

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO
TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Vojtěch Valášek

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Izotachoforetické stanovení ethanolu
Vojtěch Valášek

Bakalářská práce
2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vojtěch Valášek**
Osobní číslo: **C15292**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Izotachforetické stanovení ethanolu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte rešerši na téma stanovení alkoholů a glykolů v různých maticích se zvláštním zaměřením na stanovení ethanolu.
2. V experimentální části prozkoumejte možnost izotachforetického stanovení ethanolu

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Martin Bartoš, CSc.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Michaela Kovářová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma „Izotachforetické stanovení ethanolu“ vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Vojtěch Valášek

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu bakalářské práce s názvem Izotachoforetické stanovení ethanolu panu Ing. Martinu Bartošovi, CSc. za spolupráci, odborné vedení, získané nové poznatky, zkušenosti a informace spojené s tvorbou této práce, trpělivost a za pomoc v experimentální části této bakalářské práce. Stejným dílem bych také rád poděkoval své konzultantce slečně Ing. Michaele Kovářové, za výbornou spolupráci a pomoc při experimentální části této práce.

Dále bych také chtěl velice poděkovat své rodině a přátelům za podporu a psychickou pomoc.

ANOTACE

Cílem této bakalářské práce s názvem Izotachoforetické stanovení ethanolu je popis základní charakteristiky a stanovení vybraných alkoholů a glykolů. První část této práce shrnuje charakteristiku alkoholů, popisuje základní fyzikální a chemické vlastnosti vybraných alkoholů a glykolů, jejich přípravu, výrobu, využití, toxicitu a jejich stanovení. V experimentální části je stručně popsána použitá metoda, izotachoforéza, a následuje vývoj izotachoforetické metody pro analýzu ethanolu. Principem metody je oxidace ethanolu na kyselinu octovou, jejíž obsah je následně analyzován pomocí izotachoforézy v aniontovém módu. Za účelem oxidace byla vyzkoušena dvě oxidační činidla – dichroman draselný a manganistan draselný. Jako vhodnější se jevílo použití manganistanu, a proto byl následně použit pro validaci metody a analýzu reálných vzorků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alkoholy, ethanol, izotachoforéza, oxidace, kyselina octová

TITLE

Isotachophoretic determination of ethanol

ANNOTATION

The aim of the bachelor thesis “Isotachophoretic determination of ethanol” is description of basic characteristics and determination of selected alcohols. First part of this thesis summarizes characteristics of alcohols, describes physico-chemical properties of some alcohols and glycols, their production, use, toxicity and determination. In experimental part isotachophoretic analysis is briefly described. Subsequently, development of isotachophoretic method for determination of ethanol is described. Ethanol oxidation to acetic acid, which is analysed by isotachopheresis in anionic mode is the principle of developed method. For oxidation two compounds were tested – potassium dichromate and potassium permanganate. Use of permanganate was better so it was used for validation of method and also for analysis of real samples.

KEYWORDS

Alcohols, Ethanol, Isotachopheresis, Oxidation, Acetic Acid

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
ÚVOD.....	11
1. TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Alkoholy	13
1.1.1 Charakteristika	13
1.1.2 Názvosloví alkoholů	14
1.1.3 Fyzikální a fyziologické vlastnosti alkoholů	15
1.1.4 Chemické vlastnosti alkoholů	16
1.1.5 Reakce alkoholů.....	17
1.2 Ethanol	20
1.2.1 Charakteristika ethanolu	20
1.2.2 Alkoholismus	22
1.2.3 Účinky ethanolu na organismus.....	23
1.2.4 Stanovení ethanolu.....	24
1.3 Methanol	28
1.3.1 Charakteristika methanolu	28
1.3.2 Stanovení methanolu.....	30
1.4 Propanol	35
1.4.1 Charakteristika propanolu	35
1.4.2 Stanovení propanolu	36
1.5 Isopropanol	36
1.5.1 Charakteristika isopropanolu	36
1.5.2 Stanovení isopropanolu.....	37
1.6 Ethylenglykol	38
1.6.1 Charakteristika ethylenglykolu	38
1.6.2 Stanovení ethylenglykolu	39
2 Experimentální část	42
2.1 Izotachoforéza (ITP)	42

2.1.1	Úvod.....	42
2.1.2	Kvalitativní analýza	43
2.1.3	Kvantitativní analýza	43
2.2	Použité chemikálie.....	44
2.3	Příprava elektrolytů.....	44
2.4	Příprava roztoků	45
2.5	Reálné vzorky	46
2.6	Postup oxidace ethanolu v reálných vzorcích.....	47
2.7	Instrumentace	48
2.8	Zpracování dat	49
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
3.1	Oxidace ethanolu na kyselinu octovou	50
3.1.1	Oxidace ethanolu pomocí dichromanu draselného.....	50
3.1.2	Oxidace ethanolu pomocí manganistanu draselného.....	52
3.2	Stanovení parametrů metody.....	54
3.3	Analýza reálných vzorků.....	55
4	ZÁVĚR.....	58
5	PŘÍLOHY	59
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Porovnání teploty varu alkanů a alkoholů [11]	16
Obrázek 2: Reakční schéma nukleofilní substituce halogenem [1]	18
Obrázek 3: Eliminační reakce ethanolu [1].....	18
Obrázek 4: Reakční schéma esterifikace [1]	18
Obrázek 5: Reakční schéma reakce s anorganickými kyselinami [1].....	19
Obrázek 6: Reakční schéma vzniku poloacetalu a acetalu [1]	19
Obrázek 7: Reakční schéma adice alkoholů [1]	20
Obrázek 8: Oxidace alkoholu [1]	20
Obrázek 9: Struktura ethanolu [3].....	21
Obrázek 10: Struktura metanolu [4].....	29
Obrázek 11: Struktura propanolu [5]	35
Obrázek 12: Struktura isopropanolu [6].....	37
Obrázek 13: Struktura ethylenglykolu [7].....	38
Obrázek 14: Skotská whisky Ballantines Finest	46
Obrázek 15: Slovenská Borovička	46
Obrázek 16: Jindřichohradecký Tuzemák.....	46
Obrázek 17: Český Božkov Pepermint	47
Obrázek 18: Mexická sierra Tequila	47
Obrázek 19: Izotachforetický analyzátor	48
Obrázek 20: Analytické váhy	49
Obrázek 21: Pipeta, špička, odměrná baňka	49
Obrázek 22: Oxidace ethanolu dichromanem draselným v kyselém prostředí.....	51
Obrázek 23: Oxidace ethanolu dichromanem draselným v kyselém prostředí ve vroucí vodní lázni.....	51
Obrázek 24: Oxidace ethanolu manganistanem draselným v alkalickém prostředí.....	53
Obrázek 25: Izotachforeogramy vzorku whisky	56
Obrázek 26: Izotachforeogramy vzorku borovičky	56
Obrázek 27: Izotachforeogramy vzorku tuzemáku	56
Obrázek 28: Izotachforeogramy vzorku zelené	57
Obrázek 29: Izotachforeogramy vzorku tequily.....	57

