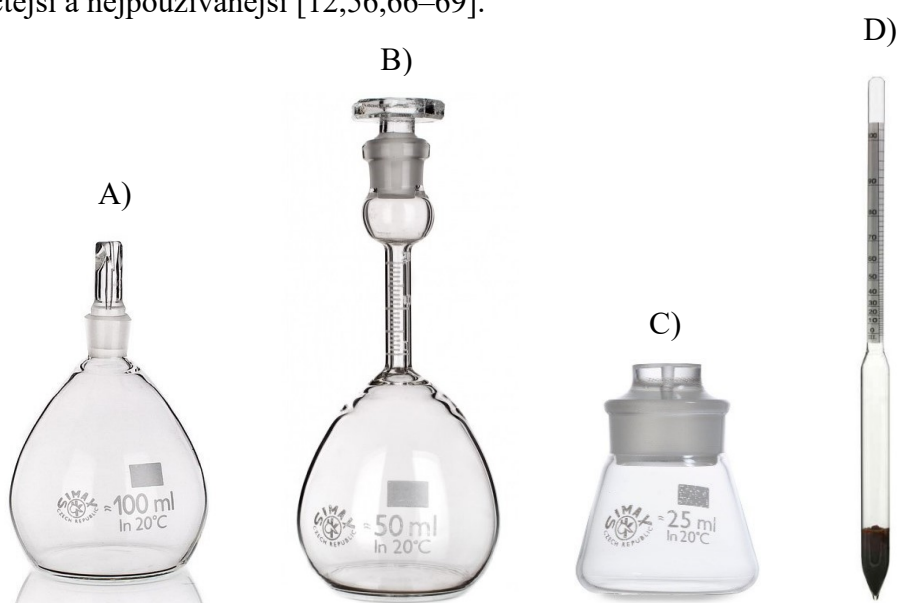
$$C = a_0 + a_1T(A_{\lambda_1}) + a_2T(A_{\lambda_2}) + \dots + a_nT(A_{\lambda_n}) \quad (2.2)$$

Metodou NIRS lze dosáhnout výborné reprodukovatelnosti výsledků měření spolu s vysokou přesností [13,62–65]. NIRS vykazuje dobrou citlivost a nabízí detekční limity v řádu 0,1 % (w/w). Problémem je stanovení obsahu ethanolu likérech, které mají vysokou hladinu cukru – více než 100 g/l. U těchto nápojů je stanovení obsahu ethanolu pouze orientační a pro přesné měření se musí stanovit korekční faktor, který je určen porovnáváním NIRS stanovení s pyknometrickým měřením.

V Evropském lékopisu, který vypracovává Evropská lékopisná komise, jsou uvedeny tři metody stanovení obsahu ethanolu v tekutých farmaceutických přípravcích. Obsah ethanolu v kapalném farmaku je vyjádřen jako počet objemových jednotek ethanolu ve 100 objemových jednotkách kapaliny, přičemž jsou objemy měřeny při teplotě  $20 \pm 0,1$  °C. Zastoupení ethanolu lze vyjádřit buď v hmotnostních procentech jako g ethanolu na 100 g kapaliny nebo v objemových procentech [66].

První uváděnou metodou, kterou stanovilo i Nařízení komise (ES) č. 2870/2000 jako referenční metodu používanou pro rozbor lihovin a v mezinárodním standardu ISO 758 je uvedena jako referenční metoda pro stanovení hustoty kapalných chemických produktů pro průmyslové využití (ethanol pro průmyslové využití), je pyknometrie. Při pyknometrickém stanovení obsahu ethanolu ve vodných roztocích je využito hustoty. Na Obr. 2.2 je zobrazeno několik typů pyknometrů, konkrétně pyknometr dle Gay-Lussaca (A), Reischauera (B), Hubbarda (C) a ponorný skleněný lihoměr (D), které jsou určeny pro stanovení obsahu ethanolu v % obj. ve vodných ethanolových roztocích právě na

základě hustoty kapaliny. Pokud přípravky obsahují jiné rozpuštěné látky je třeba směs předestilovat, protože ostatní látky by hustotu roztoku zkreslovaly. Téměř všechny těkavé kongenery, jako například methanol, mají hustotu podobnou ethanolu, a proto by výsledek neodpovídal obsahu ethanolu v produktu a měření by bylo zatíženo velikou chybou. Referenční hodnoty obsahu alkoholu v % objemových při 20 °C pro hustoty různých směsí voda-alkohol při 20 °C jsou uvedeny v tabulce, kterou na mezinárodní úrovni přijala Mezinárodní organizace pro legální metrologii. Kvůli komplikovaným postupům předúpravy (např. destilace), které již tak zdlouhavý postup práce prodlužují a kvůli požadovanému velkému objemu vzorku pro stanovení nepatří tato metoda mezi nejpraktičtější a nejpoužívanější [12,56,66–69].



Obr. 2.2: Pyknometr dle Gay-Lussaca (A), Reischauera (B), Hubbarda (C) a ponorný skleněný lihoměr (D), které jsou určeny pro stanovení obsahu ethanolu v % obj. ve vodných ethanolových roztocích na základě hustoty kapaliny, (Převzato z [70–73]).

Další metoda uvedená v Evropském lékopisu využívá headspace plynové chromatografie s FID detekcí a 1-propanolem jako vnitřním standardem. Uvedeny byly experimentální podmínky, které by mohly být při stanovení obsahu ethanolu použity – rovnovážný čas (20 minut) a rovnovážná teplota (85 °C). Pro stanovení obsahu ethanolu ve vodných farmaceutických přípravcích je připravena sada roztoků – naředěný bezvodý ethanol (A), tři vzorky sledovaného přípravku o různých koncentracích s přidávkou vnitřního standardu (B-D), naředěný roztok methanolu (E) a posledním vzorkem je směs standardního přídatku s vzorky E a F. Sestaví se kalibrační křivka s koncentrací ethanolu v referenčních roztocích (B), (C), (D) a (F) na ose x a poměr plochy píku ethanolu k ploše

píku vnitřního standardu z odpovídajících chromatogramů na ose y. Z této závislosti se dopočítá procentuální obsah ethanolu ve zkoušeném přípravku. Tato metoda je efektivní a přesná, ale je náročná na laboratorní práci, zdlouhavá a nevýhodou jsou komplikované výpočty pro zjištění obsahu ethanolu [66].

Třetí metodou je plynová chromatografie s FID detektorem a vnitřním standardem 1-propanolem. Pro stanovení obsahu ethanolu ve vodných farmaceutických přípravcích je připravena sada roztoků – naředěný analyzovaný přípravek s přidavkem vnitřního standardu, porovnávací vzorek ethanolu (A) a methanolu (B) a směs interního standardu (C) s porovnávacími vzorky A a B. Obsah ethanolu v přípravku je vyjádřen v objemových procentech (% obj.) a je vyhodnocen podle následujícího vzorce (2.3), kde  $A_1$  je plocha píku ethanolu ve stanovovaném roztoku,  $A_2$  je plocha píku ethanolu porovnávacího roztoku C,  $I_1$  je plocha píku vnitřního standardu ve stanovovaném roztoku,  $I_2$  je plocha píku vnitřního standardu v porovnávacím vzorku C a  $V_1$  je objem stanovovaného přípravku v testovaném vzorku v mililitrech [66].

$$(\% \text{ obj.})_{\text{ethanol}} = \frac{A_1 \cdot I_2 \cdot 100}{A_2 \cdot I_1 \cdot V_1} \quad (2.3)$$

Kvantitativní stanovení těkavých sloučenin se často provádí pomocí GC tradiční metodou vnitřního standardu [74–77]. Lze ji využít i pro stanovení obsahu ethanolu v alkoholických nápojích. V člancích od Wanga z roku 2002 a 2003 je popsáno stanovení ethanolu pomocí acetonitrilu jako interního standardu kapilární plynovou chromatografií s FID detekcí. Ethanol (1% w/v) byl smíchán s acetonitrem (1% w/v) v různých poměrech (ethanol:acetonitril – 15:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 a 1:15). Kalibrační přímka s lineární funkcí byla sestrojena vynesemím poměru ploch píku ethanolu a acetonitrilu (osa y) oproti poměru koncentrací ethanolu a acetonitrilu (osa x) a směrnice kalibrační křivky odpovídala relativnímu odezvovému faktoru  $RRF_{EtOH/ACN}$  (viz rovnice 2.4). Popsanou závislost lze vyjádřit výpočtem, kde  $A_1$  je plocha píku ethanolu získaná GC analýzou,  $A_2$  je plocha píku interního standardu acetonitrilu získaná GC analýzou,  $m_1$  je hmotnost ethanolu v mg,  $m_2$  je hmotnost acetonitrilu v mg [75,78].

$$\frac{A_1}{A_2} = RRF_{EtOH/ACN} \cdot \frac{m_1}{m_2} \quad (2.4)$$

Obsah ethanolu byl vypočítán podle následující rovnice (2.5), kde  $A_1$  je plocha píku ethanolu získaná GC analýzou,  $A_2$  je plocha píku interního standardu acetonitrilu získaná GC analýzou,  $w_2$  je hmotnost interního standardu acetonitrilu v mg,  $RRF_{EtOH/ACN}$  je

relativní odezvoový faktor ethanolu vztažený k odezvě IS acetonitrilu a  $V$  je objem vzorku v ml [75,78].

$$Ethanol \left( \frac{mg}{ml} \right) = \frac{A_1}{A_2} \cdot \frac{w_2}{RRF_{EtOH/ACN}} \cdot \frac{1}{V} \quad (2.5)$$

Přesnost navržené metody byla hodnocena variačním koeficientem (relativní směrodatnou odchylkou). Výsledky ukázaly, že absolutní hodnoty relativních chyb průměrných hodnot byly všechny menší než 5,6 %, což znamená, že přesnost této metody je obecně srovnatelná s jakoukoli publikovanou metodou. Stanoven byl také relativní faktor odezvy ethanolu vůči vnitřnímu standardu acetonitrilu ( $RRF_{EtOH/ACN} = 0,89$ ). Lineární rozsah měření pro ethanol byl 0-500 mg/ml a LOQ této metody pro ethanol byl 5 mg/ml [75,78].

Hlavním cílem studie od Stupáka *a spol.* z roku 2017 bylo vyvinout dostatečně přesnou metodu pro stanovení obsahu alkoholu v různých destilátech, vínech a některých dalších nápojích s vyšším obsahem rozpuštěných pevných látek (sacharidy apod.) metodou GC-MS. Kvantifikace ethanolu byla provedena izotopovým ředěním vnitřního standardu 2,2,2- D<sub>3</sub>-ethanolu. Validace metody byla provedena pro pět různých kategorií destilátů reprezentovaných vodkou, whisky, hruškovicí, grappou a rumem (lišící se obsahem dalších běžně kontrolovaných těkavých látek jako jsou acetaldehyd, methanol, ethyl acetát), tři druhy vín a vaječný likér. MS detektor s kvadrupólovým analyzátozem pracoval v režimu elektronové ionizace. Pro analýzu byly vybrány následující ionty ( $m/z$ ) pro sledování cílových analytů: ethanol (46 – kvantifikátor), (45 – kvalifikátor), 2,2,2- D<sub>3</sub>-ethanol (49 – kvantifikátor, 48 – kvalifikátor); methanol (32, 31, 29); 2-methylpropan-2-ol (59, 41) a propan-2-ol (45, 43). Pro výpočet obsahu ethanolu ve vzorcích byly sestrojeny dvě kalibrační křivky s různými rozsahy zastoupení ethanolu 35-65 % a 12-22 %. Obsah ethanolu v objemových procentech (% obj.) byl přepočten z hmotnostních procent ( $w_{ethanol}$ ), které byly vypočteny podle následujícího vzorce (2.6), kde  $f$  je poměr mezi intenzitou iontu  $m/z$  46 a  $m/z$  49,  $a$  je úsek a  $b$  je směrnice kalibrační křivky [79].

$$w_{ethanol} = \frac{(f \cdot m_{IST} - a) \cdot m_{(IST+vzorek+voda)}}{b \cdot m_{vzorek}} \left[ \frac{g}{kg} \right] \quad (2.6)$$

Objemová procenta ethanolu ((% obj.)<sub>ethanol</sub>) byla přepočítána podle následujícího vzorce (2.7) s použitím mezinárodních alkoholometrických tabulek přijatých Mezinárodní

organizací pro legální metrologii, kde  $w_{ethanol}$  je hmotnostní procento ethanolu,  $\rho_{20 ethanol}$  je hustota ethanolu,  $\rho_{20 vzorek}$  je hustota vzorku [79].

$$(\% \text{ obj.})_{ethanol} = \frac{w_{ethanol} \cdot \rho_{20 vzorek}}{\rho_{20 ethanol}} [\%] \quad (2.7)$$

Opakovatelnost stanoveného obsahu alkoholu byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD). U zkoušených vzorků destilátů a vín se pohybovala v rozmezí 0,19-0,98 % a v případě vaječného likéru a portského vína byla RSD o něco vyšší (0,98 %). Obsah alkoholu stanovený metodou GC-MS se blížil hodnotám deklarovaným na etiketě. Přesnost měření byla vysoká, pohybovala se v rozmezí od 0,48 do 0,90 %. Tato metoda je ze statistického hlediska velice efektivní, ale nevýhodou je finanční náročnost vnitřního standardu 2,2,2-D<sub>3</sub>-ethanolu, časová náročnost laboratorní práce a následné poměrně komplikované vyhodnocení dat [79].

Ve studii od Betze *a spol.* byla aplikována technika kapalinové chromatografie na reverzní fázi s nepřímou UV detekcí pro stanovení ethanolu v alkoholických nápojích (gin, vodka a whisky) a vodných roztocích. Konkrétními účely bylo studium vlivu několika proměnných na kvantifikaci ethanolu touto technikou a stanovení optimálních analytických podmínek, přesnosti, linearity a dalších charakteristik navrhovaného postupu. Během optimalizace metody byly testovány různé chromatografické podmínky – složení mobilní fáze a typy kolon (CN, C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>). Bylo zjištěno, že analýza je nejúspěšnější při použití kolony C<sub>18</sub> se složením mobilní fáze methanol/voda v poměru 30:70. S výjimkou filtrace k odstranění pevných částic byly vzorky dávkovány bez předběžné úpravy. Stanovení ethanolu bylo provedeno v chromatografickém systému s methylethylketonem (MEK) jako detekčním činidlem. Přesnost navrhovaného postupu (s odchylkou menší než 2 %) byla ověřena porovnáním zjištěného procenta ethanolu s procentem uvedeným na etiketě komerčních výrobků [8].

Další často zmiňovanou metodou pro stanovení koncentrace ethanolu je refraktometrie, která nachází široké uplatnění při kontrolách během produkce nejen alkoholických produktů (ovocné pálenky, destiláty – bourbon, vodka, gin, pivo, víno, mošty a džusy atd.). Měřením indexu lomu světelného paprsku na rozhraní dvousložkového systému voda-ethanol je stanoveno ABV. Komerčně se vyrábí malé ruční refraktometry, které jsou využívány například v potravinářském průmyslu pro měření cukernatosti moštu a přirozeného obsahu alkoholu. Pro odečtení přesného výsledku byly vytvořeny srovnávací tabulky, aby hodnoty nebyly zkreslovány teplotními

fluktuacemi. Stanovení obsahu ethanolu touto metodou je jednoduché a časově nenáročné, proto je v laboratorní praxi poměrně rozšířené [62,80–86].

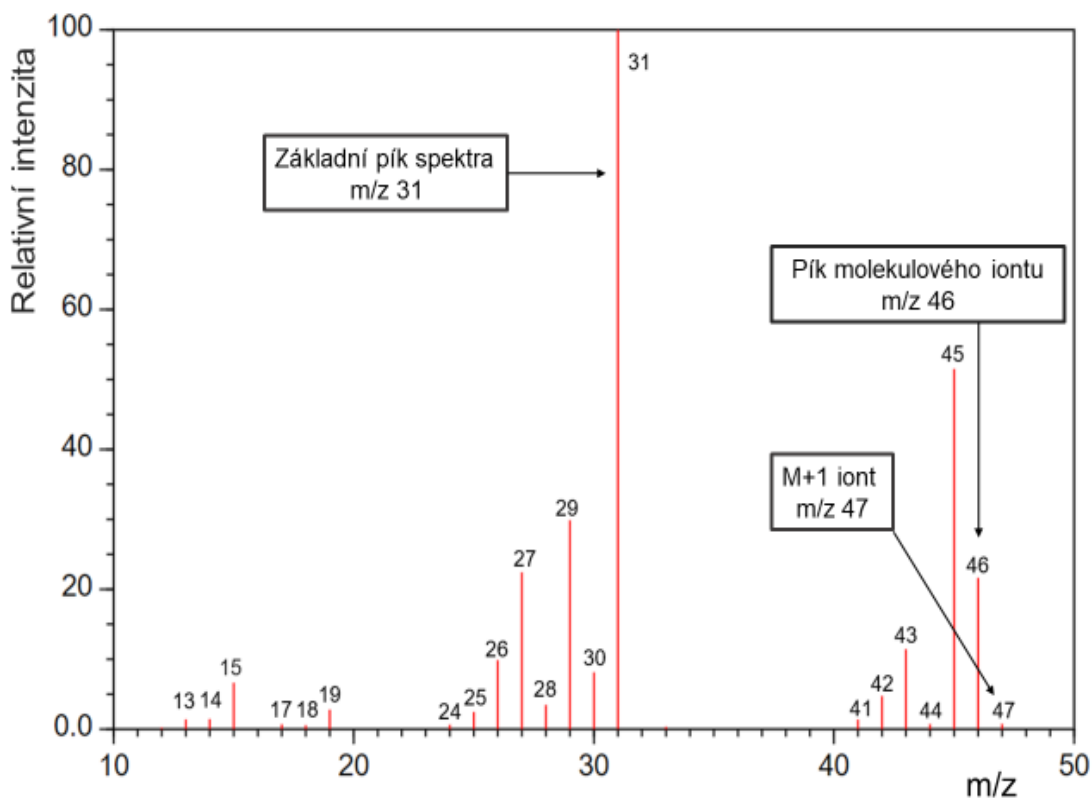
Závěrem lze říci, že metoda GC je jednou z nejvhodnějších metod pro stanovení obsahu ethanolu v alkoholických nápojích, jelikož je to metoda relativně rychlá a poskytuje data s vysokou precizností a přesností.

Další výhodou GC analýz je malé množství analytu potřebné pro analýzu, které navíc nevyžaduje předúpravu před analýzou, což je žádoucí v případě vzorků, které jsou k dispozici v malém objemu (forenzní analýza) [75].

## 2.5 Návrh na použití M+1 iontů pro GC-MS kvantifikaci

Hmotnostní spektrum jakékoliv sloučeniny získané elektronovou ionizací obsahuje molekulární ionty  $M^{+}$  – ionizované, ale nefragmentované molekuly vzorku (např.  $m/z$  46 pro ethanol). Kromě molekulárních iontů  $M^{+}$  spektrum obsahuje v mnohem menším množství i M+1 ionty (M+2 ionty atd.), které jsou poskytovány těžkými izotopy běžných prvků. Na základě přirozeného výskytu těžkých nuklidů předpokládáme, že ionty M+1 odpovídají téměř výhradně izotopu  $^{13}\text{C}$ , protože výskyt izotopů  $^2\text{H}$  (0,012 %) a  $^{17}\text{O}$  (0,04 %) je ve srovnání se zastoupením přírodního izotopu  $^{13}\text{C}$  (1,07 %) nízký [14,22,60,87,88].