Tabulka 1: Přehled názvosloví vybraných alkoholů [9].....	15
Tabulka 2: Koncentrace ethanolu v krvi a jeho účinek na organismus [2].....	22
Tabulka 3: Příznaky otravy methanolem [4].....	30
Tabulka 4: Použité chemikálie	44
Tabulka 5 : Stanovený a deklarovaný obsah ethanolu ve vzorcích lihovin	55
Tabulka 6: Oxidace ethanolu na kyselinu octovou pomocí dichromanu draselného v kyselém prostředí	59
Tabulka 7: Oxidace ethanolu na kyselinu octovou pomocí manganistanu draselného v alkalickém prostředí.....	59
Tabulka 8: Kalibrační křivka.....	59
Tabulka 9: Reprodukovatelnost metody	60
Tabulka 10: Výtěžnost metody	60
Tabulka 11: Analýza reálných vzorků	60

ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá základními vlastnostmi, účinky a stanovením základních alkoholů a glykolů, se speciálním zaměřením na izotachoforetické stanovení ethanolu.

Alkoholy se řadí mezi základní a nejdůležitější sloučeniny v organické chemii. Alkoholy lze vnímat jako velice univerzální sloučeniny, které mohou být připravovány z několika různých sloučenin. Jsou to deriváty uhlovodíků a jedná se o molekuly, které obsahují hydroxylovou funkční skupinu –OH, která je vázána na atom uhlíku alkylové skupiny. Podle počtu funkčních hydroxylových skupin dělíme alkoholy na primární, sekundární a terciální. [1,2]

V této práci se blíže podíváme na tyto vybrané alkoholy, kterými jsou ethanol, methanol, propanol, isopropanol a také na ethylenglykol. Všechny tyto alkoholy patří mezi primární alkoholy a vyznačují se určitými vlastnostmi. Obecně se jedná o bezbarvé, hořlavé, těkavé, toxické a jedovaté kapaliny charakteristického zápachu. Pro primární alkoholy z hlediska rozpustnosti platí, že jsou neomezeně mísitelné s vodou. Tyto alkoholy se vyznačují dezinfekčními účinky a využívají se převážně jako rozpouštědla. Dále se tyto alkoholy využívají jako konzervační prostředky, k výrobě kosmetických a farmaceutických přípravků, laků, barviv, nemrznoucích směsí, atd.

Nejčastěji jsou do organismu vstřebávány gastrointestinálním traktem, kde dochází k jejich oxidaci, a vyšší dávky těchto alkoholů mají na organismus nežádoucí účinky. Jedná se o sloučeniny, které dráždí oči, horní cesty dýchací, při vysokých koncentracích způsobují nevolnost, bolest hlavy, křeče, zvracení, slabost, a dokonce mohou způsobit určitá onemocnění jater či centrálního nervového systému.

Stanovení těchto alkoholů je nejčastěji prováděno metodou plynové chromatografie, která je označována jako referenční metoda. Dále lze k jejich stanovení použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, hmotnostní spektrometrii, amperometrické stanovení a spektrometrické stanovení.

Ethylenglykol je bezbarvý a toxický viskózní dihydroxyalkohol. Jedná se o čirý, nezapáchající alkohol, který je charakteristický svojí sladkou chutí. Využití ethylenglykolu je poměrně pestré. Používá se jako nemrznoucí směs v chladicích a topných systémech, hydraulických brzdových kapalinách a jako rozpouštědlo. Je součástí kosmetiky, barev a plastů. Roztok ethylenglykolu lze využít pro lékařské účely. Ethylenglykol je pro člověka toxický. [3,4,5,6,7]

Další částí této práce je izotachoforetické stanovení ethanolu. Izotachoforéza je moderní analytická separační metoda, umožňující dělit ionogenní látky v roztocích vlivem elektrického pole na základě jejich rozdílné pohyblivosti na samostatné zóny jednotlivých látek a získat v poměrně krátké době (obvykle v rozmezí 4 až 40 minut) snadno vyhodnotitelné údaje o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku.