Na Obr. 2.3 je uvedeno hmotnostní spektrum ethanolu poskytované elektronovou ionizací. Nejvíce zastoupený iont – základní pík, je nastaven jako 100% intenzity a ostatní píky jsou zaznamenány vzhledem k této hodnotě. Základní pík ethanolu má hodnotu  $m/z = 31$ . Molekulová hmotnost ethanolu je 46, takže pík při  $m/z = 46$  lze identifikovat jako pík odpovídající molekulovému iontu. Malý pík při  $m/z = 47$  odpovídá právě iontu M+1, tzn. signál o jednu atomovou jednotku vyšší, který poskytl hlavně izotop uhlíku  $^{13}\text{C}$  [14,22,60,87,88].



Obr. 2.3: Hmotnostní spektrum ethanolu získané elektronovou ionizací. Základní pík ethanolu má hodnotu  $m/z = 31$ . Molekulová hmotnost ethanolu je 46, takže pík při  $m/z = 46$  odpovídá molekulovému iontu. Malý pík při  $m/z = 47$  odpovídá iontu  $M+1$ , (Převzato z [89]).

Vzhledem k vysoké citlivosti MS a možnosti detekce širokého spektra látek (včetně vody, kterou pomocí FID nelze stanovit), byl navržen nový přístup kvantifikace použitím  $M+1$  iontů pro GC-MS kvantifikaci. Při GC-MS stanoveních se často pracuje se zředěnými roztoky, aby se předešlo saturaci MS detektoru. Ředěním vzorku se značně snižuje citlivost metody, což je motivací při hledání nových možností, jak obejít saturaci detektoru. Sledováním  $M+1$  iontů dojde ke snížení signálu majoritních složek, čímž se předejde přesycení MS detektoru a tím je umožněna kvantifikace majoritních složek roztoků [14,22,60,87,88].

Ethanol v alkoholických nápojích se běžně kvantifikuje standardizovanými metodami (viz kapitola 2.4), ale citlivá technika GC-MS pro tyto účely často využívána není. Je využívána především pro stanovení původu alkoholických produktů s využitím izotopových poměrů. Ve studiích z roku 2019 a 2021 byla navržena GC-MS metoda pro kvantifikaci těkavých látek v alkoholických produktech pomocí  $M+1$  iontů (pro ethanol  $m/z 47$ ) [14,22,60]. Hlavním cílem bylo prozkoumat možnosti použití ethanolu (přírodně zastoupeného, tedy bez přídavku do roztoku) jako vnitřního standardu pro GS-MS kvantifikaci těkavých látek v alkoholických výrobcích. Bylo prokázáno, že odezva

ethanolu je při kvantifikaci pomocí M+1 iontů lineární v rozsahu 1 % až 100 % ABV a navrhovaná metoda je jednodušší a přesnější oproti tradiční metodě vnitřního standardu. Navrhovanou metodu lze použít pro jakékoli těkavé látky, které lze separovat a detekovat pomocí standardního systému GC-MS. V návaznosti na tuto studii, cílem této práce bylo ověřit, zda mohou být M+1 použity pro GC-MS kvantifikaci různých polárních a nepolárních rozpouštědel. V případě alkoholických nápojů by bylo možné stanovit obsah těkavých látek a zastoupení ethanolu během jedné analýzy, jelikož se tato stanovení běžně provádí jako samostatné analýzy. Výsledkem by mohlo být snížení ceny zmíněných analýz a celkové zjednodušení laboratorní práce, jelikož by se ethanol mohl použít jako vnitřní standard pro stanovení těkavých složek v alkoholických nápojích [14,22,60,87,88].

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Seznam použitých chemikálií

##### Chemikálie používané pro přípravu kalibračních dvousložkových roztoků

Acetonitril ( $\geq 99,9$  %, Honeywell, Německo)

Diethylether (99,9 %, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Ethanol (96,6 %, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Heptan (99,0 %, Fluka analytical, Německo)

Methanol ( $\geq 99,9$  %, Honeywell, Německo)

Oktan ( $> 99,0$  %, Reachim, Rusko)

Tetrahydrofuran ( $\geq 99,8$  %, Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o., Česká republika)

Toluen ( $> 99,0$  %, Lachema, a.s., Česká republika)

##### Seznam sledovaných alkoholických nápojů

Gordons London Dry Gin (37,5 % obj.)

Višnovice baron Hildprandt (42,5 % obj.)

Jack Daniels Tennessee Whisky Old No.7 (40 % obj.)

Velhotes White Porto (19,5 % obj.)

Kraken Black spiced Rum (40 % obj.)

Destilát T31 (75,72 % obj.)

Slivovice Rudolf Jelínek č. 1 (45 % obj.)

Slivovice Rudolf Jelínek č. 2 (50 % obj.)

Slivovice Rudolf Jelínek č. 3 (71,98 % obj.)

Slivovice Rudolf Jelínek č. 4 (75,95 %)

Destilát Žitná z domácího zdroje (81 % obj.)

Pyrat XO Reserve, Premium Caribbean Spirit (40 % obj.)

A.H.RIISE Non Plus Ultra Very Rare (42 % obj.)

Spišská hruškovica Original Kosher (40 % obj.)

Chivas Regal 1 Year Old Blended Scotch Whisky (40 % obj.)

Zubrowka Bison Grass Oryginalna Wódka Smakowa (37,5 % obj.)

Soplica Orzech Laskowy (28 % obj.)

## 3.2 Instrumentace a podmínky měření

### GC-FID

GC-FID analýza probíhala na přístroji GC-2010 (Shimadzu Corporation s.r.o., Japonsko). Nosným plynem byl vodík (Vodík 5.0, Linde Gas a.s.) a pro separaci látek byla použita kolona Rxi 624 – MS (Restek, USA) s rozměry 20 m × 0,18 mm × 1,0 μm a teplotním limitem 320°C. Jedná se o středně polární kapilární kolonu z taveného křemene se silarylenovou stacionární fází, což složením odpovídá 6%-kyano-propyl-fenyl/94 %- methyl-polysiloxanu [90–92].

Dávkování probíhalo pomocí automatického dávkovače AOC-20i (Shimadzu Corporation s.r.o., Japonsko). Pro nástřik analytu byla použita stříkačka s objemem 10 μl (Hamilton, USA) a dávkovací objem vzorku byl 0,3 μl. Teplota injektoru byla nastavena na 210 °C a nastříknutý objem vzorku byl dělen mezi kolonou a odtokem plynu v poměru 1:50. Lineární rychlost nosného plynu byla optimalizována na 25 cm/s. Teplota FID byla 250 °C. Podmínky analýzy probíhaly za výše zmíněných podmínek v případě, že nebylo nutné separační podmínky přizpůsobit dané kombinaci analytů.

### GC-MS

GC-MS analýza byla provedena na přístroji GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation s.r.o., Japonsko) s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem. Nosným plynem bylo helium (Helium 5.0, Linde Gas a.s.) a separace látek byla uskutečněna na koloně Rxi-1301 Sil MS (Restek, USA) s rozměry 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm a maximální použitelnou teplotou 320 °C. Jedná se o středně polární kapilární kolonu z taveného křemene se stejnou stacionární fází jako v případě GC-MS [90–92].

Dávkování vzorků probíhalo pomocí automatického dávkovače AOC-20i (Shimadzu Corporation s.r.o., Japonsko). Dávkovací objem kalibračních roztoků byl 0,05 μl a 0,1 μl za použití injekční stříkačky s objemem 0,5 μl (Trajan, Austrálie). V případě kalibračních roztoků ethanol – voda a vzorků alkoholických produktů byla použita injekční stříkačka s objemem 10 μl (Hamilton, USA), kdy bylo dávkováno 0,2 μl vzorku. Teplota injektoru byla nastavena na 170 °C a nastříknutý objem vzorku byl dělen mezi kolonou a odtokem plynu v poměru 1:100. Lineární rychlost nosného plynu byla optimalizována na 25 cm/s. Teplota iontového zdroje a interface byla 200 °C. Elektronová ionizace analytu probíhala po interakci s urychlenými elektrony o kinetické energii 70 eV. Podmínky analýzy

probíhaly za výše zmíněných podmínek v případě, že nebylo nutné separační podmínky přizpůsobit dané kombinaci analytů.

Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo přizpůsobeno jednotlivým analýzám a měření probíhalo v různých módech – scan a SIM. Ve scan módu bylo zaznamenáno hmotnostní spektrum v nastaveném rozsahu hodnot  $m/z$  29–400 a získaná data byla použita pro identifikaci látek a potvrzení jejich retenčního času. Identifikace látek proběhla porovnáním s hmotnostními spektry v knihovně NIST 17. GC-MS kvantifikace probíhala v SIM módu, protože sledovány byly pouze vybrané M+1 ionty (viz kapitola 2.5, Tabulka 3.1).

Jako zástupce ze skupiny nepolárních látek byly vybrány následující: oktan, toluen, heptan a diethylether, jelikož se jedná o látky běžně používané jako nepolární rozpouštědla. Ze skupiny polárních rozpouštědel byly vybrány látky: acetonitril, ethanol, methanol, tetrahydrofuran a voda, jelikož jsou to látky běžně používané v laboratorní praxi, potravinářství, chemickém a farmaceutickém průmyslu. Přehled sledovaných M+1 iontů pro GC-MS kvantifikaci v režimu SIM je uvedený v tabulce 3.1.

*Tabulka 3.1: Přehled M+1 iontů sledovaných při GC-MS kvantifikaci analytů v SIM módu*

| Analyt          | $M_r$ | M+1 iont<br>$m/z$ |
|-----------------|-------|-------------------|
| acetonitril     | 41    | 42                |
| ethanol         | 46    | 47                |
| methanol        | 32    | 33                |
| tetrahydrofuran | 72    | 73                |
| voda            | 18    | 19                |
| diethylether    | 74    | 75                |
| heptan          | 100   | 101               |
| oktan           | 114   | 115               |
| toluen          | 92    | 93                |

Sběr a vyhodnocení dat pro GC-FID i GC-MS analýzu probíhalo v LabSolution (GC/GCMS solution, Shimadzu Corporation s.r.o., Japonsko), pro další zpracování dat byl použit Microsoft Excel (Microsoft), UniChrom (New Analytical Systems s.r.o., Bělorusko) a OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Pro optimalizaci podmínek stanovení byly připraveny zkušební roztoky o poměrech jednotlivých složek 50:50 (V/V). Následně byly připraveny kalibrační roztoky s poměry hmotnostních procent jednotlivých složek: 1:4, 2:3, 3:2, 4:1 a 5:0. Kvantifikace složek směsi a následně ethanolu v alkoholických produktech probíhala metodou externího

standardu a modifikovanou metodou za využití závislosti poměrů ploch píků ( $A_i/A_j$ ) k poměru hmotnostních procent složek směsi ( $w_i/w_j$ ).

Podmínky měření byly upraveny pro individuální kombinaci analytů tak, aby bylo dosaženo jejich úspěšné separace a detekce a čas analýzy byl snížen na minimum. Celková doba analýzy se pohybovala v rozmezí 4-10 minut. Přehled všech podmínek, za kterých probíhaly GC-FID a GC-MS analýzy jsou uvedeny v tabulce 3.2.

Tabulka 3.2: Přehled podmínek GC-FID a GC-MS analýzy

|   | Okтан – toluen                           | Heptan – toluen                            | THF – DEE                                | EtOH – DEE                               | ACN – voda                               | ACN – MetOH                              | THF – MetOH                              | EtOH – voda                              |
|---|--|--|--|--|--|--|--|--|
| <b>Teplotní program kolony</b>                  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>GC-FID</b>                                   | 40 °C po dobu 3 min, 10 °C/min do 230 °C | 50 °C po dobu 3 min, 10 °C/min do 185 °C   | 50 °C po dobu 2 min, 10 °C/min do 150 °C | 50 °C po dobu 3 min, 10 °C/min do 100 °C | 50 °C po dobu 2 min, 10 °C/min do 120 °C | 50 °C po dobu 1 min, 10 °C/min do 160 °C | 50 °C po dobu 2 min, 10 °C/min do 195 °C | 50 °C po dobu 2 min, 10 °C/min do 120 °C |
| <b>GC-MS</b>                                    | 30 °C po dobu 5 min, 10 °C/min do 210 °C | 50 °C po dobu 4,5 min, 10 °C/min do 180 °C | 50 °C po dobu 3 min, 10 °C/min do 150 °C | 50 °C po dobu 4 min, 10 °C/min do 100 °C | 50 °C po dobu 3 min, 10 °C/min do 155 °C | 50 °C po dobu 1 min, 10 °C/min do 155 °C | 50 °C po dobu 3 min, 10 °C/min do 185 °C | 50 °C po dobu 3 min, 10 °C/min do 120 °C |
| <b>Lineární rychlost nosného plynu [cm/sec]</b> |  |  |  |  |  |  |  |  |
|   | 24                                       | 25   | 25                                       | 25                                       | 25                                       | 25                                       | 25                                       | 25                                       |
|   | 25                                       | 25   | 25                                       | 25                                       | 25                                       | 25                                       | 25                                       | 25                                       |
| <b>Dělicí poměr</b>                             |  |  |  |  |  |  |  |  |
|   | 50                                       | 65   | 50                                       | 65                                       | 50                                       | 50                                       | 50                                       | 50                                       |
|   | 100                                      | 100  | 100                                      | 100                                      | 100                                      | 100                                      | 100                                      | 100                                      |
| <b>Dávkovací objem [μl]</b>                     |  |  |  |  |  |  |  |  |
|   | 0,3                                      | 0,3  | 0,3                                      | 0,1                                      | 0,3                                      | 0,3                                      | 0,3                                      | 0,3                                      |
|   | 0,05                                     | 0,05                                       | 0,1                                      | 0,1                                      | 0,1                                      | 0,1                                      | 0,1                                      | 0,2                                      |
| <b>Retenční čas [min]</b>                       |  |  |  |  |  |  |  |  |
|   | O: 8,84<br>T: 8,18                       | H: 3,52<br>T: 4,15                         | T: 3,68<br>D: 2,54                       | E: 2,93<br>D: 2,32                       | A: 2,97<br>V: -----                      | A: 3,31<br>M: 2,23                       | T: 3,78<br>M: 2,23                       | E: 3,34<br>V: -----                      |
|   | O: 9,98<br>T: 9,57                       | H: 6,85<br>T: 8,21                         | T: 5,92<br>D: 4,68                       | E: 4,85<br>D: 4,10                       | A: 4,96<br>V: 4,18                       | A: 4,95<br>M: 4,32                       | T: 5,83<br>M: 4,31                       | E: 4,59<br>V: 4,24                       |

### 3.3 Výpočty

#### 3.3.1 Příprava roztoků

GC-FID analýzou byla nejdříve ověřena čistota zásobních roztoků. Metodou vnitřní normalizace byl vyjádřen relativní podíl čisté složky (analytu) z celkového zastoupení látek ve směsi a tato hodnota byla porovnána s čistotou deklarovanou výrobcem. Ze znalosti ploch chromatografických píků analytu  $A_i$  a jednotlivých složek směsi  $\Sigma A_j$  byl dopočítán obsah analytu  $w_i$  podle následujícího výpočtu (3.1) [21,93,94]:

$$w_i = \frac{A_i}{\Sigma A_j} \cdot 100 \% \quad [\%] \quad (3.1)$$

Pro GC-MS/FID analýzu byly připraveny jednotné sady kalibračních roztoků, jednalo se o dvousložkovou směs. Roztoky byly připraveny kvantitativně odvážením jednotlivých složek na analytických vahách (APX-100 Analytical Balances, Denver Instrument s.r.o., USA, hmotnostní kapacita 100 g, vážení s přesností na 0,1 mg) do 15ml skleněné zkumavky. Připravené roztoky byly pipetovány za použití automatických pipet (Acura 825, objem 1 ml, Socorex, Švýcarsko) do 1,5ml skleněných vialek, které byly uzavřeny zátkou s PTFE septem a následně umístěny do autosampleru. Vzorky lihovin byly pro GC-FID/MS analýzu pipetovány přímo do 1,5ml skleněných vialek bez jakékoliv předúpravy. Zastoupení jednotlivých složek kalibračních roztoků bylo vyjádřeno jako hmotnostní koncentrace ( $w_{s,1}$ ), která byla dopočítána podle následujícího vzorce (3.2), kde  $w_{i,1}$  je obsah čisté složky (analytu),  $m_{s,1}$  udává reálnou hmotnost čistého analytu,  $\Sigma(m_{s,1} + m_{s,2} + \dots + m_{s,n})$  znázorňuje součet hmotností jednotlivých složek ve směsi.

$$w_{s,1} = \frac{w_{i,1} \cdot m_{s,1}}{\Sigma(m_{s,1} + m_{s,2} + \dots + m_{s,n})} \cdot 100 \% \quad [\%] \quad (3.2)$$

Vzorky byly skladovány při laboratorní teplotě 25 °C.

#### 3.3.2 Hodnocení naměřených GC dat

Všechny analyzované vzorky byly měřeny třikrát za konstantních podmínek. Z chromatogramů byly odečteny plochy píků, které odpovídají odezvě detektoru a byly předmětem hodnocení kvantitativní analýzy. Pro kontrolu reprodukovatelnosti byly všechny série měření podrobeny Grubbsovu testu pro vyloučení odlehlých hodnot ze souboru dat.

Všechny hodnoty souboru byly seřazeny vzestupně, vypočtený byl aritmetický průměr  $\bar{x}$  a směrodatná odchylka  $s$  a následně testovací kritérium  $G$  pro minimální (3.3) a maximální (3.4) hodnoty. Zjištěná testovací kritéria  $G$  byla porovnána s tabulkovou kritickou hodnotou pro příslušný počet měření ( $n = 3$ ) a úrovní významnosti ( $\alpha = 0,05$ ). Hodnota maximální odchylnosti testovacích kritérií  $G_{max}$  a  $G_{min}$  (1,155) byla převzata z mezinárodního standardu ISO 5725-2, který pojednává o stanovení opakovatelnosti, reprodukovatelnosti a přesnosti výsledků měření. V případě vyloučení odlehlé minimální či maximální hodnoty ze sady měření byly další body doměřeny [21,95,96]. Výpočet testovacích kritérií byl proveden pomocí následujících vzorců (3.3) a (3.4), kde  $\bar{Y}$  označuje průměrnou hodnotu ze souboru dat,  $s$  je směrodatná odchylka,  $Y_{min}$  a  $Y_{max}$  označují minimální a maximální hodnoty ze souboru dat.

$$G = \frac{\bar{Y} - Y_{min}}{s} \quad (3.3)$$

$$G = \frac{Y_{max} - \bar{Y}}{s} \quad (3.4)$$

Směrodatná odchylka byla vypočtena podle následujícího vzorce (3.5) [21,94]:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad [\%] \quad (3.5)$$

kde se provádí součet všech měření daného vzorku  $x_i$ ,  $\bar{x}$  označuje průměr těchto měření a  $n$  udává počet měření daného vzorku, v našem případě  $n = 3$  [21].

### 3.3.3 Metody kvantifikace ethanolu

Sestrojeny byly kalibrační závislosti, kdy bylo využito znalosti závislosti ploch pík ( $A_{i,j}$ ) na hmotnostních zlomcích analytů ( $w_{i,j}$ ). Dále byly sestaveny modifikované závislosti podílu ploch pík analytů ( $A_i/A_j$ ) na podílu hmotnostních zlomků analytů ( $w_i/w_j$ ). Hypotézou bylo, že získáme závislosti s vyšší linearitou, nebo dojde k linearizaci polynomického průběhu závislostí, které byly získány GC-MS analýzou. Proložení modifikované závislosti páru ethanol-voda lineární regrese byla získána rovnice přímky ve tvaru  $y = ax$ , kde  $x$  odpovídalo poměru hmotnostních zlomků ethanolu a vody. Tato rovnice byla použita ke stanovení množství ethanolu v testovaných vzorcích alkoholických výrobků. Vypočtení hmotnostních procent ethanolu z poměru hmotnostních zlomků ethanolu a vody bylo provedeno pomocí následující rovnice (3.6),

$$w_{EtOH} = \frac{x}{1+x} \cdot 100 \% \quad (3.6)$$

Tato rovnice (3.6) nabývá platnosti za předpokladu, že  $w_i + w_j = 1$ .

### 3.3.4 Objemová a hmotnostní procenta

Hodnoty hmotnostních procent ethanolu v alkoholických nápojích, které byly získány kvantifikační metodou externího standardu za využití absolutních hodnot ploch píků v závislosti na hmotnostních procentech či pomocí podílu ploch píků v závislosti na podílu hmotnostních procent, byly přepočítávány na procenta objemová. Problémem dvousložkové směsi ethanol-voda je objemová kontrakce, kdy smísením těchto složek dojde ke snížení objemu výsledného roztoku a pro dosažení požadovaného objemu musí být přidáno další množství vody. Jako příklad provedeme jednoduchý výpočet. Pokud máme 100 ml vodného roztoku ethanolu, který obsahuje 40 ml absolutního ethanolu, je objemový zlomek ethanolu rovný 40 %.

$$\varphi_A = \frac{V_A}{V_R} = \frac{40}{100} = 40 \% \text{ obj.}$$

Výpočet hmotnostních procent ethanolu lze provést následujícím způsobem, kde  $\rho_{100\% EtOH}$  je hustota absolutního ethanolu při 20 °C a  $V_{EtOH}$  je objem ethanolu:

$$m_{100\% EtOH} = \rho_{100\% EtOH} \cdot V_{EtOH} = 0,7893 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \cdot 40 \text{ cm}^3 = 31,57 \text{ g}$$

Hmotnost vody dopočítáme ze znalosti hustoty při 20 °C a objemu:

$$m_{voda} = 0,9997 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \cdot 60 \text{ cm}^3 = 59,98 \text{ g}$$

Hmotnostní zlomek ethanolu se dopočítá následujícím způsobem:

$$w_{EtOH} = \frac{m_{100\% EtOH}}{m_{voda}} = \frac{31,57 \text{ g}}{91,55 \text{ g}} = 34,48 \%$$

Podle alkoholometrických tabulek, hmotnostní procenta 34,48 % odpovídají 41,32 % objemovým, jelikož došlo k objemové kontrakci a celkové množství objemu se snížilo. Z tohoto důvodu není předchozí výpočet hmotnostních procent správný, protože v sobě nezahrnuje objemovou kontrakci. V případě, kdy bychom chtěli dosáhnout 40 % objemových, je třeba přidat více než 3 ml vody, které způsobí snížení hmotnostní koncentrace na 33,42 %. Přesný převod hmotnostních procent na procenta objemová byl zajištěn pomocí softwaru AlcoDens 3.5 (Katmar Software, Jihoafrická republika), který

umožňuje přepočítání objemových a hmotnostních procent, hustoty ethanolu nebo molárních procent. Údaje pokrývají hodnoty pro přepočítání koncentrací v rozsahu od 0 do 100 %. Všechny hodnoty hustot a obsahu ethanolu v rozmezí od -20 °C do 40 °C jsou v souladu s Mezinárodními alkoholometrickými tabulkami (OIML) [69,97].

### 3.3.5 Statistické hodnocení metod

Získané soubory dat byly pro ohodnocení GC-MS a GC-FID metod podrobeny dalším statistickými parametry – preciznosti (RSD), přesnosti (bias) a nejistotě měření. Preciznost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka, kterou lze získat následujícím výpočtem (3.7), kde  $s$  označuje směrodatnou odchylku a  $\bar{x}$  průměrnou hodnotu.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad [\%] \quad (3.7)$$

Přesnost udává míru shody mezi deklarovanou ( $c_{real}$ ) a změřenou hodnotou ( $\bar{c}$ ), jelikož každé měření je zatíženo chybou. Stanovením přesnosti vymezujeme hranice, mezi kterými může být výsledek považován za správný, přesný a pravdivý a je prokázána metrologická kvalita měření. Výpočet probíhal podle následujícího vzorce (3.8) [99,100]:

$$bias = \frac{|\bar{c} - c_{real}|}{c_{real}} \cdot 100 \% \quad [\%] \quad (3.8)$$

Pro vyhodnocení nejistoty ( $\delta$ ) byl použit Studentův t-test. Hodnota  $t_{0,05}$  s úrovní významnosti ( $\alpha = 0,05$ ) byla při třech měřeních pro každý vzorek ( $n = 3$ ) rovna 2,353 a její relevantnost byla ověřena porovnáním s dalšími statistickými tabulkami. Použit byl následující vzorec (3.9), kde  $s$  označuje směrodatnou odchylku a  $n$  počet měření [101– 104].

$$\delta = 2 \cdot t_{0,05} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (3.9)$$

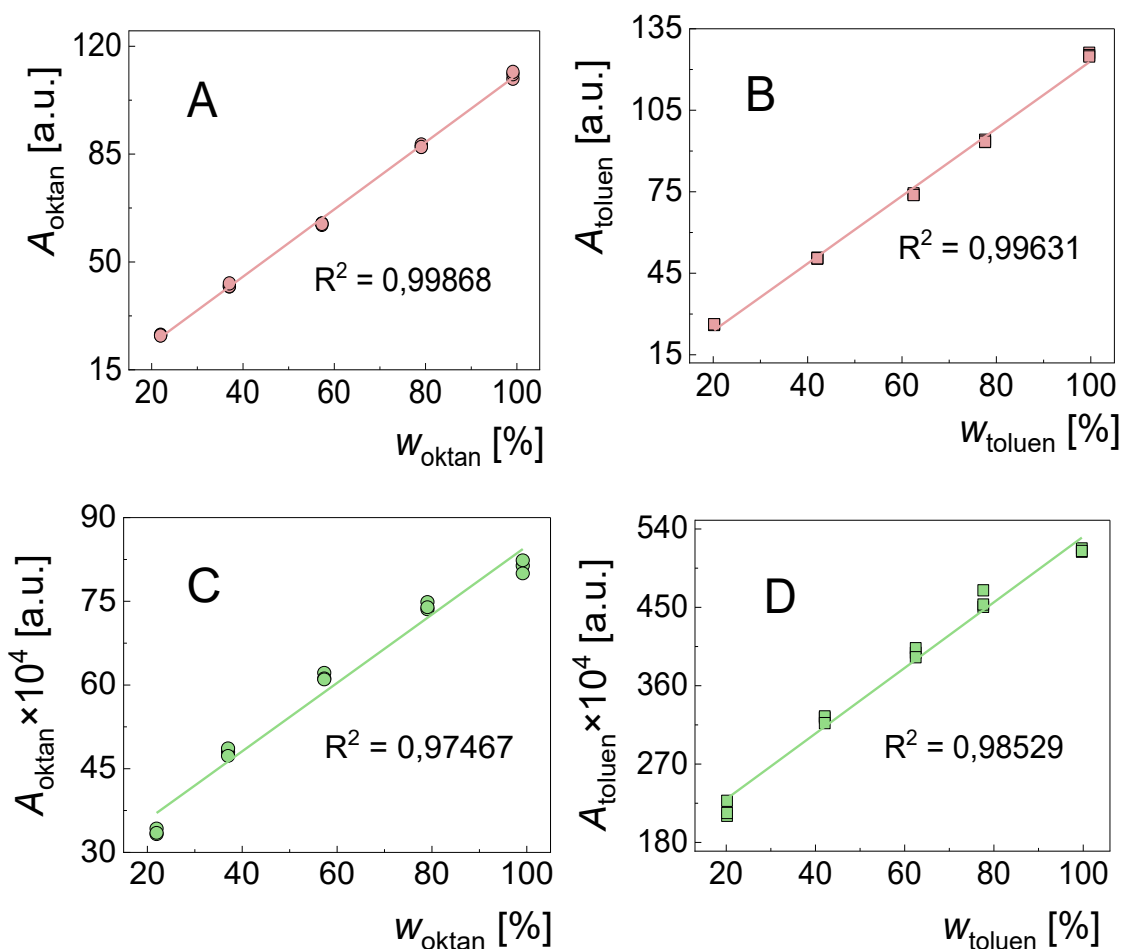
Výsledky stanovení ethanolu v alkoholických nápojích byly vyjádřeny ve formátu  $\bar{x} \pm \frac{\delta}{2}$ .

#### 4. Výsledky a diskuse

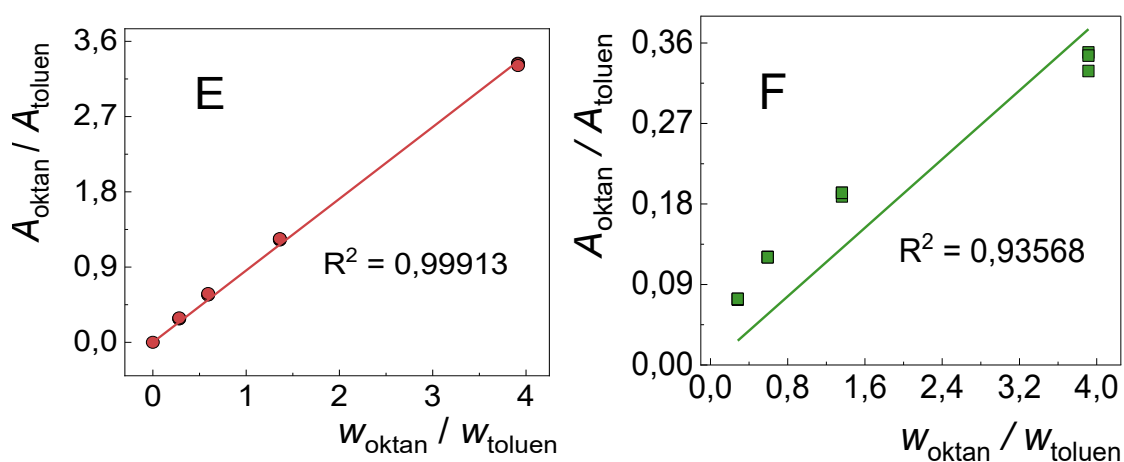
Pro kvantifikaci jednotlivých složek směsí byly připraveny sady kalibračních roztoků o koncentraci s poměry koncentrací složek 1:4, 2:3, 3:2, 4:1 a 5:0. Separace a kvantifikace analytů byla provedena analytickými metodami GC-FID a GC-MS. Po vyhodnocení získaných dat byly na základě Grubbsova testu vyloučeny odlehlé hodnoty. Kalibrační závislosti byly sestrojeny metodou externího standardu (kalibrační přímky) ze znalosti závislosti ploch píků na hmotnostních zlomcích analytů ( $A_i$  [mV·min] /  $w_i$  [%]). Pro zjištění obsahu ethanolu, který byl kvantifikován metodou externího standardu, byla použita rovnice kalibrační přímky  $y = ax + b$ , kde  $a$  je směrnice kalibrační přímky,  $b$  odpovídá úseku, který přímka vytíná na ose  $y$ ,  $y$  odpovídá ploše píku ( $A_i$  [mV·min]) a  $x$  odpovídá hodnotám hmotnostních procent ( $w_i$  [%]). Dále byly sestrojeny závislosti podílu ploch píků analytů ( $A_i/A_j$ ) na podílu hmotnostních zlomků analytů ( $w_i/w_j$ ). Hypotézou bylo, že pomocí relativních odezvových faktorů získáme závislost s vyšší linearitou, jelikož kalibrační závislosti některých látek při GC-MS analýze vykazovaly nelineární charakter, který byl pravděpodobně způsobený sníženou ionizační účinností iontového zdroje.

Na následujících obrázcích (Obr. 4.1-4.16) na straně 36-43 jsou představené kalibrační závislosti a závislosti podílů ploch píků na podílu hmotnostních zlomků všech stanovovaných rozpouštědel.

#### 4.1 Pár oktán – toluen

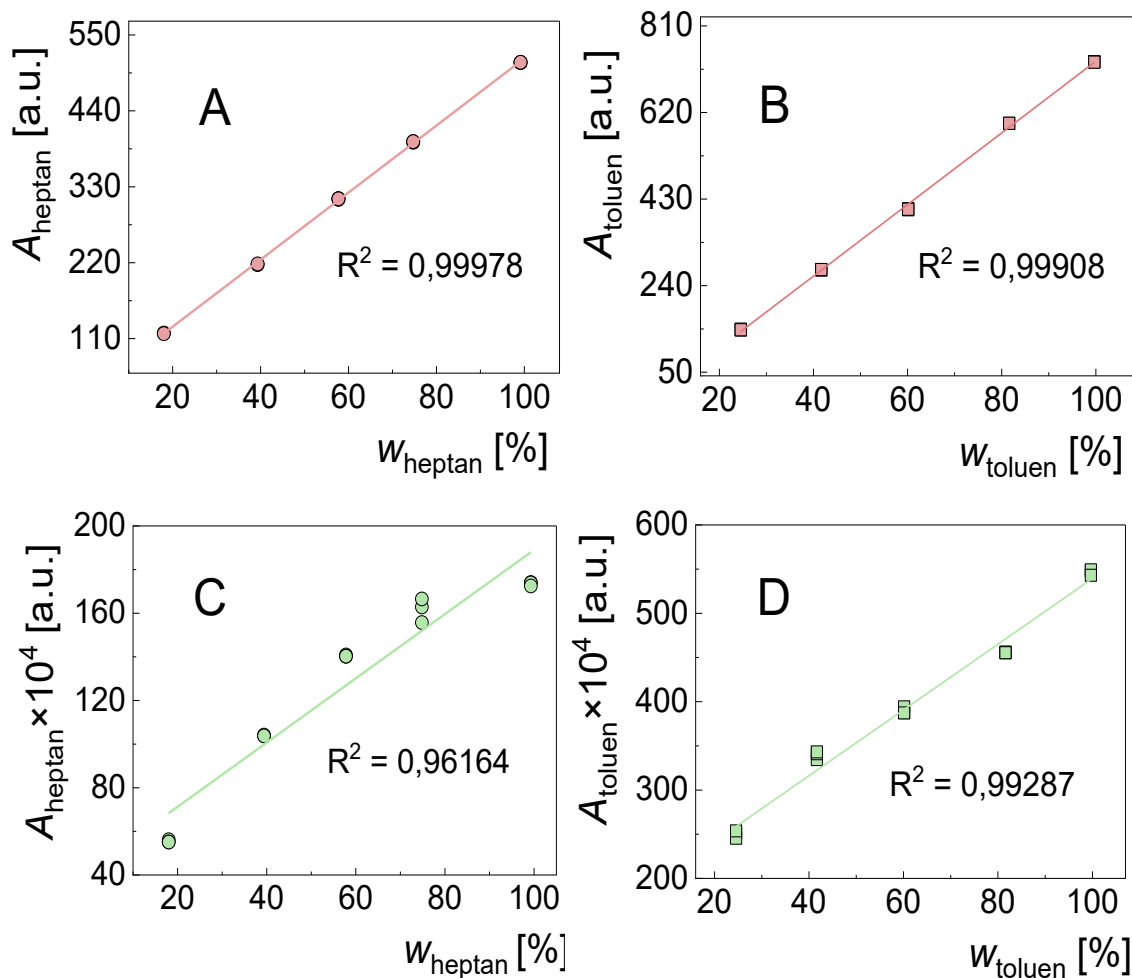


Obr. 4.1: Kalibrační závislosti oktánu (A a C) a toluenu (B a D) získané metodou externího standardu na GC-FID (růžová) a GC-MS (zelená).

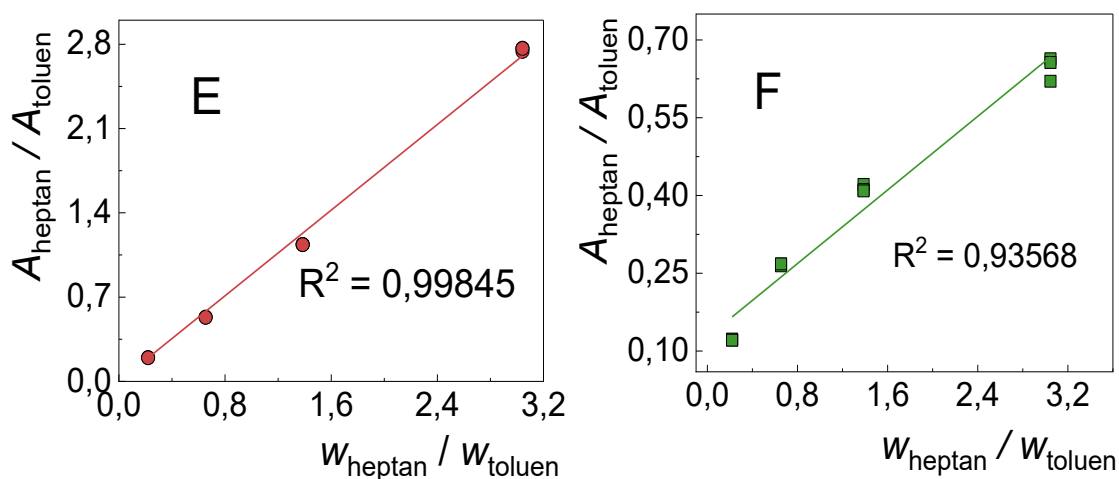


Obr. 4.2: Závislosti poměru ploch oktánu a toluenu pro GC-FID (E) a GC-MS (F) na poměru hmotnostních zlomků oktánu a toluenu.