V praxi se izotachoforéza využívá například pro analýzu tělních tekutin, léčiv, potravin, složek životního prostředí, zemědělských a průmyslových vzorků. [8]

Experimentální část je zaměřena na izotachoforetické stanovení ethanolu ve vzorcích lihovin. Principem metody je oxidace ethanolu na kyselinu octovou. K tomuto účelu byly použity dva postupy. Prvním byla oxidace ethanolu na kyselinu octovou pomocí dichromanu draselného v kyselém prostředí a druhým oxidace ethanolu na kyselinu octovou pomocí manganistanu draselného v zásaditém prostředí. Druhý způsob se jevil jako lepší varianta, a proto byl použit pro analýzu reálných vzorků.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Alkoholy

1.1.1 Charakteristika

Alkoholy jsou jednou ze základních a nejdůležitějších skupin látek v organické chemii. Jedná se o deriváty uhlovodíků, které obsahují hydroxylovou funkční skupinu –OH, která je vázána na atom uhlíku alkylové skupiny. Alkoholy mohou obsahovat jednu nebo více hydroxylových funkčních skupin.

Alkoholy můžeme dělit podle typu uhlíku na primární, sekundární a terciární, ale taky podle toho, kolik C–C vazeb má uhlíkový atom nesoucí hydroxylovou funkční skupinu –OH.

Primární alkoholy, jsou alkoholy, kde je atom uhlíku nesoucí –OH skupinu připojen pouze k jedné alkylové skupině. Příkladem primárního alkoholu může být ethanol, propan-1-ol. Výjimkou je methanol, který řadíme mezi primární alkoholy, přestože na atom uhlíku nemá připojeny žádné alkylové skupiny.

U sekundárních alkoholů je atom uhlíku s –OH skupinou spojen se dvěma alkylovými skupinami, které mohou být stejné nebo různé. Příkladem sekundárního alkoholu je propan-2-ol, butan-2-ol. U terciárních alkoholů je atom uhlíku s –OH skupinou spojen se třemi alkylovými skupinami s možností jakékoli kombinace stejných nebo odlišných skupin. Příkladem je 2-methylpropan-2-ol.

Dále podle počtu –OH skupin dělíme alkoholy na jednosytné, obsahují jednu –OH skupinu, dvojsytné, obsahují dvě –OH skupiny, trojsytné, které obsahují tři –OH skupiny a vícesytné, obsahující čtyři a více –OH skupin.

Podle uhlovodíkového zbytku dělíme alkoholy na nasycené, které mají pouze jednoduché vazby. Příkladem nasyceného alkoholu je ethanol. Nenasycené alkoholy obsahují alespoň jednu násobnou vazbu. Příkladem je 2-propen-1-ol. Cyklické, obsahující cyklický řetězec, příkladem je cyklohexanol a aromatické, které mají aromatické jádro, příkladem je benzylalkohol. [2,9,10,11]

1.1.2 Názvosloví alkoholů

1.1.2.1 Systematické substituční

Systematické substituční názvosloví alkoholů se tvoří pomocí názvu uhlovodíku, dále se určí poloha skupiny, a nakonec se přidá koncovka –ol (propan-1-ol). U vícesytných alkoholů se používají koncovky –diol (ethandiol), –triol (propan-1,2,3-triol), ... Pokud –OH skupina není hlavní skupinou, používá se předpona hydroxy– a za uhlovodík se připojí koncovka důležitější skupiny (kyselina 2-hydroxypropanová). V názvosloví alkoholů má přednost alkoholová skupina před násobnou vazbou.


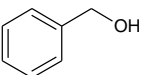
1.1.2.2 Radikálové

Radikálové názvosloví alkoholů se tvoří pomocí názvu uhlovodíkového zbytku, ke kterému se připojí koncovka alkohol (methylalkohol).

1.1.2.3 Triviální

Triviální názvosloví je často používané u vícesytných alkoholů. Jedná se o názvosloví, které většinou nesouvisí s chemickou strukturou dané sloučeniny, ale je například dáno historicky. Cílem triviálního názvosloví je zjednodušení pojmenování složitých sloučenin. Příkladem je dřevný líh, líh, ethylenglykol, glycerol či sorbitol. [1,9,11,12]

Tabulka 1: Přehled názvosloví vybraných alkoholů [9]

Vzorec	Substituční	Radikálové	Triviální
CH ₃ OH	methanol	methylalkohol	dřevný líh
CH ₃ CH ₂ OH	ethanol	ethylalkohol	líh
CH ₂ =CH-CH ₂ OH	prop-2-en-1-ol	2-propenyl alkohol	allylalkohol
HO-CH ₂ CH ₂ -OH	ethan-1,2-diol	-	glykol (ethylenglykol)
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	propan-1,2,3-triol	-	glycerol (glycerin)
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	hexan-1,2,3,4,5,6-hexaol	-	sorbitol (sorbit D-glucitol)
$\begin{array}{c} \text{HOH}_2\text{C} \quad \text{CH}_2\text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \diagdown \\ \text{HOH}_2\text{C} \quad \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	bis (hydroxymethyl) propan-1,3-diol	-	pentaerythritol
	cyklohexanol	cyklohexylalkohol	-
	fenylmethanol	benzylalkohol	-