## 4.2 Pár heptan – toluen

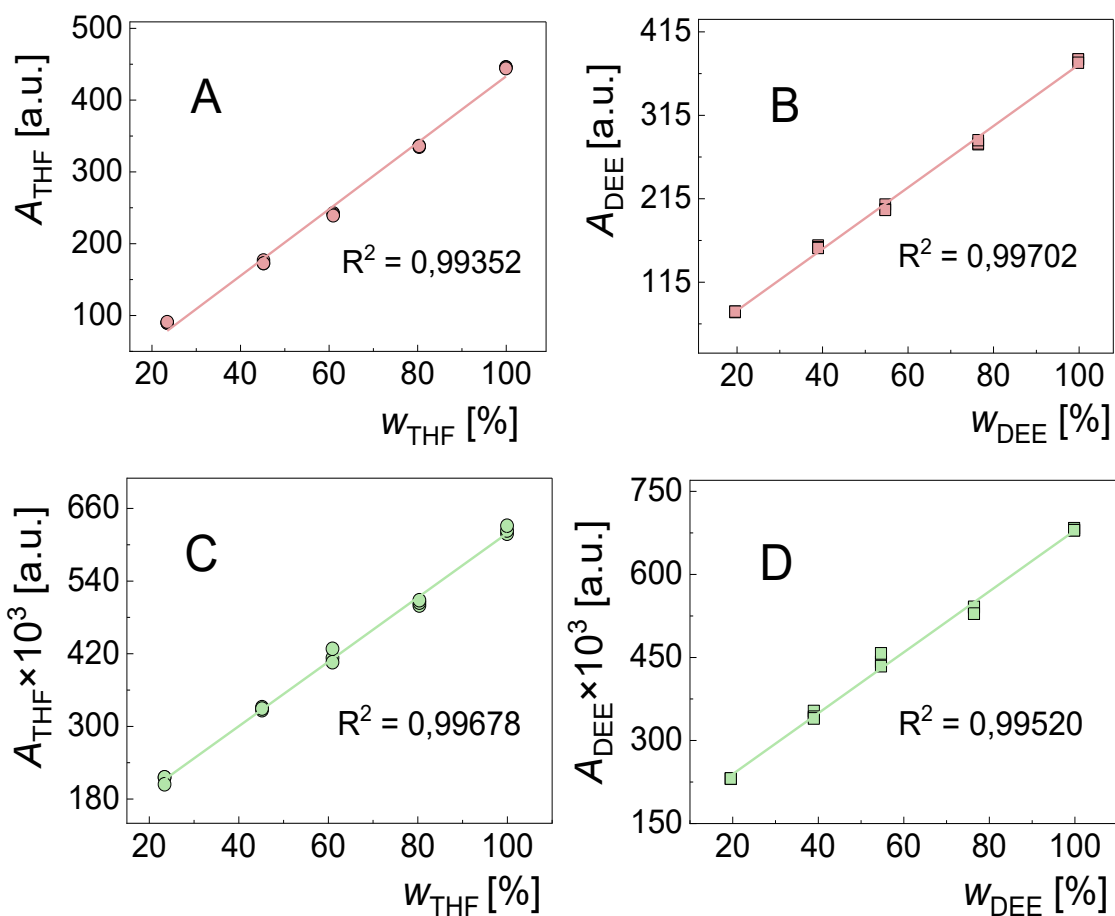


Obr. 4.3: Kalibrační závislosti heptanu (A a C) a toluenu (B a D) získané metodou externího standardu na GC-FID (růžová) a GC-MS (zelená).

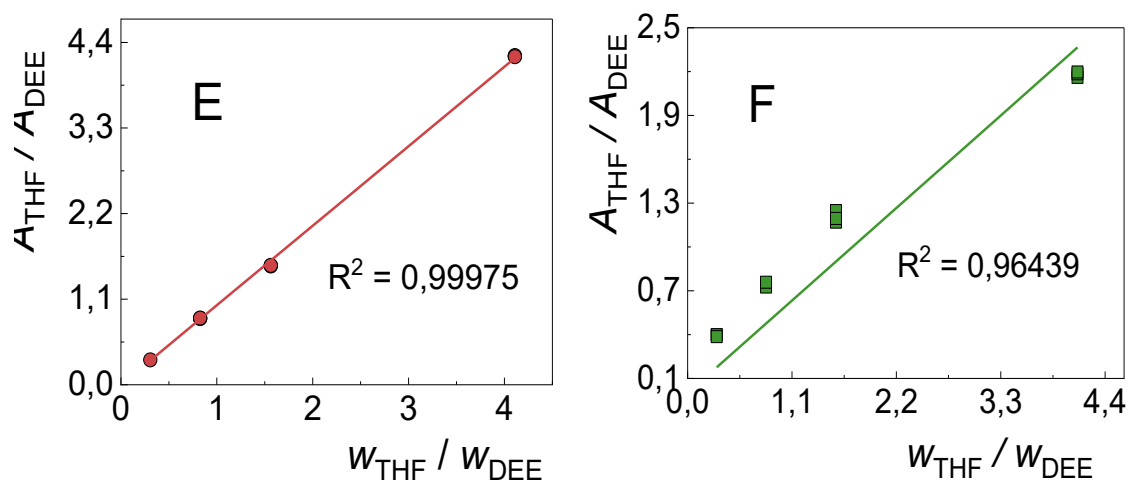


Obr. 4.4: Závislosti poměru ploch heptanu a toluenu pro GC-FID (E) a GC-MS (F) na poměru hmotnostních zlomků heptanu a toluenu.

### 4.3 Pár tetrahydrofuran – diethylether

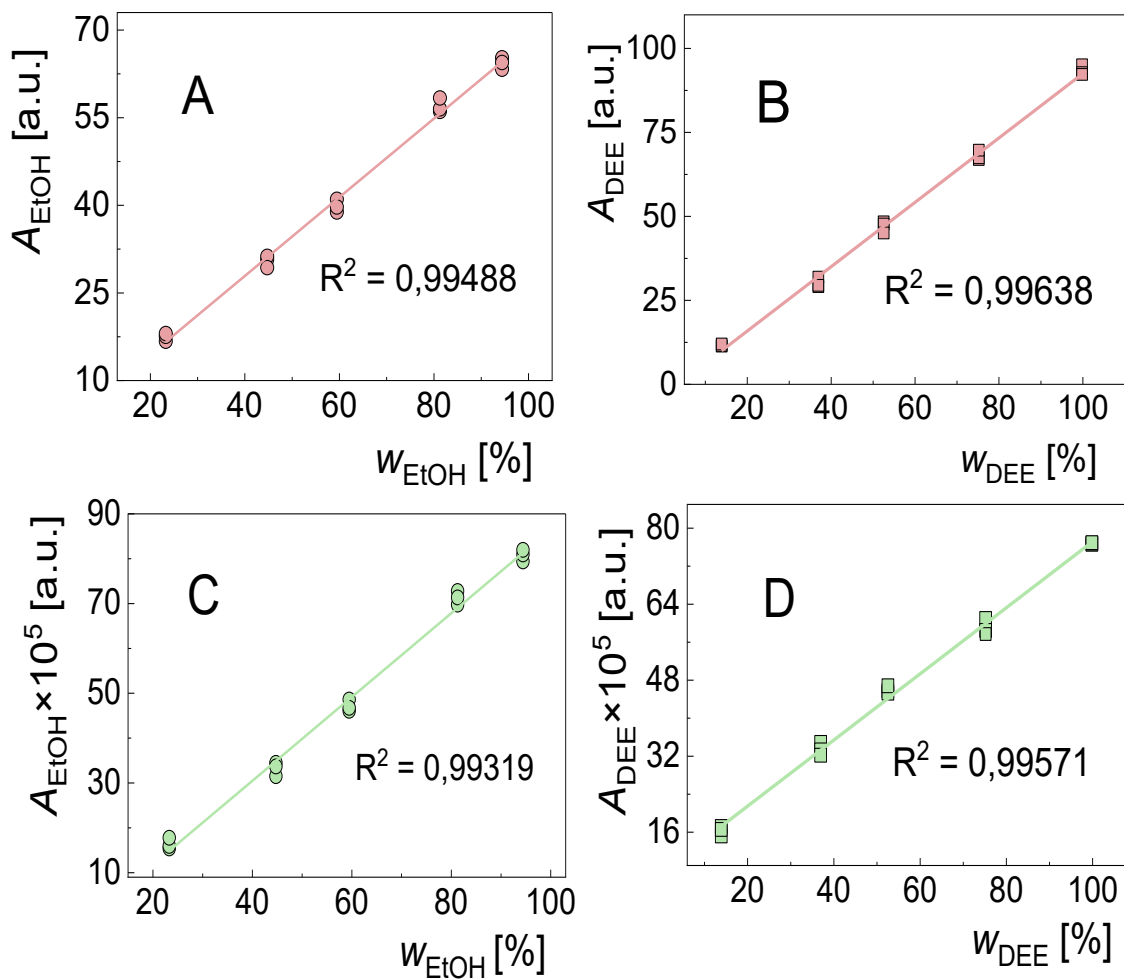


Obr. 4.5: Kalibrační závislosti tetrahydrofuranu (A a C) a diethyletheru (B a D) získané metodou externího standardu na GC-FID (růžová) a GC-MS (zelená).

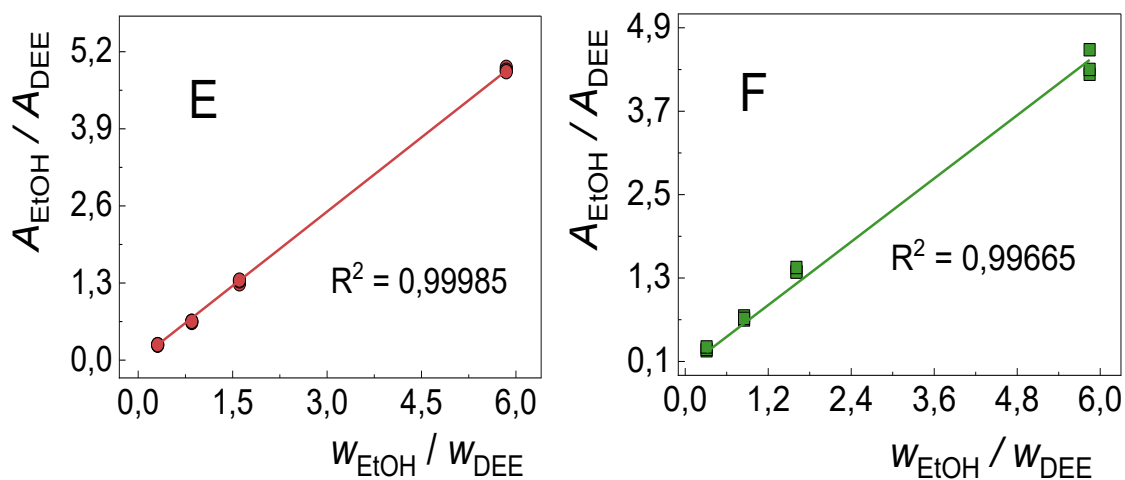


Obr. 4.6: Závislosti poměru ploch tetrahydrofuranu a diethyletheru pro GC-FID (E) a GC-MS (F) na poměru hmotnostních zlomků tetrahydrofuranu a diethyletheru.

#### 4.4 Pár ethanol – diethylether

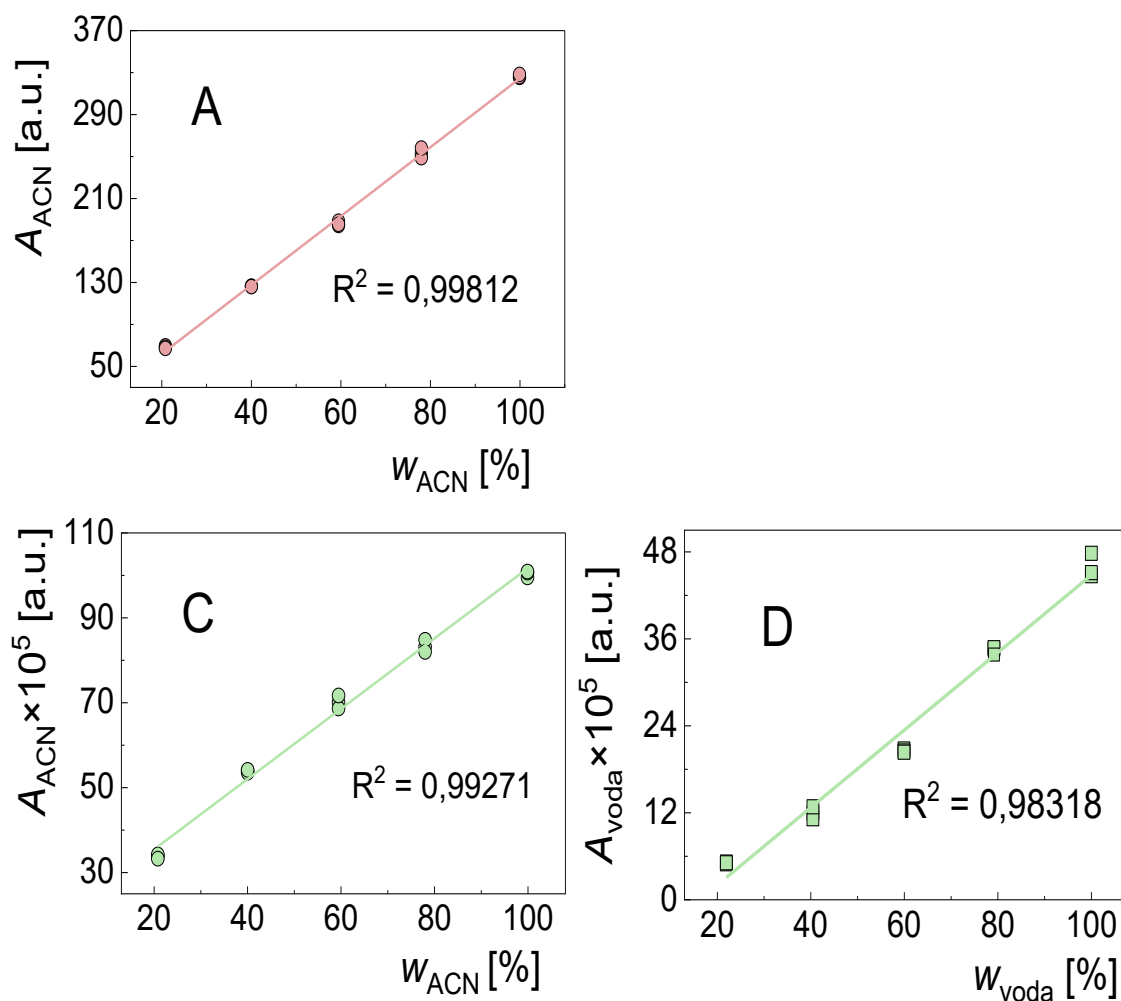


Obr. 4.7: Kalibrační závislosti ethanolu (A a C) a diethyletheru (B a D) získané metodou externího standardu na GC-FID (růžová) a GC-MS (zelená).

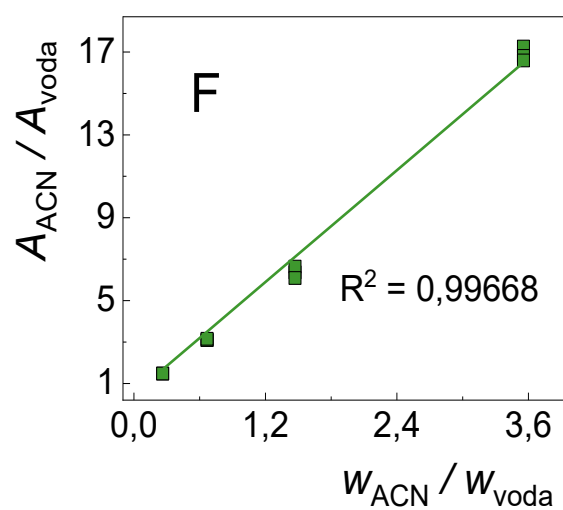


Obr. 4.8: Závislosti poměru ploch ethanolu a diethyletheru pro GC-FID (E) a GC-MS (F) na poměru hmotnostních zlomků ethanolu a diethyletheru.

#### 4.5 Pár acetonitril – voda

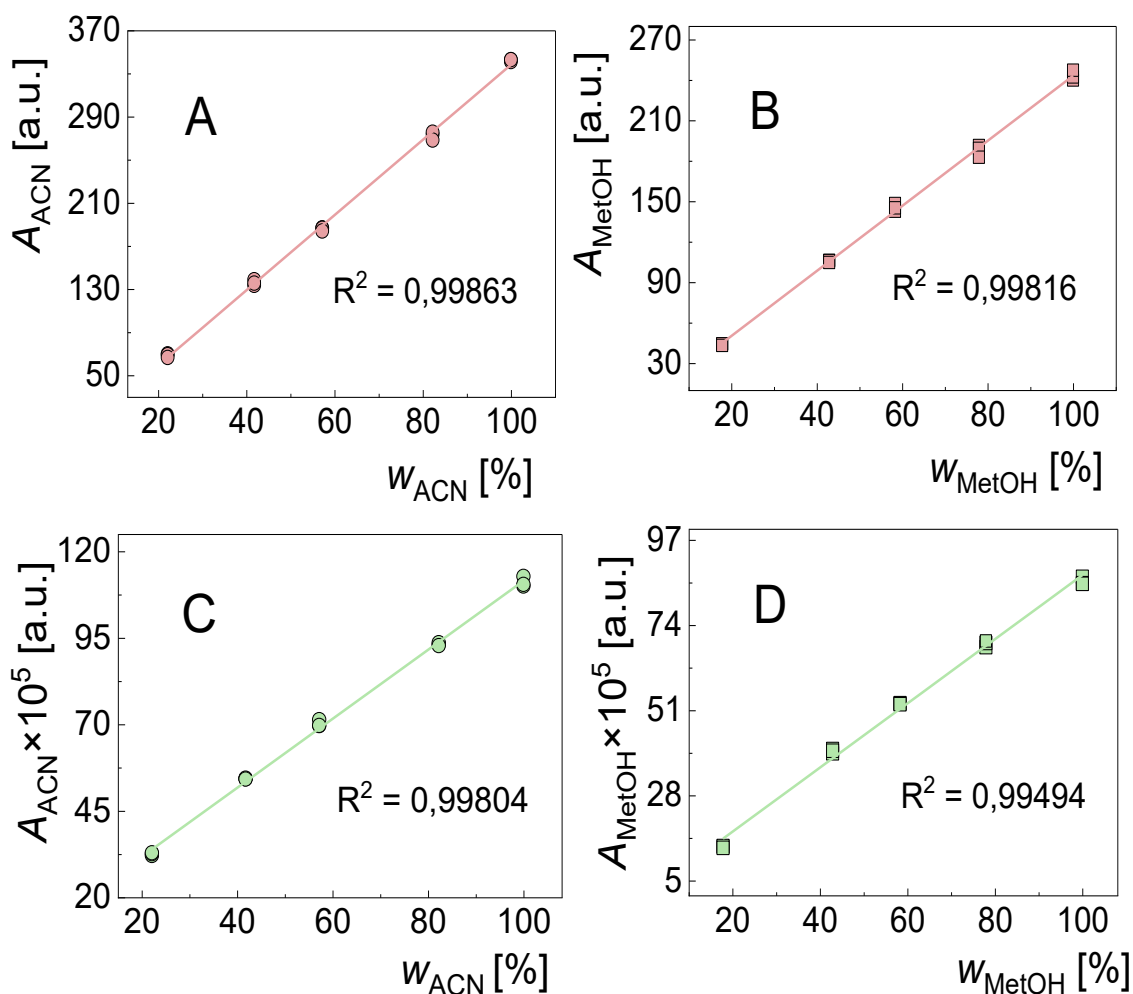


Obr. 4.9: Kalibrační závislosti acetonitrilu (A a C) a vody (D) získané metodou externího standardu na GC-FID (růžová) a GC-MS (zelená).

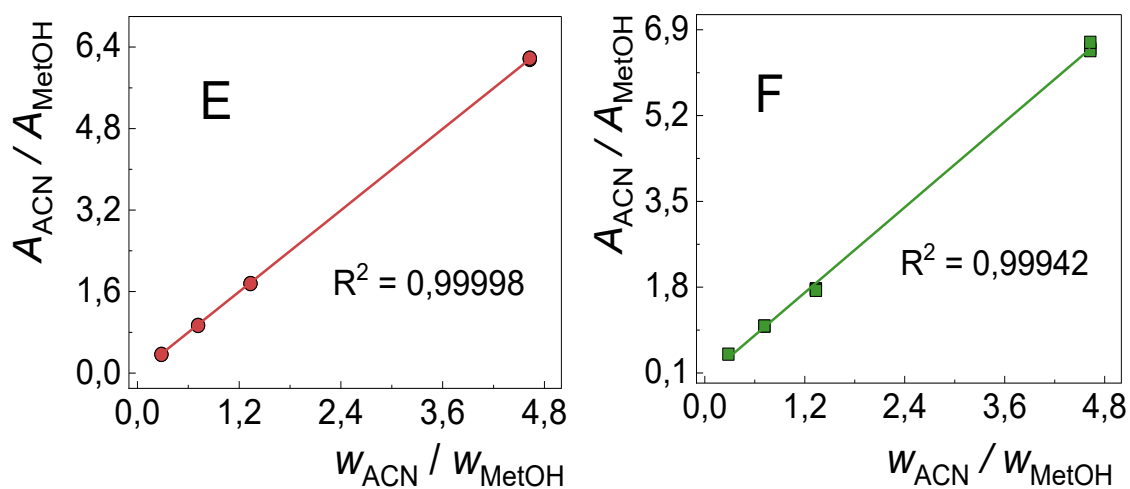


Obr. 4.10: Závislost poměru ploch acetonitrilu a vody pro GC-MS (F) na poměru hmotnostních zlomků acetonitrilu a vody.

#### 4.6 Pár acetonitril – methanol

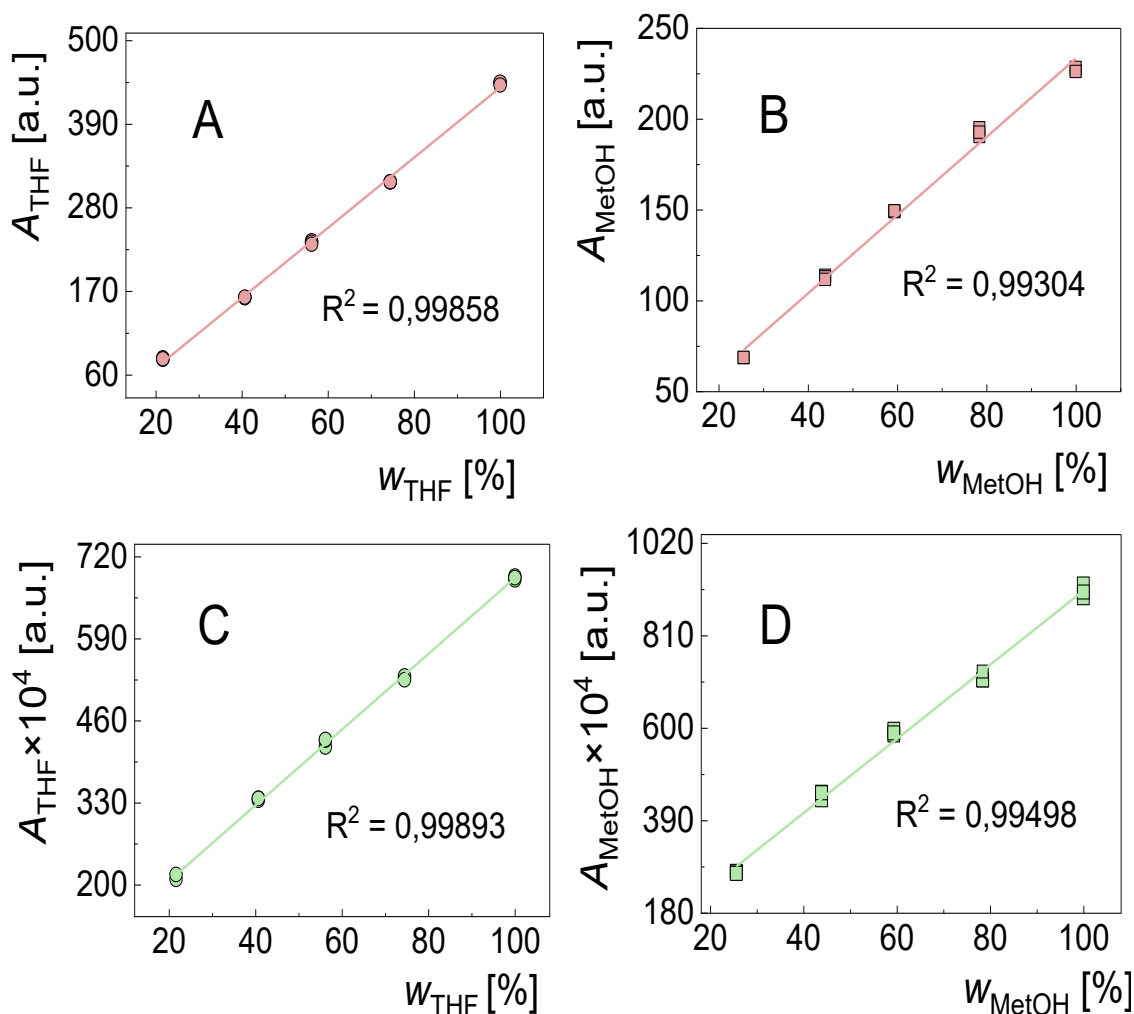


Obr. 4.11: Kalibrační závislosti acetonitrilu (A a C) a methanolu (B a D) získané metodou externího standardu na GC-FID (růžová) a GC-MS (zelená).

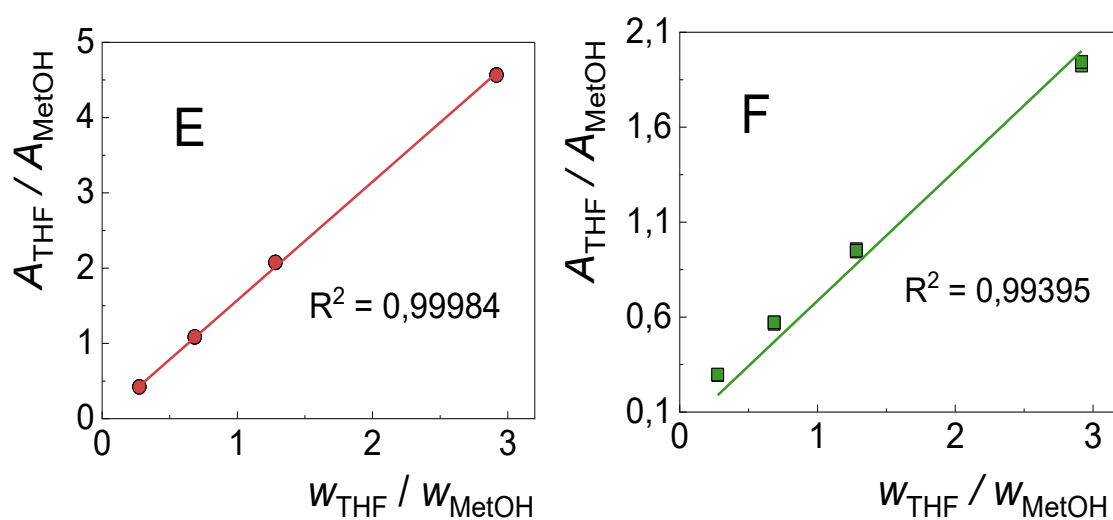


Obr. 4.12: Závislosti poměru ploch acetonitrilu a methanolu pro GC-FID (E) a GC-MS (F) na poměru hmotnostních zlomků acetonitrilu a methanolu.

#### 4.7 Pár tetrahydrofuran – methanol

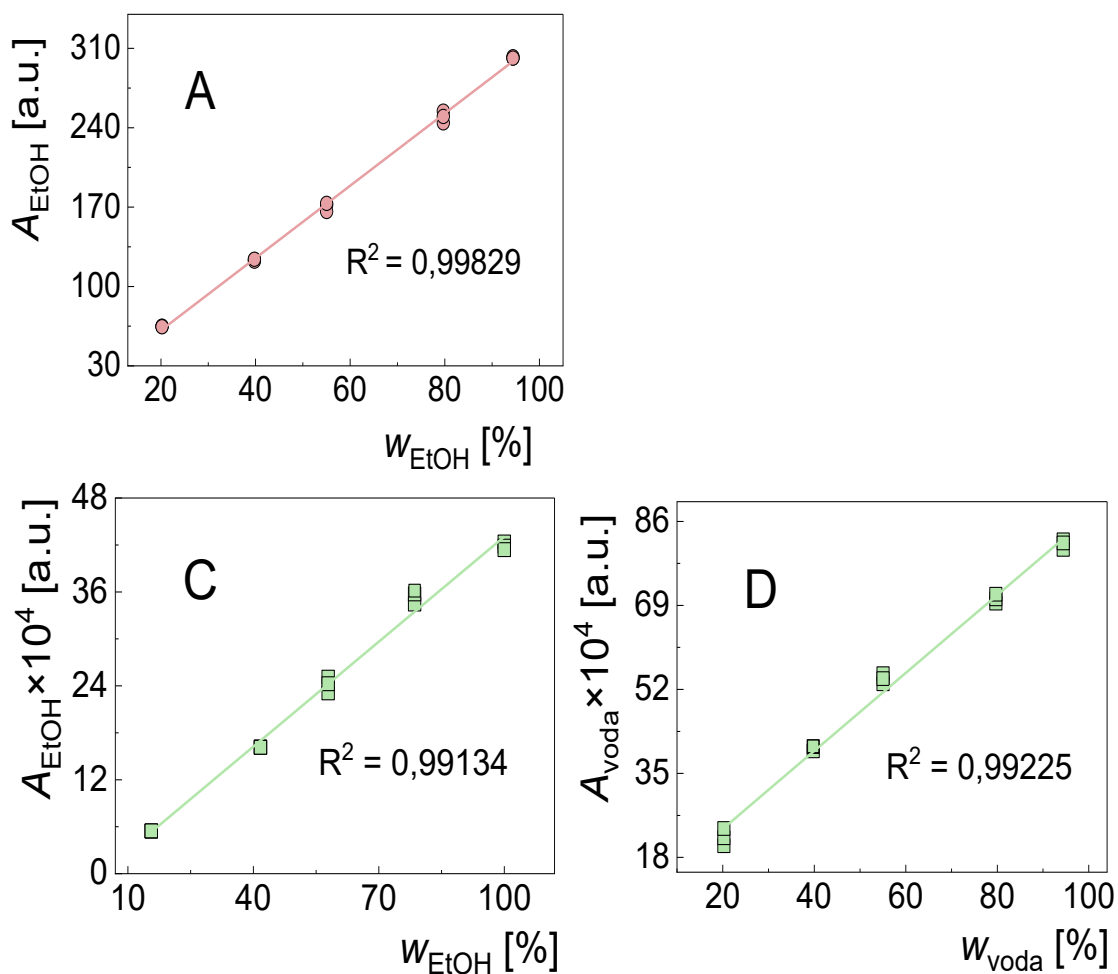


Obr. 4.13: Kalibrační závislosti tetrahydrofuranu (A a C) a methanolu (B a D) získané metodou externího standardu na GC-FID (růžová) a GC-MS (zelená).

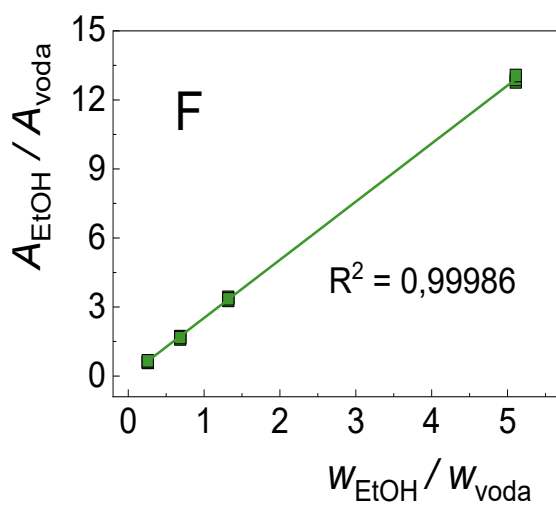


Obr. 4.14: Závislosti poměru ploch tetrahydrofuranu a methanolu pro GC-FID (E) a GC-MS (F) na poměru hmotnostních zlomků tetrahydrofuranu a methanolu.

#### 4.8 Pár ethanol – voda



Obr. 4.15: Kalibrační závislosti ethanolu (A a C) a vody (D) získané metodou externího standardu na GC-FID (růžová) a GC-MS (zelená).



Obr. 4.16: Závislost poměru ploch ethanolu a vody pro GC-MS (F) na poměru hmotnostních zlomků ethanolu a vody.

Byly sestrojeny kalibrační křivky všech 8 párů běžně používaných rozpouštědel. V případě kalibračních roztoků, kdy jednou ze složek byla voda, byla získána kalibrační závislost pouze pro ethanol a acetonitril, jelikož vodu není možné na FID stanovit.

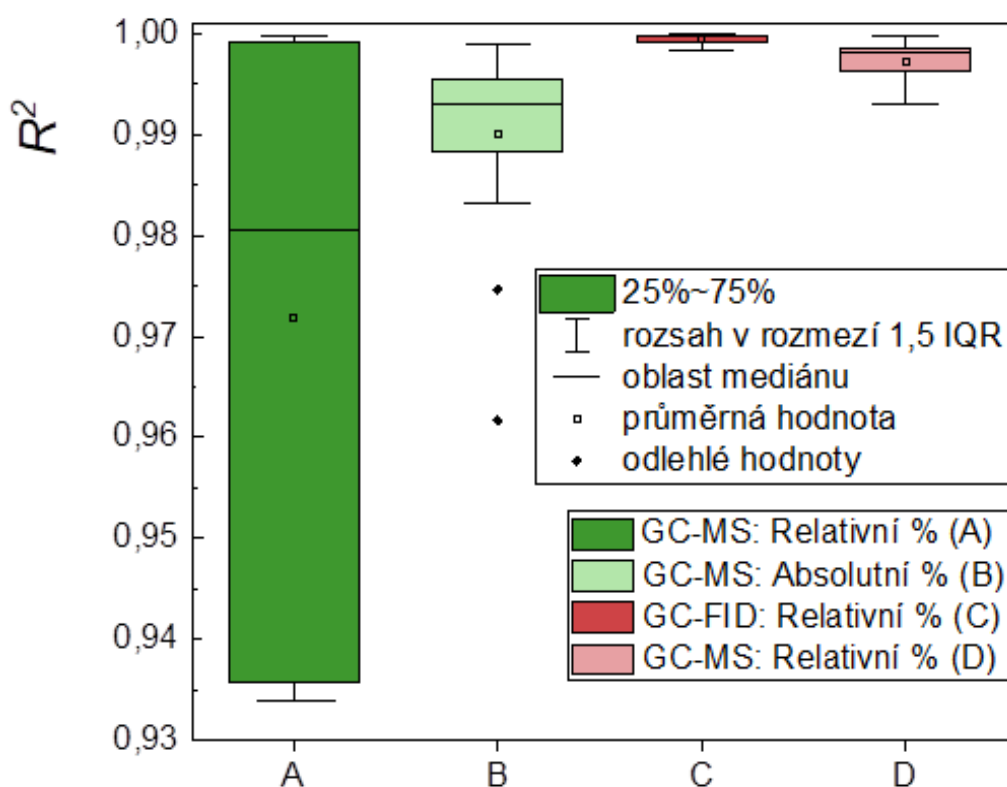
Pro všechny kalibrační závislosti GC-FID analýzou byly získány lineární závislosti s vysokými koeficienty determinace. V případě GC-MS analýzy některých látek se nepodařilo získat lineární závislost kalibračních křivek, ale sestrojeny byly křivky polynomického charakteru, které nejsou pro tradiční kvantitativní metody vhodné. Kalibrační křivka oktanu poskytovala po proložení lineární regresí nízký koeficient determinace ( $R^2 = 0,97467$ ), ale po proložení polynomickou regresí třetího stupně byl získán vysoký koeficient determinace ( $R^2 = 0,99801$ ). Stejný trend byl pozorován u heptanu ( $R_{\text{lineární}}^2 = 0,96164$ ;  $R_{\text{polynom}}^2 = 0,99315$ ), toluenu ( $R_{\text{lineární}}^2 = 0,98529$ ;  $R_{\text{polynom}}^2 = 0,99656$ ) a vody ( $R_{\text{lineární}}^2 = 0,98318$ ;  $R_{\text{polynom}}^2 = 0,99581$ ).

Metodou externího standardu analýzou GC-FID byly získány vysoké koeficienty determinace, ale sestrojením závislostí poměrů ploch píku na hmotnostních procentech byly GC-FID analýzou získány lineární závislosti s ještě vyššími koeficienty determinace. V případě GC-MS analýz nebyla ve všech případech získána lineární závislost, jelikož křivky měly polynomický průběh. Po proložení takových závislostí lineární regresí byly získány nízké koeficienty determinace. Závislost v případě páru heptanu – toluen poskytovala po proložení lineární regresí nízký koeficient determinace ( $R^2 = 0,93568$ ), ale po proložení polynomickou regresí třetího stupně byl získán vysoký koeficient determinace ( $R^2 = 0,99498$ ). Stejně tak výrazně vyšší koeficient determinace poskytla po proložení polynomickou regresí závislost páru tetrahydrofuran-diethylether ( $R^2 = 0,99906$ ).

Koeficienty determinace všech kalibračních závislostí, které byly získány GC-FID a GC-MS kvantifikací, byly statisticky vyhodnoceny a následně znázorněny v podobě krabicového grafu (Obr. 4.17). Tento graf graficky zobrazuje odlehle hodnoty, mediány, minimální, maximální a průměrné hodnoty všech použitých kvantitativních metod. Kromě minimálních a maximálních hodnot a mediánu, které se používají k sestavování krabicového grafu, je dalším důležitým prvkem mezikvartilové rozpětí (IQR), které udává vzdálenost mezi horním a dolním kvartilem, jelikož tato metoda pracuje s grafickým znázorněním dat prostřednictvím jejich kvartilů. První kvartil je roven mediánu dolní poloviny souboru dat a třetí kvartil odpovídá mediánu horní poloviny souboru dat.

Samotná „krabice“ odpovídá střední oblasti diagramu (50 % souboru dat) a z horní a dolní oblasti hraničí s prvním a třetím kvantilem [105–109].

Koeficienty determinace, které poskytovala GC-FID analýza pomocí absolutních a podílu ploch a hmotnostních procent se nejvíce blížily hodnotě 1, což určuje vysokou linearitu závislosti. Jak je z grafického znázornění patrné, GC-MS analýza pomocí podílu ploch píků a hmotnostních procent měla největší diverzitu koeficientů determinace, jelikož některé závislosti nebyly lineární. GC-MS analýza pomocí absolutních procent měla diverzitu koeficientů determinace nižší, ale jak je z obrázku patrné, některé hodnoty byly vyřazeny jako odlehlé.



Obr. 4.17: Grafické znázornění koeficientů determinace závislosti sad měření, které probíhalo pomocí metody GC-FID a GC-MS.

#### 4.9 Alkoholické nápoje

Analyzováno bylo celkem 17 alkoholických produktů, které byly získány zakoupením z komerčního zdroje, část byla získána v rámci spolupráce s firmou Rudolf Jelínek (Slivovice Rudolf Jelínek vz.1-4, destilát T31) a destilát „Žitná“ pocházel z domácího zdroje. Zastoupení ethanolu v alkoholických produktech se pohybovalo v rozsahu od 19,5 % obj. do 81,0 % obj. (Tabulka 4.1).

Pro kvantifikaci ethanolu byla použita metoda kalibrační křivky s využitím ethanolu jako externího standardu, kdy byla sestrojena kalibrační závislost páru ethanol – voda s využitím absolutních hodnot ploch píků a hmotnostních zlomků. Další metodou kvantifikace bylo použití modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních zlomků ethanolu a vody (kapitola 4.8).