1.1.3 Fyzikální a fyziologické vlastnosti alkoholů

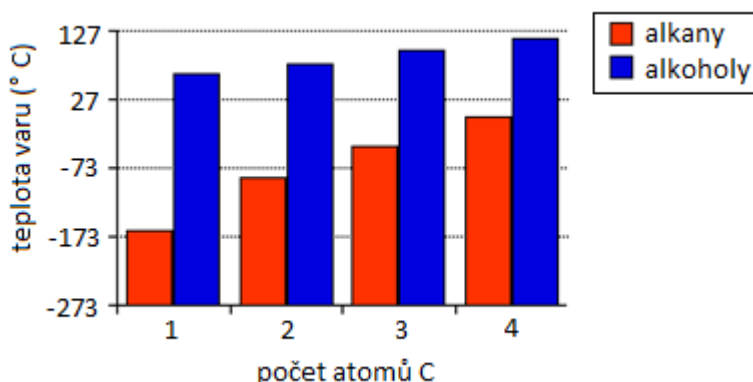
Alkoholy vytvářejí homologickou řadu. Prvních dvanáct členů této homologické řady alkoholů, neboli tzv. lineární alifatické alkoholy C₁ až C₁₂, jsou kapaliny, zbylé alkoholy jsou pevné látky. Teplota varu těchto alkoholů je vždy výrazně vyšší než teplota varu příslušného (analogického) uhlovodíku (viz obrázek 1) a jejich hustota je menší než hustota vody. Zvýšení bodu varu je u alkoholů způsobeno přítomností vodíkových vazeb mezi jednotlivými molekulami alkoholu. S rostoucím počtem atomů uhlíku se teplota varu alkoholů zvyšuje. Na rozdíl od uhlovodíků jsou alkoholy méně těkavé látky. Alkoholy mezi molekulami pozitivního vodíku a negativního kyslíku vytváří vodíkové vazby. Vodíkové vazby nejsou jedinou intermolekulární silou u alkoholů. Vedle vodíkových vazeb můžeme u alkoholů pozorovat van der Waalsovy disperzní síly a interakce dipól–dipól. Vodíkové vazby a interakce dipól–dipól jsou stejné pro všechny alkoholy. Van der Waalsovy

síly se zvyšují s rostoucími počtem uhlíků, což má za následek zvyšující se teplotu varu s nárůstem počtu atomů uhlíku v molekule.

Methanol, ethanol, propanol a 2-methylpropan-2-ol jsou alkoholy, které jsou neomezeně mísitelné s vodou a jsou ve vodě zcela rozpustné. Tato vlastnost je způsobena polaritou hydroxylové vazby –OH a existencí vodíkových můstků, které se vyskytují jak mezi samotnými molekulami alkoholů, tak mezi molekulami alkoholů a molekulami vody. Vyšší alkoholy jsou ve vodě rozpustné jen omezeně nebo vůbec.

S rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce začíná postupně v molekule převažovat nepolární část molekuly a vodíkové vazby jsou řídkěji zastoupeny. Tato skutečnost vede k omezení rozpustnosti dalších alkoholů ve vodě a dochází k posílení rozpustnosti v nepolárních rozpouštědlech, např. v cyklohexanu, chloroformu a dalších.

Alkoholy mají polární charakter a používají se jako polární rozpouštědla. Všechny alkoholy jsou bezbarvé sloučeniny, které mají nižší hustotu než voda. Mnohé alkoholy mají narkotické účinky a jsou jedovaté. Methanol je pro lidský organismus velice toxický, u vyšších alkoholů se toxicita postupně snižuje. Alkoholy s větším počtem hydroxyskupin (glycerol, sorbitol) mají sladkou chuť. [1,10,11,12,13]



Obrázek 1: Porovnání teploty varu alkanů a alkoholů [11]

1.1.4 Chemické vlastnosti alkoholů

1.1.4.1 Reaktivita alkoholů

U alkoholů mohou probíhat jak reakce na hydroxylové funkční skupině –OH, tak i reakce spojené se štěpením vazby mezi uhlíkem a kyslíkem neboli C–O vazby, případně vazby mezi uhlíkem a vodíkem, neboli C–H vazby. Účinkem silných bází na alkoholy dochází k tomu, že tyto silné báze atakují vodík hydroxylové skupiny a převádějí alkoholy na alkoholáty. Účinkem elektrofilů, zejména protonů, může docházet k reakcím na atomu

kyslíku, na kterém se nacházejí volné elektronové páry, za vzniku oxoniových solí. Oxoniové soli mohou být stabilní nebo mohou podléhat nukleofilní substituci a eliminaci. [1,12,14]

1.1.4.2 Acidobazické vlastnosti alkoholů

V důsledku rozdílné elektronegativity kyslíku a vodíku je vazba mezi kyslíkem a vodíkem, neboli O–H vazba, polarizovaná. Působením silných bází dochází k odštěpení protonu a vzniklým produktem je alkoholát. Alkoholy se tedy chovají jako kyseliny, jejichž sílu můžeme kvantifikovat pomocí hodnot disociačních konstant pK_a . Hodnota pK_a nesubstituovaných alkoholů je okolo 17, jedná se tedy o velmi slabé kyseliny. Nízká acidita alkoholů je způsobena destabilizací alkoholátového aniontu +I efektem alkylskupiny.

Alkoholáty se připravují reakcí alkoholu s kovem, například sodíkem, hořčíkem, nebo reakcí s jinou velmi silnou bází. Přítomnost volných elektronových párů na kyslíku na druhou stranu umožňuje i navázání elektrofilu, kterým je nejčastěji proton. Alkoholy se tím mohou vůči silným kyselinám chovat jako velmi slabé báze. [1,12,14]

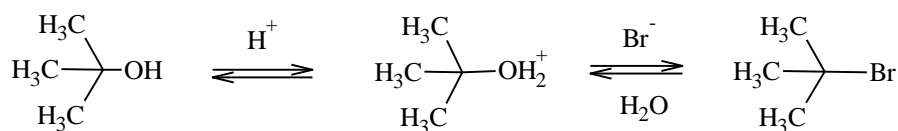
1.1.5 Reakce alkoholů

1.1.5.1 Nukleofilní substituce a eliminace hydroxylové skupiny

Samotná hydroxylová skupina je velmi špatnou odstupující skupinou. Proto samotné alkoholy nejsou schopny podléhat ani nukleofilní substituci ani eliminaci. Pokud ovšem převedeme reakci s protonem alkohol na jeho konjugovanou kyselinu, poté se odstupující skupinou stává voda, která patří mezi velmi dobře odstupující skupiny, a nukleofilní substituce a eliminace probíhají velmi snadno. Další možností je použití Lewisovy kyseliny (např. $ZnCl_2$, $CaCl_2$), která se podobně jako proton koordinuje na kyslík a tím zlepšuje nukleofugacitu. [1]

1.1.5.1.1 Nukleofilní substituce halogenem

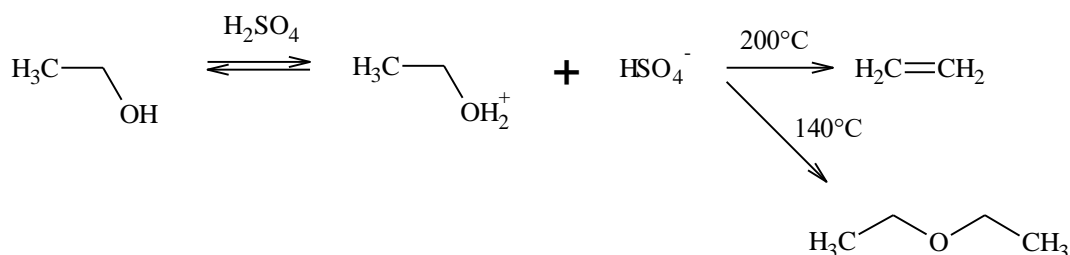
Halogenvodíky jsou v alkoholech úplně disociovány na proton a halogenidový aniont. Jako velmi silné kyseliny protonují alkohol na alkyloxonium, které v dalším kroku podléhá nukleofilní reakci s halogenidovým aniontem. Reakce probíhá snadno u terciálních alkoholů (mechanisme S_{N1}), u sekundárních alkoholů je nutný přídavek Lewisovy kyseliny a u primárních alkoholů je tato reakce velmi pomalá (mechanismus S_{N2}). [1,14]



Obrázek 2: Reakční schéma nukleofilní substituce halogenem [1]

1.1.5.1.2 Eliminační reakce

Reakcí alkoholů, které mají na sousedním atomu uhlíku alespoň jeden vodík, s kyselinami, jejichž anionty nemají nukleofilní charakter (kyselina sírová, kyselina fosforečná), vzniká při zahřívání odpovídající dialkylether nebo alken. [1]



Obrázek 3: Eliminační reakce ethanolu [1]

1.1.5.2 Nukleofilní reakce hydroxylové skupiny

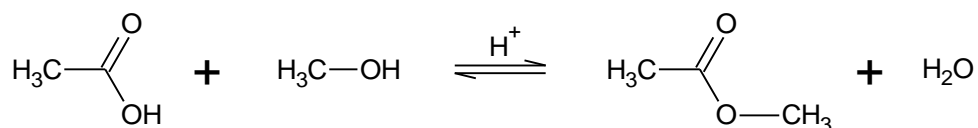
Alkoholy jsou chemické sloučeniny schopné poskytovat alkoholáty, které jsou velmi dobrými nukleofily. [1]

1.1.5.3 Reakce s halogenderiváty

Reakcí alkoholátů s halogenderiváty vznikají alifatické, aromatické nebo smíšené ethery. Mechanismus této reakce se řídí povahou uhlíkatého skeletu halogenderivátu a je buď $\text{S}_{\text{N}1}$ nebo $\text{S}_{\text{N}2}$. Tato reakce má velkou syntetickou důležitost a nazývá se Williamsonova syntéza etherů. [1]

1.1.5.4 Reakce s karboxylovými kyselinami

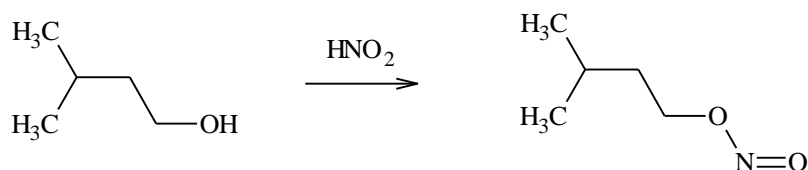
Alkoholy za kyselých katalýz reagují s karboxylovými kyselinami za vzniku esterů. [1,14]



Obrázek 4: Reakční schéma esterifikace [1]

1.1.5.5 Reakce s anorganickými kyselinami

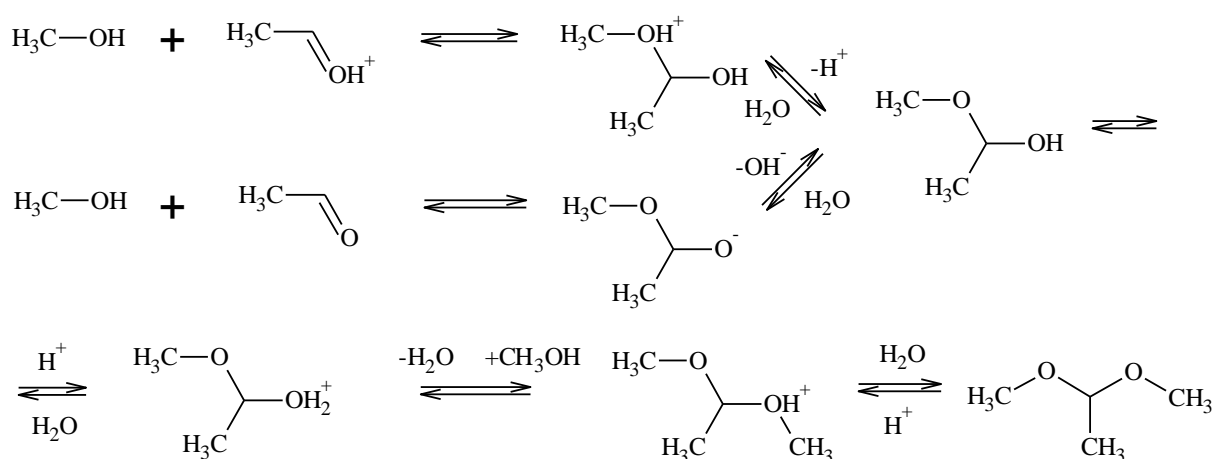
Alkoholy reagují s anorganickými kyselinami za vzniku esterů. [1]