*Tabulka 4.1: Seznam stanovovaných alkoholických nápojů s objemovými procenty ethanolu deklarovanými výrobcem (č.vz. 1-11) a hodnotami objemových zlomku ethanolu stanovených výrobcem (č.vz. 12-17)*

| <b>číslo vzorku</b> | <b>Alkoholický nápoj</b>                      | <b>% obj. EtOH</b> |
|---------------------|---|--------------------|
| 1                   | Velhotes White Porto (porto calem)            | 19,5               |
| 2                   | Soplica Orzech Laskowy                        | 28,0               |
| 3                   | Zubrowka Bison Grass Oryginalna Wódka Smakowa | 37,5               |
| 4                   | Gordons London Dry Gin                        | 37,5               |
| 5                   | Chivas Regal 1 Year Old Blended Scotch Whisky | 40,0               |
| 6                   | Spišská hruškovica Original Kosher            | 40,0               |
| 7                   | Pyrat XO Reserve, Premium Caribbean Spirit    | 40,0               |
| 8                   | Jack Daniels Tennessee Whisky Old No.7        | 40,0               |
| 9                   | Kraken Black spiced Rum                       | 40,0               |
| 10                  | A.H.RIISE Non Plus Ultra Very Rare            | 42,0               |
| 11                  | baron Hildprandt Višnovice                    | 42,5               |
| 12                  | Slivovice Rudolf Jelínek vz. 1                | 45,0               |
| 13                  | Slivovice Rudolf Jelínek vz. 2                | 50,0               |
| 14                  | Slivovice Rudolf Jelínek vz. 3                | 71,98              |
| 15                  | Destilát Rudolf Jelínek T31                   | 75,72              |
| 16                  | Slivovice Rudolf Jelínek vz. 4                | 75,95              |
| 17                  | Žitná domácí zdroj                            | 81,0               |

Přirazení nejistoty k výsledkům poskytuje informaci o kvalitě výsledků. Proto bylo ověřeno, jestli deklarované hodnoty objemových procent ethanolu v 17 alkoholických nápojích leží uvnitř intervalu spolehlivosti pro daný soubor dat (Tabulka 4.2). Nejlépe vyhodnocena byla metoda GC-FID, kdy deklarované hodnoty ležely celkem 13x v intervalu spolehlivosti ze 17 vzorků, což odpovídá úspěšnosti ze 76 %. Naopak metodou, která poskytla data, která se blížila deklarované hodnotě objemových procent alkoholu pouze 5x ze 17 vzorků s úspěšností 29 %, byla metoda GC-MS za využití podílu

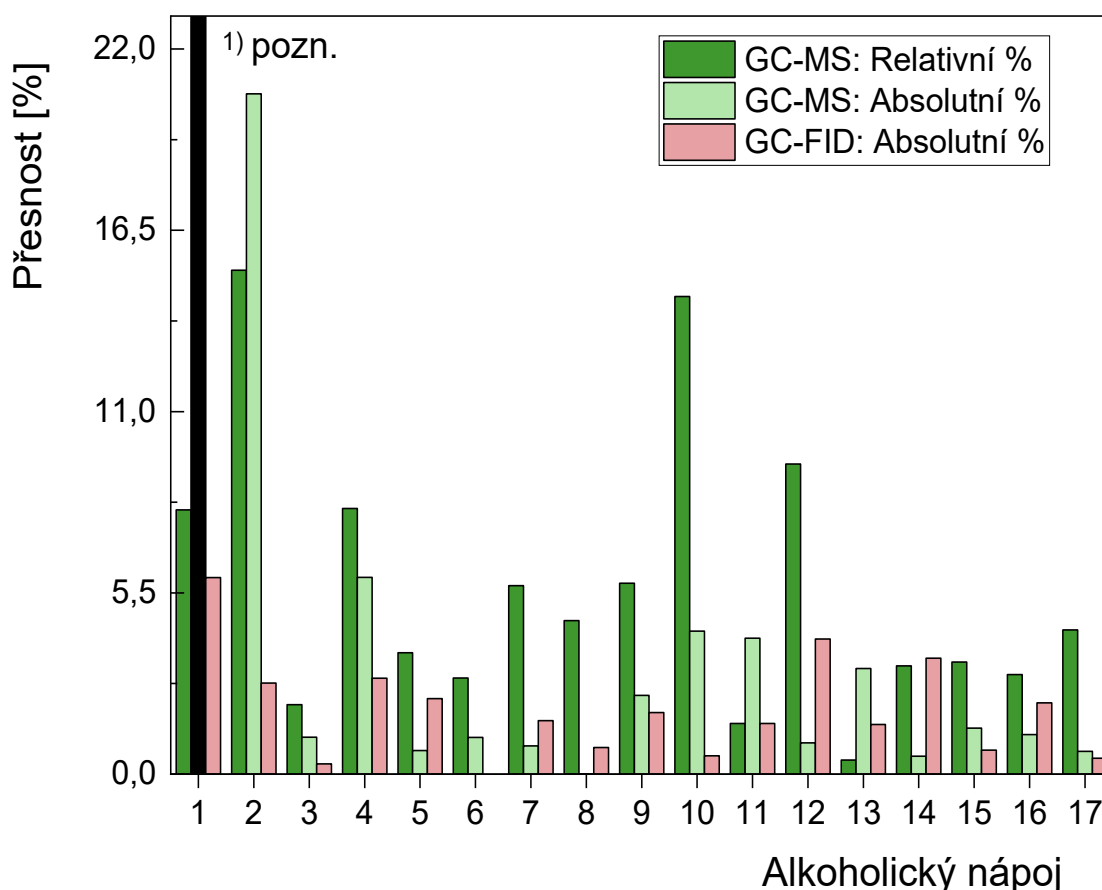
ploch píků ku podílu hmotnostních zlomků. Se 70% úspěšností se metoda GC-MS za využití absolutních hodnot blížila úspěšnosti metody GC-FID.

Tabulka 4.2: Ověření, jestli deklarovaný obsah ethanolu leží v intervalu spolehlivosti naměřené série objemových procent ethanolu.

| Alkoholický<br>nápoj | % obj.<br>EtOH | GC-MS relativní %                    |      | GC-MS absolutní                      |      | GC-FID absolutní                     |      |
|----------------------|----------------|--------------------------------------|------|--------------------------------------|------|--------------------------------------|------|
|                      |                | $\bar{x} \% \pm \frac{\delta}{2} \%$ |      | $\bar{x} \% \pm \frac{\delta}{2} \%$ |      | $\bar{x} \% \pm \frac{\delta}{2} \%$ |      |
| 1                    | 19,50          | 21,1±1,1                             | ×    | 7,9±1,5                              | ×    | 20,7±0,1                             | ×    |
| 2                    | 28,00          | 29,3±0,4                             | ×    | 22,2±0,8                             | ×    | 28,6±0,6                             | ✓    |
| 3                    | 37,50          | 36,6±0,9                             | ✓    | 37,1±0,6                             | ✓    | 37,4±0,7                             | ✓    |
| 4                    | 37,50          | 40,5±0,8                             | ×    | 39,7±1,5                             | ×    | 36,4±4,5                             | ✓    |
| 5                    | 40,00          | 38,5±0,5                             | ×    | 39,7±1,1                             | ✓    | 39,1±0,3                             | ×    |
| 6                    | 40,00          | 38,8±0,4                             | ×    | 39,6±0,6                             | ✓    | 38,8±0,2                             | ✓    |
| 7                    | 40,00          | 42,3±0,5                             | ×    | 39,7±1,1                             | ✓    | 39,4 ±0,7                            | ✓    |
| 8                    | 40,00          | 41,9±2,9                             | ✓    | 40,0±1,4                             | ✓    | 40,3±0,9                             | ✓    |
| 9                    | 40,00          | 42,3±2,8                             | ✓    | 40,9±1,5                             | ✓    | 40,7±0,7                             | ✓    |
| 10                   | 42,00          | 43,8±1,5                             | ×    | 40,2±0,9                             | ×    | 41,8±0,3                             | ✓    |
| 11                   | 42,50          | 43,1±0,6                             | ✓    | 40,8±5,1                             | ✓    | 41,9±1,5                             | ✓    |
| 12                   | 45,00          | 49,2±1,5                             | ×    | 45,4±3,1                             | ✓    | 45,4±0,9                             | ✓    |
| 13                   | 50,00          | 50,2±0,8                             | ✓    | 51,6±1,3                             | ×    | 49,3±0,9                             | ✓    |
| 14                   | 71,98          | 74,4±0,8                             | ×    | 71,6±4,8                             | ✓    | 69,5±0,6                             | ×    |
| 15                   | 75,72          | 78,3±0,7                             | ×    | 76,8±1,5                             | ✓    | 75,2±1,2                             | ✓    |
| 16                   | 75,95          | 78,2±0,1                             | ×    | 76,9±1,8                             | ✓    | 74,3±0,1                             | ×    |
| 17                   | 81,00          | 84,5±0,63                            | ×    | 80,4±4,8                             | ✓    | 80,6±2,9                             | ✓    |
| Σ                    |                |                                      | 5 ✓  |                                      | 12 ✓ |                                      | 13 ✓ |
|                      |                |                                      | 12 × |                                      | 5 ×  |                                      | 4 ×  |
| % úspěšnosti         |                |                                      | 29   |                                      | 70   |                                      | 76   |

Vyhodnocena byla přesnost stanovení obsahu ethanolu (% obj.) ve všech 17 vzorcích alkoholických nápojů (Obr. 4.18). Analýzou GC-MS za využití podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních zlomků ethanolu a vody bylo stanovení ethanolu provedeno s nižší přesností v porovnání s GC-MS analýzou pomocí absolutních hodnot. Z obrázku 4.18 je patrné, že stanovení obsahu ethanolu ve vzorku portského vína Velhotes (vz.č.1) GC-MS analýzou za využití absolutních hodnot bylo zřejmě zatíženo chybou,

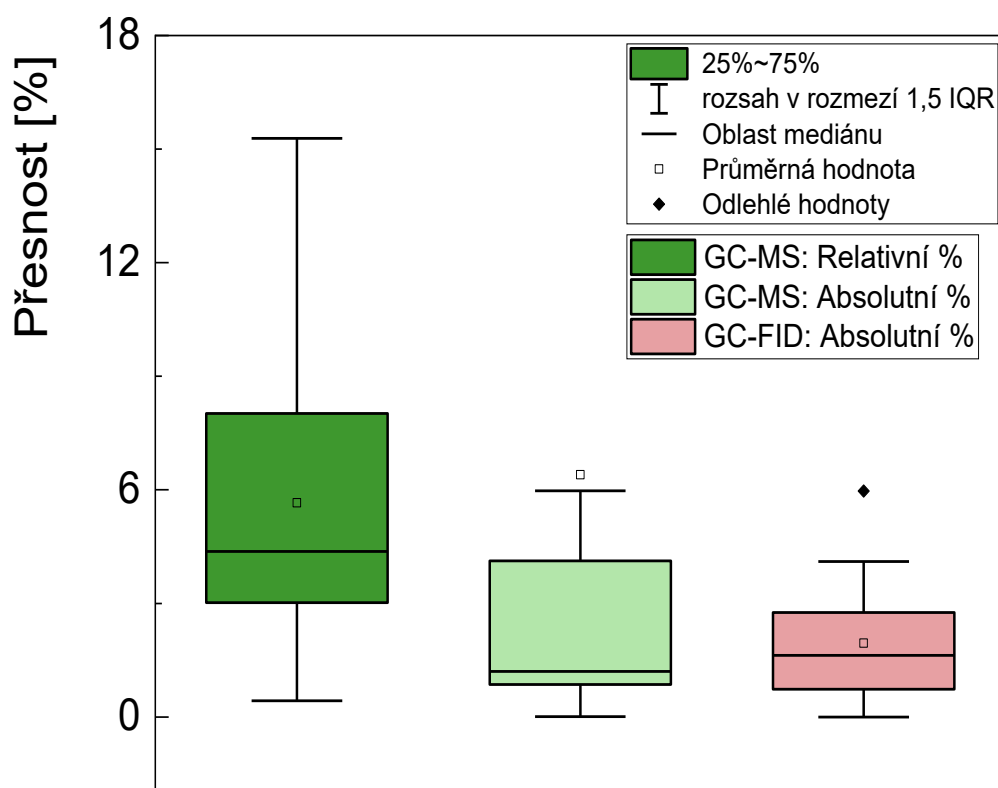
protože míra nepřesnosti vyjádřená v procentech byla rovna 60 %. Pro přehlednost byl rozsah osy y snížen na 23 % a proto není vidět celý sloupec zobrazující přesnost tohoto vzorku (<sup>1</sup> pozn.). Za předpokladu, že v případě vzorků 1 a 2 se jednalo o chyby při měření, byla přesnost GC-MS analýzy pomocí absolutních hodnot srovnatelná se stanovením obsahu ethanolu GC-FID analýzou.



Obr. 4.18: Přesnost stanovení obsahu ethanolu (% obj.) metodami GC-FID a GC-MS v 17 vzorcích alkoholických nápojů. Pro přehlednost byl rozsah osy y snížen na 23 %, a proto není vidět celý sloupec zobrazující přesnost tohoto vzorku (<sup>1</sup> pozn.).

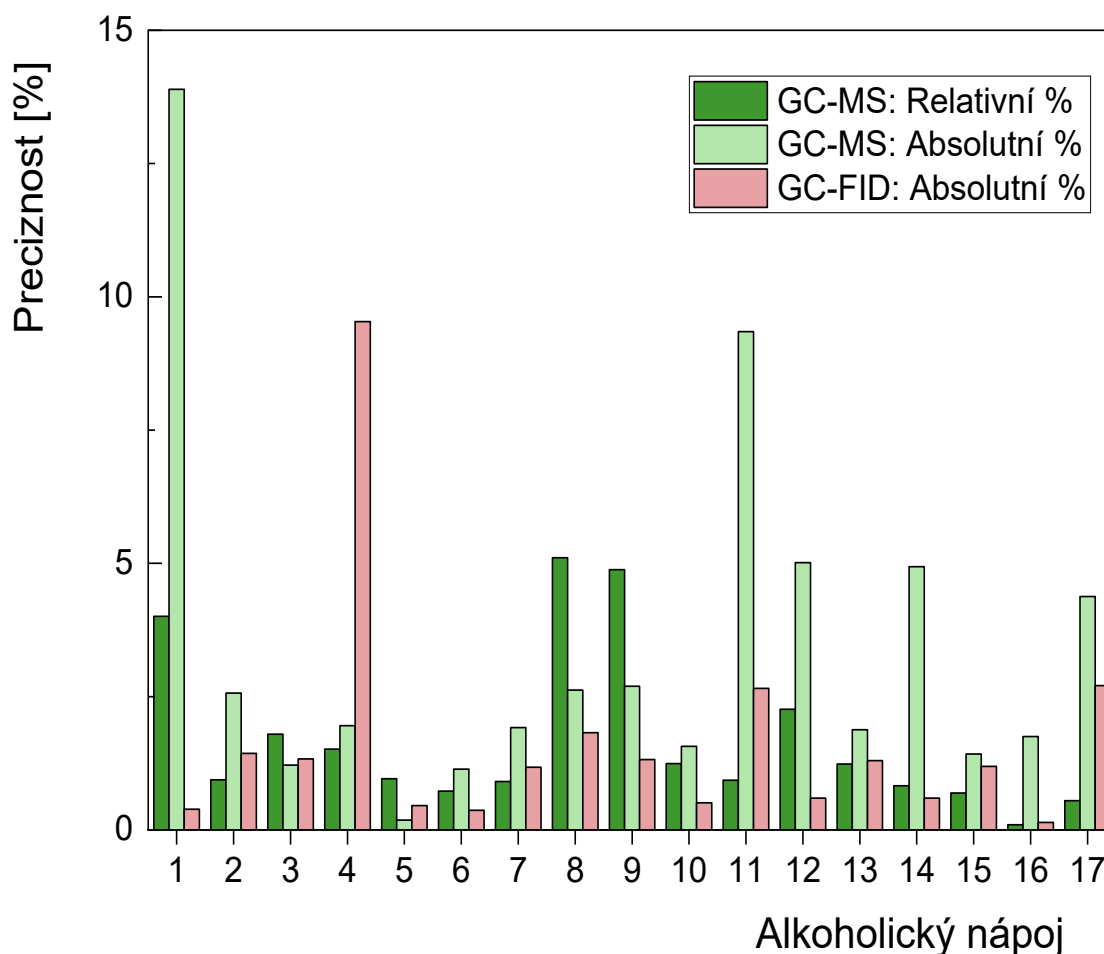
Vyhodnocené výsledky přesnosti byly znázorněny také v podobě krabicového grafu (Obr. 4.19). Jak je z obrázku 4.19 patrné, oblasti mediánů se nejvíce blížily u GC-FID a GC-MS analýz za využití absolutních dat. Hodnoty přesnosti se pohybovaly v největším rozsahu pro analýzu GC-MS s využitím modifikované závislosti podílu ploch pík ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ethanolu a vody, která má také největší rozpětí mezi horním a dolním kvartilem. Na obrázku také můžeme vidět odlehlé hodnoty,

kteře by měly být vyřazeny ze souboru dat. Průměrné hodnoty nepřesností všech kvantitativních metod se pohybovaly v okolí 6 %, což je poměrně vysoká hodnota.



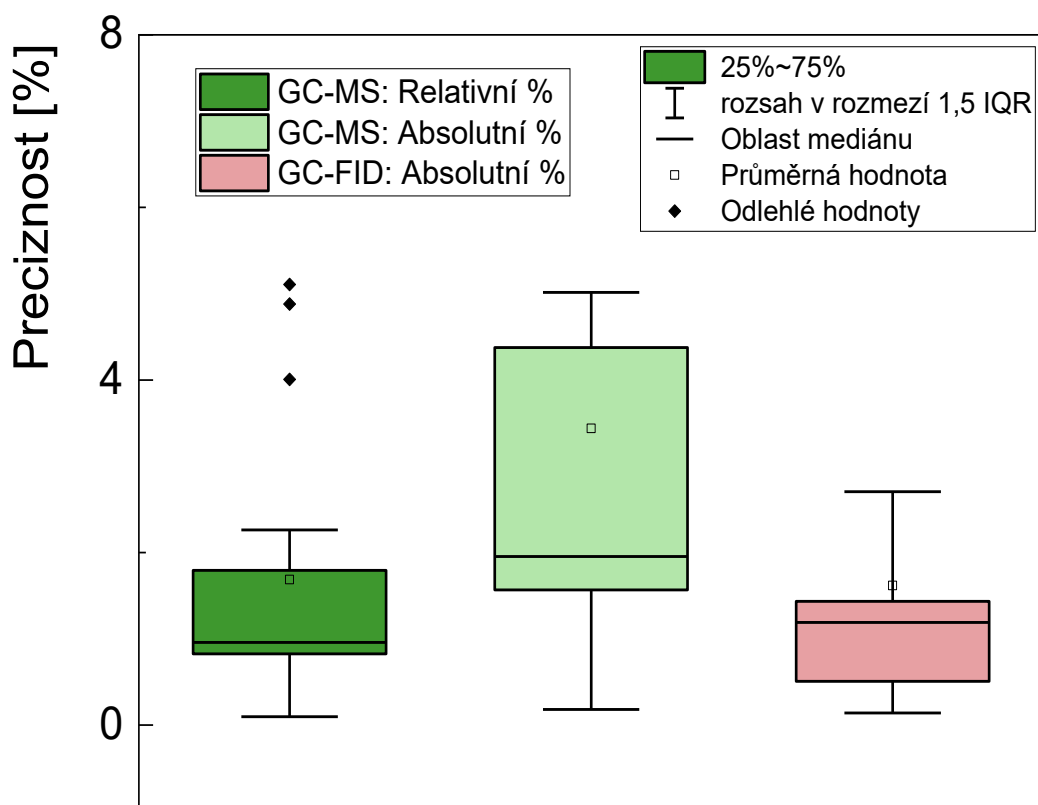
Obr. 4.19: Přesnost stanovení obsahu ethanolu (% obj.) metodami GC-FID a GC-MS v 17 vzorcích alkoholických nápojů znázorněna v podobě krabicového grafu.