Obrázek 5: Reakční schéma reakce s anorganickými kyselinami [1]

1.1.5.6 Reakce s aldehydy a ketony

Alkoholy reagují s karbonylovými sloučeninami za kyselé nebo bazické katalýzy na poloacetal, které v případě kyselé katalýzy dále poskytují acetal. Podle typu katalýzy dochází buď k nukleofilní adici alkoholu na protonovanou karbonylovou sloučeninu nebo alkoholátu na karbonylovou sloučeninu.



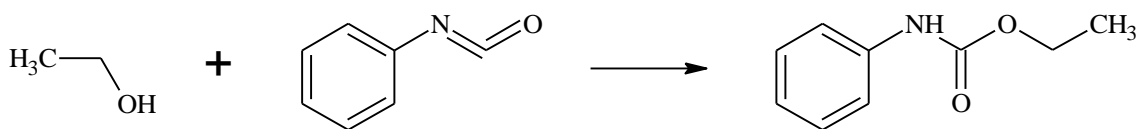
Obrázek 6: Reakční schéma vzniku poloacetalu a acetalu [1]

V kyselém prostředí je tato reakce vratná a slouží k tzv. ochraně karbonylové funkční skupiny. V bazickém prostředí jsou acetaly stabilní. [1]

1.1.5.7 Adice alkoholů na násobné vazby

Adice alkoholů na dvojnou i trojnou vazbu je prováděna na principu adice elektrofilní.

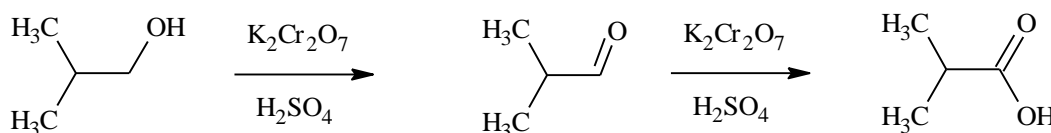
[1]



Obrázek 7: Reakční schéma adice alkoholů [1]

1.1.5.8 Oxidace alkoholů

Oxidace alkoholů probíhá účinkem oxidačních činidel. Těmito oxidačními činidlo jsou kyselina chromová, manganistan draselný, dichroman draselný a oxid chromový. Nejsnáze se oxidují alkoholy primární. Primární alkoholy se oxidují účinkem oxidačních činidel na aldehydy, které jsou poté ještě snáze oxidovatelné na karboxylové kyseliny. Sekundární alkoholy se za stejných podmínek oxidují na ketony a terciální alkoholy se těmito oxidačními činidly oxidovat nedají.



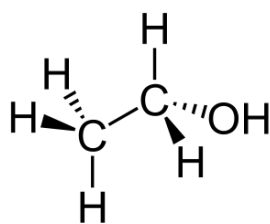
Obrázek 8: Oxidace alkoholu [1]

Další možností je biologická oxidace alkoholů účinkem různých enzymů za přesně definovaných podmínek. Enzymy katalyzující oxidaci alkoholů jsou alkohol a aldehyddehydrogenáza. [1,12,14]

1.2 Ethanol

1.2.1 Charakteristika ethanolu

Ethanol neboli také ethylalkohol je chemická sloučenina patřící mezi primární alkoholy, obsahující funkční hydroxylovou skupinu –OH. Jedná se o dvouuhlíkatý alkohol. Ethanol je chemická sloučenina o molekulární hmotnosti 46,069 g/mol. Chemický vzorec ethanolu je $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ nebo $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$. Ethanol je také obecně zapisován ve zkrácené podobě EtOH. Bod varu ethanolu je $78\text{ }^\circ\text{C}$ a bod tání $-114\text{ }^\circ\text{C}$. Hustota je 0,79 g/ml a hodnota pK_a odpovídá 15,9. [3]



Obrázek 9: *Struktura ethanolu [3]*

Ethanol je čirá bezbarvá tekutina s charakteristickou vůní či slabým éterickým zápachem po víně a pálivou chutí, která se poměrně dobře a rychle vstřebává z gastrointestinálního traktu a poté se rozptýluje po celém organismu. Ethanol je neomezeně mísitelný s vodou. Jedná se o těkavou a hořlavou kapalinu, která hoří modrým plamenem. Má baktericidní aktivitu a často se používá jako hlavní dezinfekční přípravek. Ethanol má široké uplatnění jako rozpouštědlo, dezinfekční prostředek a konzervační prostředek ve farmaceutických přípravcích a slouží také jako primární složka alkoholických nápojů. Ethanol se rozsáhle používá jako rozpouštědlo vůní, barviv, léků a aromátů. Ethanol může být podáván jako protilátka při otravě organismu methanolem. Ethanol se používá také jako palivo či jako přídatná látka v kosmetice. Nejznámějším použitím ethanolu je výroba alkoholických nápojů. Alkoholické nápoje dělíme na fermentované, kterými jsou například pivo, víno, medovina, cider atd., a destilované, kterými jsou například vodka, whisky, rum atd.

Ethanol má depresivní a negativní účinek na centrální nervový systém a vzhledem k jeho psychoaktivnímu účinku na organismus je považován za drogu. Ethanol ovlivňuje několik mozkových systémů a jako agonista nejvíce působí na receptory kyseliny γ -aminomáselné (GABA), glycinu a kyseliny N-methyl-D-asparagové (NMDA).

Nadměrnou konzumací ethanolu může dojít k usmrcení organismu, a to v případě, když hladina ethanolu v krvi je vyšší než 0,5 %. Nižší hladina ethanolu v krvi může způsobit intoxikaci a bezvědomí. Ethanol také inhibuje tvorbu antidiuretického (ADH) hormonu, čím dochází k diuréze, která může končit dehydratací organismu. Ethanol se může vstřebávat do těla samotnou konzumací, dále vdechnutím par, pokožkou či kontaktem s očima. Může způsobit podráždění očí, vysychání kůže, bolesti hlavy, ospalost a únavu, závratě, bezvědomí či poškození jater. Cílovými orgány účinku ethanolu jsou játra, centrální nervový systém, dýchací ústrojí, oči, kůže, reprodukční orgány a krev. [2,3,12,13,15]

Tabulka 2: Koncentrace ethanolu v krvi a jeho účinek na organismus [2]

Koncentrace ethanolu v krvi (v % objemu)	Účinek
0,05	Uklidňující, příjemný
0,10	Ztráta koordinace
0,15	Otrava
0,30	Bezvědomí
0,50	Nebezpečí smrti

Ethanol se podílí na několika reakcích. Za přítomnosti kyselých katalyzátorů reaguje ethanol s karboxylovými kyselinami za vzniku esteru a vody. Další reakcí ethanolu je dehydratace, halogenace či spalování až na oxid uhličitý a vodu. Významnou reakcí je oxidace ethanolu na aldehyd (acetaldehyd) a následná oxidace až na karboxylovou kyselinu (kyselinu octovou). Oxidace ethanolu je prováděna pomocí oxidačních činidel, kterými jsou například dichroman, manganistan či oxid chromový.

Ethanol, který vstupuje do těla, je z 90 % až 98 % oxidován. Oxidace ethanolu v organismu je prováděna převážně v játrech pomocí dvou enzymů, kterými jsou alkoholdehydrogenáza a acetaldehyddehydrogenáza. Nejprve je ethanol účinkem alkoholdehydrogenázy přeměněn na acetaldehyd, který je dále pomocí acetaldehyddehydrogenázy oxidován na kyselinu octovou. Malé množství ethanolu je vylučováno močí, potem a dechem.

Z hlediska toxicity je acetaldehyd toxičtější než samotný ethanol. Acetaldehyd je spojen s většinou klinických účinků alkoholu na lidský organismus a bylo prokázáno, že výrazně zvyšuje riziko vzniku cirhózy jater, rakoviny a alkoholismu. Nadměrná konzumace ethanolu může způsobit vznik závislosti na této látce.

Průmyslově se ethanol vyrábí pomocí hydratace ethylenu. Pro účely potravinářského průmyslu je ethanol z největší části vyráběn biologicky fermentací jednoduchých sacharidů (cukrů) kvasinkami. Kvasinky metabolizují sacharidy za produkce ethanolu a oxidu uhličitého. [3]

1.2.2 Alkoholismus

Ethanol je nejrozšířenější a nejčastěji užívanou psychoaktivní látkou v České republice. Jelikož se jedná o psychoaktivní látku, může při opakované konzumaci ethanolu u daného jedince vzniknout závislost. Nadměrná konzumace ethanolu může mít negativní následky na zdraví a život organismu daného jedince.

Termínem alkoholismus se rozumí chronické onemocnění organismu způsobené jakoukoli konzumací ethanolu, která způsobuje duševní nebo zdravotní komplikace organismu. Obecně je alkoholismus chápán jako závislost daného organismu na konzumaci ethanolu ve formě alkoholických nápojů. Příčiny závislosti mohou být genetické, biologické, psychické a sociální. Nadměrná konzumace ethanolu významně ovlivňuje zdraví organismu. Konzumace ethanolu má nejvíce negativní účinky na mozek, srdce, játra, slinivku břišní a imunitní systém a může být příčinou řady dalších nemocí.

Více náchylnou sociální skupinou, vůči účinkům ethanolu jsou ženy, děti a dospívající než dospělý muži. V rámci alkoholismu rozlišujeme čtyři stádia:

1. stádium – počáteční, prealkoholické: zvýšená konzumace ethanolu
2. stádium – prodromální, varovné: zvýšená tolerance organismu na ethanol
3. stádium – krucióální, rozhodné: ztráta kontroly nad konzumací ethanolu
4. stádium – terminální, konečné: závislost

1.2.3 Účinky ethanolu na organismus

1.2.3.1 Krátkodobé účinky

Krátkodobé užití ethanolu může navodit pocity štěstí, euforii, zvýšenou sebedůvěru, snížení úzkosti. Dále způsobuje problémy s koordinací, rovnováhou, rozmazané vidění, nevolnosti, závratě, bezvědomí až koma. Následkem nadměrné konzumace ethanolu může být smrtelná otrava ethanolem.

1.2.3.2 Dlouhodobé účinky

Dlouhodobou konzumací ethanolu dochází ke zvýšení rizika srdečních onemocnění, vysokého krevního tlaku nebo mrtvice. Dalšími důsledky dlouhodobé konzumace může být cirhóza jater, pankreatitida, epilepsie, alkoholická demence, poškození centrálního i periferního nervového systému a rozvoj rakoviny.