Vyhodnocena byla preciznost stanovení obsahu ethanolu (% obj.) ve všech 17 vzorcích alkoholických nápojů vyjádřením pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) (Obr. 4.20). Analýzou GC-MS s využitím podílu ploch píku a hmotnostních procent bylo stanovení provedeno s vyšší precizností v rozmezí 1-5 %, v porovnání s GC-MS analýzou pomocí absolutních hodnot, kdy se směrodatná odchylka pohybovala v rozmezí 0,4-14 %. Z obrázku 4.20 je patrné, že stanovení obsahu ethanolu GC-MS analýzou za využití absolutních hodnot ve vzorku portského vína Velhotes (vz.č.1) bylo zřejmě zatíženo chybou, protože preciznost tohoto vzorku, vyjádřená jako RSD byla 14 % a v případě vzorku č. 11 (baron Hildprandt Višnovice) lze pozorovat vysokou RSD kolem 10 %. I v případě analýzy GC-FID lze pozorovat u vzorku č. 4 vysokou RSD blížíící se k 10 %. Stanovení obsahu ethanolu bylo srovnatelné u stanovení metodou GC-FID a GC-MS využitím modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ethanolu a vody.



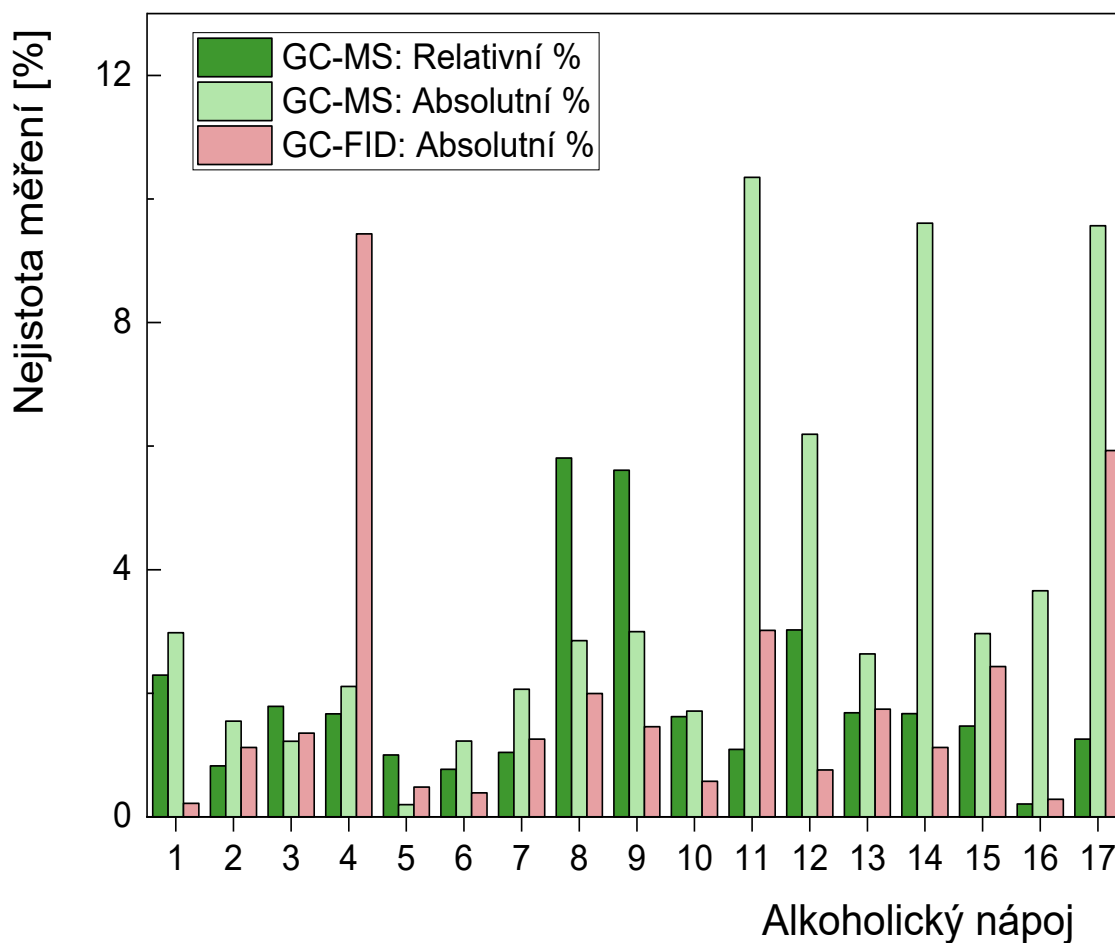
Obr. 4.20: Preciznost stanovení obsahu ethanolu (% obj.) metodami GC-FID a GC-MS v 17 vzorcích alkoholických nápojů, která byla vyjádřena jako RSD.

Vyhodnocené výsledky preciznosti byly znázorněny také v podobě krabicového grafu (Obr. 4.21). Jak je z obrázku patrné, oblasti mediánů se nejvíce blížily u GC-FID a GC-MS analýz za využití modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ethanolu a vody. Největší rozmezí preciznosti analýzy metodou GC-MS s využitím absolutních hodnot, které má největší rozpětí mezi horním a dolním kvartilem. Na obrázku také můžeme vidět odlehlé hodnoty, které by měly být vyřazeny ze souboru dat. Průměrné hodnoty RSD preciznosti všech tří kvantitativních metod se pohybovaly v rozmezí od 2 do 4 %.



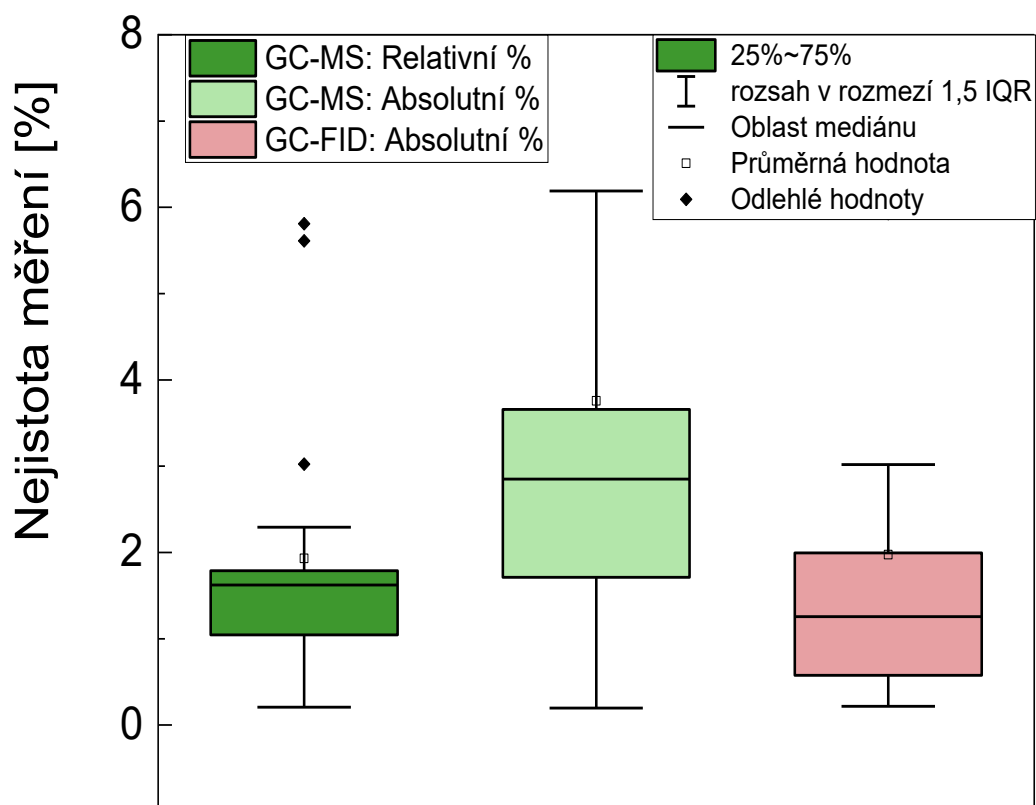
Obr. 4.21: Preciznost stanovení obsahu ethanolu (% obj.) metodami GC-FID a GC-MS v 17 vzorcích alkoholických nápojů znázorněna v podobě krabicového grafu.

Dále byla vyhodnocena nejistota měření při stanovení obsahu ethanolu (% obj.) ve všech 17 vzorcích alkoholických nápojů, která udává, zda je rozdíl mezi výsledky významný. Pro výpočet byl použit Studentův t-test. Jak je z obrázku 4.22 patrné, analýza GC-MS pomocí modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ethanolu a vody byla provedena s nižší nejistotou v porovnání s GC-MS analýzou pomocí absolutních hodnot. U vzorků 8 a 9 (whisky Jack Daniels a rum Kraken) při GC-MS analýze pomocí modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ethanolu a vody můžeme pozorovat větší odchýlení dat od zbylého souboru, které mohlo být způsobeno chybou zanesenou do měření v průběhu analýzy. V případě GC-MS analýzy pomocí absolutních hodnot byly odchylky od reálné hodnoty výraznější, protože vzorky 11,12, 14 a 17 vykazují úroveň nepřesnosti od 7 do 10 %. Nejistota měření GC-MS analýzy za využití modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ethanolu a vody byla srovnatelná s odchylkami při měření GC-FID analýzou, která nespíš u vzorku č. 4 (Gordons London Dry Gin) byla zatížena chybou, jelikož vykazuje úroveň nejistoty téměř 10 %.



Obr. 4.22: Nejistota měření při stanovení obsahu ethanolu (% obj.) metodami GC-FID a GC-MS v 17 vzorcích alkoholických nápojů, která byla vypočtena pomocí Studentova t-testu.

Vyhodnocené výsledky nejistoty měření byly znázorněny také v podobě krabicového grafu (Obr. 4.23). Jak je z obrázku patrné, oblasti mediánů se nejvíce blížily u GC-FID a GC-MS analýz za využití modifikovaných závislostí. Oblast s největším rozptylem hodnot zabíraly nejistoty měření metodou GC-MS s využitím absolutních hodnot, které měly největší rozpětí mezi horním a dolním kvartilem. Naopak nejmenší oblast grafu zabíral rozptyl hodnot nepřesnosti GC-MS analýzy, který byla nižší než u analýzy metodou GC-FID, ale u GC-MS můžeme pozorovat velké množství odlehlých hodnot. Průměrné hodnoty nejistoty stanovení byly srovnatelné u GC-FID a GC-MS analýz za využití relativních hodnot. Co se týče nejistoty měření, nejméně výsledky byly dosaženy analýzou GC-MS za využití absolutních hodnot, jelikož ležely ve velikém rozsahu hodnot.



Obr. 4.23: Nejistota měření při stanovení obsahu ethanolu (% obj.) metodami GC-FID a GC-MS v 17 vzorcích alkoholických nápojů znázorněna v podobě krabicového grafu.

Tabulka 4.3: Finální metrologické zhodnocení metody GC-MS a GC-FID vyjádřené pomocí intervalu spolehlivosti.

|                      | GC-MS relativní | GC-MS absolutní | GC-FID absolutní |
|----------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Přesnost [%]         | 4,4±2,0         | 1,9±1,6         | 1,7±1,1          |
| Preciznost [%]       | 1,1±0,3         | 2,4±0,6         | 1,1±0,7          |
| Nejistota měření [%] | 1,3±0,5         | 2,9±2,1         | 1,2±0,7          |

## 5. Závěr

Předmětem této práce bylo prokázat validnost metody GC-MS pro kvantitativní stanovení majoritních složek roztoků za využití M+1 iontů a rozšířit tuto metodu pro stanovení obsahu ethanolu ve skutečných alkoholických produktech.

Vypracována byla literární rešerše zabývající se vymezením praktických rozdílů mezi metodami GC-FID a GC-MS a jejich využití při stanovení majoritních složek směsí. Největší část teoretického úvodu byla věnována metodám, které se běžně používají pro stanovení obsahu ethanolu v alkoholických produktech, abychom mohli tyto metody kriticky zhodnotit a porovnat s nově vyvíjenou metodou kvantifikace pomocí GC-MS. Pro získání souboru dat bylo analyzováno celkem 8 párů rozpouštědel a 17 vzorků alkoholických nápojů. Vyhodnocení kvantitativních dat stanovovaných alkoholických nápojů bylo provedeno statisticky a graficky pro obě metody. Byl vypočítán aritmetický průměr, relativní směrodatná odchylka, nejistota měření (interval spolehlivosti), přesnost a preciznost.

Stanovení obsahu ethanolu v alkoholických nápojích bylo provedeno s největší přesností výsledků metodou GC-FID ( $1,7 \pm 1,1$  %). Srovnatelnou míru shody mezi referenčními a naměřenými hodnotami poskytovala GC-MS pomocí absolutních hodnot ( $1,9 \pm 1,6$  %). Stanovení ethanolu s nejnižší přesností bylo provedeno metodou GC-MS s využitím modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ethanolu a vody ( $4,4 \pm 2,0$  %). Preciznost stanovení obsahu ethanolu vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka byla srovnatelná u stanovení metodou GC-FID ( $1,1 \pm 0,7$  %) a GC-MS s využitím modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ( $1,1 \pm 0,3$  %). Stanovení GC-MS za využití absolutních hodnot vykazovalo největší rozptyl relativních směrodatných odchylek jednotlivých měření ( $2,4 \pm 0,6$  %). Vypočtena byla nejistota měření pro zjištění, zda je rozdíl mezi výsledky významný. Průměry nejistot měření se nejvíce blížily u GC-FID ( $1,2 \pm 0,7$  %) a GC-MS analýz za využití modifikované závislosti podílu ploch píků ethanolu a vody na podílu hmotnostních procent ethanolu a vody ( $1,3 \pm 0,5$  %). Nejvyšší nejistotu měření poskytovalo GC-MS stanovení ethanolu za využití absolutních hodnot ( $2,9 \pm 2,1$  %).

Použití SIM módu v GC-MS zajišťuje mnohem větší citlivost než analýza GC-FID, ale je limitováno ionizační účinností detektoru, které pravděpodobně způsobovalo nelineární závislosti některých rozpouštědel (oktanu, heptanu, toluenu, vody). Analýzou

přesnosti, nejistoty, preciznosti a koeficientů determinace bylo prokázáno, že metodou GC-MS je možné dosáhnout výsledků srovnatelných s metodou GC-FID a jedná se o metodu robustní, kterou lze úspěšně použít při kvantifikaci majoritních složek, tedy i zastoupení ethanolu v alkoholických produktech.

## Seznam literatury

- [1] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, 2000. [www.mhhe.com](http://www.mhhe.com) (accessed May 5, 2022).
- [2] R. Koplík, *Základy analýzy potravin - Stanovení minerálních látek*, Praha, n.d. <https://web.vscht.cz/~koplíkr/ČástB4.pdf> (accessed March 28, 2022).
- [3] K. Nesměrák, *Praktikum z klasických metod analýzy*, Praha, 2020. [https://web.natur.cuni.cz/~analchem/nesmerak/pka\\_scriptum\\_13.pdf](https://web.natur.cuni.cz/~analchem/nesmerak/pka_scriptum_13.pdf) (accessed March 28, 2022).
- [4] *Polarimetrie: Kvantitativní stanovení sacharózy*, Brno, n.d. <https://cit.vfu.cz/biochemie/biofyz12/polarimetrie.html> (accessed March 28, 2022).
- [5] *Refraktometrie: Kvalitativní stanovení alkoholů a kvantitativní stanovení sacharózy a NaCl*, Brno, n.d. <https://cit.vfu.cz/biochemie/biofyz12/refrak13a.html> (accessed March 28, 2022).
- [6] *Stanovení proteinů*, Olomouc, n.d. [https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy\\_k\\_vyuce/KBC-BCHC\\_1\\_Stanoveni\\_proteinu.pdf](https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-BCHC_1_Stanoveni_proteinu.pdf) (accessed March 28, 2022).
- [7] E. Junaedi, K. Lestari, M. Muchtaridi, Infrared spectroscopy technique for quantification of compounds in plant-based medicine and supplement, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 12 (2021) 1–7. [https://doi.org/10.4103/JAPTR.JAPTR\\_96\\_20](https://doi.org/10.4103/JAPTR.JAPTR_96_20).
- [8] J.G. Nikelly, J.M. Betz, Determination of Ethanol In Alcoholic Beverages by Liquid Chromatography Using the UV Detector, *J. Chromatogr. Sci.* 25 (1987) 391–394. <https://doi.org/10.1093/CHROMSCI/25.9.391>.
- [9] S. V. Charapitsa, S.N. Sytova, A.A. Makhomet, T.I. Guguchkina, M.G. Markovsky, Y.F. Yakuba, Y.N. Kotov, Method “Ethanol as Internal Standard” for determination of volatile compounds in alcohol products by gas chromatography in daily practice, (2016). <https://doi.org/10.48550/arxiv.1601.05587>.
- [10] *Stanovení hustoty pyknometrickou metodou*, (n.d.). [https://www.vfu.cz/files/3130\\_71\\_zeman\\_01-stanoveni-hustoty-pyknometrickou-metodou.pdf](https://www.vfu.cz/files/3130_71_zeman_01-stanoveni-hustoty-pyknometrickou-metodou.pdf) (accessed February 9, 2022).
- [11] M. Viana, P. Jouannin, C. Pontier, D. Chulia, About pycnometric density measurements, *Talanta.* 57 (2002) 583–593. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00058-9).
- [12] P. Brereton, S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski, Analytical methods for the determination of spirit drinks, Elsevier. 22 (2003) 19–25. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993603001031> (accessed February 9, 2022).
- [13] S.A. Halsey, The use of transmission and transreflectance near infrared spectroscopy for the analysis of beer, *J. Inst. Brew.* 91 (1985) 306–312. <https://doi.org/10.1002/J.2050-0416.1985.TB04348.X>.
- [14] A. Korban, S. Charapitsa, R. Čabala, S. Lidia, S. Sytova, The perspectives of ethanol usage as an internal standard for the quantification of volatile compounds in alcoholic products by GC-MS, *J. Mass Spectrom.* 55 (2020). <https://doi.org/10.1002/jms.4493>.
- [15] E. Forgács, T. Cserhádi, Gas chromatography, in: *Food Authent. Traceability*, Woodhead Publishing, 2003: pp. 197–217. <https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.197>.
- [16] 06. *Plynová chromatografie (GC)*, 2009. <https://is.muni.cz/el/sci/jaro2009/C6390/7480488/uvod.pdf> (accessed February 24, 2022).
- [17] *Chromatografie*, n.d. [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM\\_07.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_07.pdf) (accessed February 24,

- 2022).
- [18] T. Sfetsas, C. Michailof, A. Lappas, Q. Li, B. Kneale, Qualitative and quantitative analysis of pyrolysis oil by gas chromatography with flame ionization detection and comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 3317–3325. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.10.034>.
- [19] F.W. Karasek, R.E. Clement, *Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, Elsevier, 1988. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-12062-7>.
- [20] Kvantitativní analýza v chromatografii - Úloha č. 2 , 2005. [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2005/C6390/um/365564/gc\\_kvantita.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2005/C6390/um/365564/gc_kvantita.pdf) (accessed February 23, 2022).
- [21] G. Guiochon, C.L. Guillemin, *Quantitative gas chromatography : for laboratory analyses and on-line process control*, 1. edice, Elsevier, 1988.
- [22] D.C. Harris, J.A.C. Broekaert, *Quantitative chemical analysis*, 9th ed., Springer, 2015. <https://doi.org/10.1007/S00216-015-9059-6>.
- [23] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, 2003.
- [24] M. Volný, Kvantitativní analýza s využitím hmotnostní spektrometrie, *Chem. List.* 114 (2020).
- [25] Lékopis - Chromatografické separační metody, (n.d.). [http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_46.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_46.htm) (accessed February 16, 2022).
- [26] P. Zachář, D. Sýkora, PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE, n.d. <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf> (accessed February 23, 2022).
- [27] R. Čabala, *Plynová chromatografie - Instrumentace* , Praha, 2008. <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/plynova-chromatografie-pro-studenty-kata/instrumentace-v-gc/> (accessed February 25, 2022).
- [28] J. Yu, R.M.A. Hahne, *AIR ANALYSIS | Workplace Air*, *Encycl. Anal. Sci.* Second Ed. (2005) 48–55. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00009-1>.
- [29] S. Higson, *Analytical chemistry*, 2004. [https://books.google.com/books/about/Analytical\\_Chemistry.html?hl=cs&id=a0dGAAAAYAAJ](https://books.google.com/books/about/Analytical_Chemistry.html?hl=cs&id=a0dGAAAAYAAJ) (accessed March 29, 2022).
- [30] Detector : SHIMADZU (Shimadzu Corporation), (n.d.). <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamentals/detector.html> (accessed March 29, 2022).
- [31] F.G. Kitson, B.S. Larsen, C.N. McEwen, *Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide*, Academic Press, 1996.
- [32] J. Poustka, *Hmotnostní spektrometrie*, 2018. [https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM\\_PIGA\\_Cz-8\\_MS-1-PRINCIP+IONIZACE\\_JP2018.pdf](https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM_PIGA_Cz-8_MS-1-PRINCIP+IONIZACE_JP2018.pdf) (accessed March 8, 2022).
- [33] J. Poustka, *Aplikovaná hmotnostní spektrometrie (MS)*, Praha, 2019. [https://web.vscht.cz/~poustkaj/AMFA\\_4\\_3-REV\\_092019\\_JP\\_MS.pdf](https://web.vscht.cz/~poustkaj/AMFA_4_3-REV_092019_JP_MS.pdf) (accessed March 28, 2022).
- [34] M. Bolechová, *Využití hmotnostní spektrometrie ke stanovení markerů oxidativního stresu a mykotoxinů*, *Vysoké učení technické v Brně*, 2014.
- [35] C. Dass, *Fundamentals of contemporary mass spectrometry* , Wiley , 2007.
- [36] *Setting up a SIM Acquisition Method MS ChemStation*, n.d. <http://www.chem.agilent.comhttp://www.chem.agilent.comhttp://www.chem.agilent.com> (accessed April 21, 2022).
- [37] P. Matějka, *Kombinované techniky*, Praha, n.d. <https://old.vscht.cz/anl/matejka/ACH2->

- 04-kombinace1.pdf (accessed April 21, 2022).
- [38] E. Stauffer, J.A. Dolan, R. Newman, *Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry*, Academic Press, 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>.
- [39] A.T. Lebedev, *Mass Spectrometry in Organic Chemistry*, Publishing House BINOM, 2003.  
[https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=612443](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=612443) (accessed May 6, 2022).
- [40] P. Matějka, *Analytická chemie*, (n.d.). <https://old.vscht.cz/anl/matejka/2012-ACH1-1-zakladnipojmy.pdf> (accessed May 1, 2022).
- [41] M. Šucmanová, M. Zischka, V. Adamec, *K metodám stanovení některých rizikových mikroelementů z dopravy v prachových částicích*, n.d. <https://www.cdv.cz/file/clanek-k-metodam-stanoveni-nekterych-rizikovych-mikroelementu-z-dopravy-v-prachovych-casticich/> (accessed May 1, 2022).
- [42] TPG 902 02 - *Jakost a zkoušení plyných paliv s vysokým obsahem metanu*, (n.d.). <https://www.technickenormy.cz/tpg-902-02-jakost-a-zkouseni-plynnych-paliv-s-vysokym-obsahem-metanu/> (accessed April 26, 2022).
- [43] *Biogas Analyser*, (n.d.). [https://www.pragolab.cz/documents/Biogas\\_analyzer.pdf](https://www.pragolab.cz/documents/Biogas_analyzer.pdf) (accessed May 1, 2022).
- [44] G. Producers Association, *GPA 2261: Analysis of natural gas and similar gaseous mixtures by gas chromatography*, (n.d.). <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/004/gpa.2261-00.2000.pdf> (accessed April 26, 2022).
- [45] J. Dai, K.H. Kim, J.E. Szulejko, S.H. Jo, *A simple method for the parallel quantification of nicotine and major solvent components in electronic cigarette liquids and vaped aerosols*, *Microchem. J.* 133 (2017) 237–245.  
<https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2017.02.029>.
- [46] K.H. Kim, *Mass change tracking approach as collection guidelines for aerosol and vapor samples released during e-cigarette smoking*, *Anal. Methods.* 8 (2016) 2305–2311.  
<https://doi.org/10.1039/C5AY03385C>.
- [47] M. Anders Apel, R. A.F. Rodrigues, L.A. Lira Soares, A.T. Henriques, *Quantification of the components in commercial essential oil of Eucalyptus globulus labill. by gas chromatography – GC-FID and GC-MS*, *Drug Anal. Res.* 1 (2017) 9–14.  
<https://doi.org/10.22456/2527-2616.79217>.
- [48] H.M. Kim, J. Yoon Kim, B.-K. Shin, J. Lee, J.H. Park, S.W. Kwon, *Simultaneous Determination of Volatile Organic Compounds in Commercial Alcoholic Beverages by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*, *J. Aoac Int.* 100 (2017) 1492.  
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0006>.
- [49] S. Charapitsa, S. Sytova, A. Korban, N. Boyarin, I. Shestakovich, R. Čabala, *The establishment of metrological characteristics of the method “Ethanol as Internal Standard” for the direct determination of volatile compounds in alcoholic products*, *J. Chem. Metrol.* 12 (2018) 59–69. <https://doi.org/10.25135/JCM.14.18.02.063>.
- [50] A.A. Apostolopoulou, A.I. Flouros, P.G. Demertzis, K. Akrida-Demertzi, *Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates*, *Food Control.* 16 (2005) 157–164. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2004.01.005>.
- [51] B.W. Zoecklein, K.C. Fugelsang, B.H. Gump, F.S. Nury, *Volatile Acidity*, *Prod. Wine Anal.* (1990) 98–113. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8146-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8146-8_5).
- [52] S.K. Tulashie, A.P. Appiah, G.D. Torku, A.Y. Darko, A. Wiredu, *Determination of methanol and ethanol concentrations in local and foreign alcoholic drinks and food*

- products (Banku, Ga kenkey, Fante kenkey and Hausa koko) in Ghana, *Int. J. Food Contam.* 4 (2017) 1–5. <https://doi.org/10.1186/S40550-017-0059-5/TABLES/3>.
- [53] A.G. Panosyan, G. V. Mamikonyan, M. Torosyan, E.S. Gabrielyan, S.A. Mkhitarian, M.R. Tirakyan, A. Ovanesyan, Determination of the composition of volatiles in cognac (brandy) by headspace gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Chem.* 56 (2001) 945–952. <https://doi.org/10.1023/A:1012365629636>.
- [54] M. Paolini, L. Tonidandel, R. Larcher, Development, validation and application of a fast GC-FID method for the analysis of volatile compounds in spirit drinks and wine, *Food Control.* 136 (2022) 108873. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2022.108873>.
- [55] Nařízení rady (EHS) č. 1576/89 ze dne 29. května 1989, kterým se stanoví obecná pravidla pro definici, označování a obchodní úpravu lihovin, (n.d.). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:31989R1576&from=CS> (accessed April 20, 2022).
- [56] Nařízení komise (ES) č. 2870/2000 ze dne 19. prosince 2000, kterým se stanoví referenční metody Společenství používané pro rozbor lihovin, (n.d.). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000R2870&from=EN> (accessed April 20, 2022).
- [57] J.A. Buglass, *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*, 2010. [https://books.google.cz/books?id=gNc34oNpg0AC&pg=PT10&hl=cs&source=gbs\\_selected\\_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=gNc34oNpg0AC&pg=PT10&hl=cs&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false) (accessed February 28, 2022).
- [58] Commission regulation (EU) No 1169/2011 on the provision of food information to consumers., (n.d.). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32011R1169> (accessed April 22, 2022).
- [59] Spotřební daň - líh, (n.d.). <https://www.finance.cz/dane-a-mzda/dph-a-spotrebni-dane/spotrebni-dane/lih/> (accessed May 7, 2022).
- [60] A. Korban, R. Čabala, V. Egorov, Z. Bosáková, S. Charapitsa, Evaluation of the Variation in Relative Response Factors of GC-MS Analysis with the Internal Standard Methods: Application for the Alcoholic Products Quality Control, *SSRN Electron. J.* (2022). <https://doi.org/10.2139/SSRN.3979401>.
- [61] A. Korban, S. Charapitsa, R. Čabala, L. Sobolenko, V. Egorov, S. Sytova, Advanced GC-MS method for quality and safety control of alcoholic products, *Food Chem.* 338 (2021) 128107. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128107>.
- [62] E. Dandarova, P. Gabriel, M. Dienstbier, P. Sladký, Moderní metody a zařízení pro stanovení obsahu alkoholu v pivu, (n.d.). <http://kvasnyprumysl.net/pdfs/kpr/1995/09/02.pdf> (accessed April 22, 2022).
- [63] M. Proudlove, *The use of near infra-red spectroscopy in malting and brewing*, (1992).
- [64] Systém pro analýzu alkoholu: Alcolyzer, (n.d.). <https://www.anton-paar.com/cz-cs/produkty/detaily/alcolyzer-analytický-systém/> (accessed March 24, 2022).
- [65] A. Hernandez-Cardoso, Water determination, *Pharmacopeial Forum.* 36 (2020) 459–477. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102824-7.00017-8>.
- [66] E.P.C. Council of Europe, *European pharmacopoeia - Ethanol content*, 6th ed., Council Of Europe, Strasbourg, 2007.
- [67] I. Cibulka, Hnědkovský Lubomír, V. Hynek, *Základní fyzikálně-chemické veličiny a jejich měření*, Praha, 2006. [https://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013864/ZaklaFyzChemVelicin\\_all\\_7.pdf?redirected](https://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013864/ZaklaFyzChemVelicin_all_7.pdf?redirected) (accessed February 28, 2022).
- [68] ISO 758:1976 - Liquid chemical products for industrial use — Determination of density at 20 degrees C, (n.d.). <https://www.iso.org/standard/5035.html> (accessed April 22,

- 2022).
- [69] International Alcoholometric Tables , (n.d.). [https://www.oiml.org/en/files/pdf\\_r/r022-e75.pdf](https://www.oiml.org/en/files/pdf_r/r022-e75.pdf) (accessed April 22, 2022).
- [70] Pyknometr dle Gay-Lussaca, (n.d.). <https://www.verkon.cz/pyknometr-dle-gay-lussaca-simax/> (accessed May 9, 2022).
- [71] Pyknometr dle Hubbarda , (n.d.). <https://www.verkon.cz/pyknometr-dle-hubbarda-simax/> (accessed May 9, 2022).
- [72] Pyknometr dle Reischauera , (n.d.). <https://www.verkon.cz/pyknometr-dle-reischauera-simax/> (accessed May 9, 2022).
- [73] Lihoměr bez tepl. 0-100% dlouhý, (n.d.). <https://www.vinarskepotreby.cz/lihomer-bez-tepl-0-100-dlouhy-hc3402001.html#gallery> (accessed May 9, 2022).
- [74] C.A. Weatherly, R.M. Woods, D.W. Armstrong, Rapid analysis of ethanol and water in commercial products using ionic liquid capillary gas chromatography with thermal conductivity detection and/or barrier discharge ionization detection, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1832–1838. [https://doi.org/10.1021/JF4050167/SUPPL\\_FILE/JF4050167\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/JF4050167/SUPPL_FILE/JF4050167_SI_001.PDF).
- [75] M.-L. Wang, Y.-M. Choong, N.-W. Su, M.-H. Lee, A Rapid Method for Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages Using Capillary Gas Chromatography, *Pages J. Food Drug Anal.* 11 (2003) 133–140.
- [76] B. Wolfson, H.E. Ciccarelli, E.S. Siker, Gas chromatography using an internal standard for the estimation of ether and halothane levels in blood, *Br. J. Anaesth.* 38 (1966) 591–595. <https://doi.org/10.1093/bja/38.8.591>.
- [77] Choosing an Internal Standard, (n.d.). <https://www.restek.com/row/chromablography/chromablography/choosing-an-internal-standard/> (accessed May 1, 2022).
- [78] M.L. Wang, J.T. Wang, Y.M. Choong, Simultaneous quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverage using a rapid gas chromatographic method coupling with dual internal standards, *Food Chem.* 86 (2004) 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.029>.
- [79] M. Stupak, V. Kocourek, I. Kolouchova, J. Hajslova, Rapid approach for the determination of alcoholic strength and overall quality check of various spirit drinks and wines using GC–MS, *Food Control.* 80 (2017) 307–313. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.05.008>.
- [80] C.I. Owuama, J.C. Ododo, Refractometric determination of ethanol concentration, *Food Chem.* 48 (1993) 415–417. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90327-C](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90327-C).
- [81] Refraktometr pro měření objemových procent alkoholu AT 80 SIXTOL , (n.d.). <https://www.torriacars.cz/refraktometr-pro-mereni-objemovych-procent-alkoholu-at-80-sixtol> (accessed April 22, 2022).
- [82] Refractometer for measuring of ABV (alcohol by volume) , (n.d.). <https://www.refractometer.eu/ral1-refractometer-for-measuring-of-abv-alcohol-by-volume> (accessed April 22, 2022).
- [83] G. Lazarova, L. Genova, V. Kostov, Ethanol concentration determination using solvent extraction and refractometry, *Acta Biotechnol.; (German Democr. Republic).* 7:1 (1987) 97–99. <https://doi.org/10.1002/ABIO.370070120>.
- [84] R.J.J. Riobóo, M. Philipp, M.A. Ramos, J.K. Krüger, Concentration and temperature dependence of the refractive index of ethanol-water mixtures: Influence of intermolecular interactions, *Eur. Phys. J. E.* 30 (2009) 19–26. <https://doi.org/10.1140/epje/i2009-10496-4>.

- [85] J. Rheims, J. Köser, T. Wriedt, Refractive-index measurements in the near-IR using an Abbe refractometer, *Meas. Sci. Technol.* 8 (1997) 601. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/8/6/003>.
- [86] Refraktometry na destiláty, pálenky a pivo , (n.d.). <https://www.refraktometr.cz/refraktometry-destilaty-palenyky-pivo> (accessed April 22, 2022).
- [87] The M+1 Peak, (n.d.). [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Mass\\_Spectrometry/The\\_M\\_1\\_Peak](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/The_M_1_Peak) (accessed April 24, 2022).
- [88] Isotopes in Mass Spectrometry , (n.d.). [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Bruice\)/13%3A\\_Mass\\_Spectrometry\\_Infrared\\_Spectroscopy\\_and\\_Ultraviolet\\_Visible\\_Spectroscopy/13.03%3A\\_Isotopes\\_in\\_Mass\\_Spectrometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Bruice)/13%3A_Mass_Spectrometry_Infrared_Spectroscopy_and_Ultraviolet_Visible_Spectroscopy/13.03%3A_Isotopes_in_Mass_Spectrometry) (accessed April 24, 2022).
- [89] Ethanol, (n.d.). <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C64175&Mask=200#Mass-Spec> (accessed April 25, 2022).
- [90] Rxi®-624Sil MS - The “go to” GC column for fast, effective volatile impurities method development, n.d. <https://d1lqgfmy9cwjff.cloudfront.net/csi/pdf/e/rk71.pdf> (accessed April 4, 2022).
- [91] Rxi® -624Sil MS columns - Exceptionally inert, low bleed columns for volatiles analysis, n.d. <https://www.restek.com/globalassets/pdfs/literature/gnbr1334a-unv.pdf> (accessed April 5, 2022).
- [92] Nové GC kolony Rxi®-1301Sil MS, (n.d.). <https://www.chromservis.eu/i/new-rxi-1301sil-ms-columns> (accessed April 5, 2022).
- [93] V. Pacáková, Kapalinová chromatografie v analytické toxikologii , n.d. <https://slideplayer.cz/amp/2523025/> (accessed March 17, 2022).
- [94] T. Bílek, Využití GC a SPME v analýze přírodních látek, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013.
- [95] Grubbs’ test for outliers, (n.d.). <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35h1.htm> (accessed March 10, 2022).
- [96] Vylučování extrémních hodnot souboru , (n.d.). <https://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn2/extremy.htm> (accessed March 16, 2022).
- [97] AlcoDens - Calculations for spirits distillers, (n.d.). <https://www.katmarsoftware.com/alcodens.htm> (accessed May 2, 2022).
- [98] Canadian Alcoholometric Laboratory Table 1996 , (n.d.). <https://www.canada.ca/en/revenue-agency/services/tax/technical-information/excise-act-2001-technical-information/canadian-alcoholometric-laboratory-table-1996.html> (accessed May 2, 2022).
- [99] V. Marešová, Vývoj, optimalizace a validace metod, n.d. [https://soudni.lf1.cuni.cz/file/5702/13\\_AT\\_Optimalizace\\_a\\_validace\\_metody\\_v\\_toxikologii.pdf](https://soudni.lf1.cuni.cz/file/5702/13_AT_Optimalizace_a_validace_metody_v_toxikologii.pdf) (accessed May 3, 2022).
- [100] B. Magnusson, U. Örnemark, The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics, 2.edice, 2014.
- [101] Student’s t-table, (n.d.). [https://www.brockport.edu/academics/tutoring/docs/students\\_t\\_distribution\\_table.pdf](https://www.brockport.edu/academics/tutoring/docs/students_t_distribution_table.pdf) (accessed May 2, 2022).

- [102] T-table, (n.d.). <https://www.sjsu.edu/faculty/gerstman/StatPrimer/t-table.pdf> (accessed May 2, 2022).
- [103] Statistické tabulky - kvantily  $t_{1-\alpha/2}(n)$  Studentova t rozdělení, (n.d.). <https://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/tabulky.htm#ttest> (accessed May 2, 2022).
- [104] J. Kenney, E. Keeping, Confidence limits for the binomial parameter and confidence interval charts, in: *Math. Stat.*, Van Nostrand, 1962.
- [105] R. Boddy, G. (Gordon L. Smith, *Statistical methods in practice : for scientists and technologists*, (2009) 236.
- [106] S.H.C. Toit, A.G.W. Steyn, R.H. Stumpf, *Graphical Exploratory Data Analysis*, (1986) 314.
- [107] Y. Benjamini, Opening the Box of a Boxplot, *Am. Stat.* 42 (1988) 257–262. <https://doi.org/10.2307/2685133>.
- [108] R. McGill, J.W. Tukey, W.A. Larsen, Variations of Box Plots, *Am. Stat.* 32 (1978) 12–16. <https://doi.org/10.2307/2683468>.
- [109] M. Hubert, E. Vandervieren, An adjusted boxplot for skewed distribution, *Comput. Stat. Data Anal.* 52 (2008) 5186–5201. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2007.11.008>.