Konzumací ethanolu dochází obecně ke zkrácení života o deset let. Nejčastější příčinou úmrtí alkoholiků je kardiovaskulární onemocnění. Alkoholová závislost je také příčinou častých sebevražd či sebevražedných sklonů daného jedince trpícího touto závislostí. Ethanol dále velmi ovlivňuje správnou funkci mozku. [16,17,18,19]

1.2.3.3 Vliv Ethanolu na vývoj plodu

Ethanol lze považovat za toxickou látku, která může mít za následek poškození vajíčka i spermií před samotným početím, ale také narušení vývoje embrya. Pokud dochází ke konzumaci ethanolu během těhotenství, mezi hlavní rizika patří opožděný duševní vývoj, pomalý růst a poškození mozku u plodu. Konzumace ethanolu může mít dále za následek nitroděložní odumření plodu a může vyvolat nejrůznější deformace plodu v podobě narušení fyzického vývoje plodu až po poškození mozku a srdce. Konzumace ethanolu během těhotenství může mít za následek genetickou předurčenost dítěte k alkoholismu.

Nejtěžším projevem konzumace ethanolu v prenatálním období je fetální alkoholický syndrom, který je příčinou retardace a různých defektů u novorozenců. Konzumace ethanolu v tomto období může způsobit také usmrcení plodu. Fetální alkoholický syndrom lze charakterizovat pomocí znaků, kterými jsou abnormální obličejové rysy, opožděný růst a poruchy nervového systému a vývoje. [19,20,21]

1.2.4 Stanovení ethanolu

Ethanol patří mezi základní, velmi rozšířené a studované chemické sloučeniny. Jelikož je ethanol primární složkou alkoholických nápojů, je jeho analýza velmi rozšířená. Základními metodami sloužícími ke stanovení ethanolu jsou plynová chromatografie, která je zároveň využívána jako referenční metoda pro stanovení ethanolu, dále vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, elektrochemická stanovení a spektrometrie. [3,22,23,24,25]

1.2.4.1 Chromatografické metody

1.2.4.1.1 Plynová chromatografie

Mead a kol. vytvořili metodu plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (GC-MS/MS) pro stanovení ethanolu, iso-buthanolu a n-buthanolu ve vzorcích vod. Vzorky vod byly umístěny do skleněných vialek pro head-space analýzu obsahujících chlorid sodný a magnetické míchadlo. Chlorid sodný byl přidáván kvůli snížení rozpustnosti ethanolu ve vodě. Separace byla prováděna na třicetimetrové koloně s vnitřním průměrem 0,25 mm a 1,4 μm filmem stacionární fáze. Po separaci byla provedena elektronová ionizace a vzniklé ionty byly detekovány pomocí dvojitého kvadrupólového analyzátoru. Detekční limit pro obsah ethanolu byl 28 nmol/l a pro iso- a n-butanol 9 nmol/l. [23]

Stanovení vybraných látek v různých stádiích kvasného procesu medoviny:

Pomocí této metody bylo provedeno stanovení ethanolu, sacharidů a 5-hydroxymethylfurfuralu v různých stádiích kvasného procesu medoviny pomocí separačních technik. Obsah ethanolu byl stanoven pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Pro stanovení sacharidů byla využita kapalinová chromatografie ve spojení s refraktometrickým detektorem a pro stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu micelární elektrokinetická kapilární chromatografie. Tyto látky byly analyzovány během kvašení u tří medovin získaných od včelařů. Vzorky jednotlivých medovin byly odebírány přibližně každý druhý den v průběhu kvašení. [26]

1.2.4.1.2 Kapalinová chromatografie

Morine Avila a kol. stanovili pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí obsah ethanolu ve vzorcích benzínů. K tomuto účelu použili kolonu AcclaimTM dlouhou 25 cm o vnitřním průměru 4,6 mm, kde jako stacionární fáze byl použit oktadecylsilan. Jako mobilní fáze sloužil ultračistý methanol. Celá analýza trvala 15 minut. [25]

1.2.4.2 Elektrochemické metody

Barhoumi a kol. vytvořili nový amperometrický biosenzor pro stanovení ethanolu. Měření koncentrace ethanolu je založeno na produkci redukované formy nikotinamidadeninukleotidu (NADH), který je produktem enzymatické reakce katalyzované alkoholdehydrogenázou. Enzym byl imobilizován na uhlíkových nanotrubicích potažených polystyrensulfonátovou vrstvou. Enzymatická oxidace ethanolu byla provedena v přítomnosti NAD^+ a amperometricky byl stanoven obsah vzniklého nikotinamidadeninukleotidu (NADH). Stanovení ethanolu bylo provedeno ve fosfátovém pufru o pH 8,8 za použití 7 IU alkoholdehydrogenázy v přítomnosti 5mM NAD^+ . Touto metodou bylo dosaženo detekčního limitu 19 $\mu\text{mol/l}$. [27]

Kumar a kol. stanovili obsah alkoholu pomocí oxidace na elektrodě ze skelného uhlíku modifikované paladiem. Průmyslové nanočástice palladia byly přichyceny na nanopláty grafenu za účelem výroby levného, neenzymatického ethanolového čidla. Pro kvantifikaci ethanolu v alkalických médiích byla použita cyklická voltametrie a chronoamperometrie. Skleněná uhlíková elektroda modifikovaná paládiem poskytla detekční limit 2 mmol/l

ethanolu. Elektroda vykazovala vynikající stabilitu pro 100 cyklických voltametrických skenů. [28]

Polan a kol. vyvinuli biosenzor na bázi alkohol dehydrogenázy, který byl testován pro stanovení ethanolu ve vzorku piva. Biosenzor je založen na sítotiskové uhlíkové elektrodě (SPCE) modifikované oxidem rhodia s imobilizovanou biokatalytickou vrstvou obsahující enzym. Funkce enzymatického biosenzoru byla testována na modelových vzorcích ethanolu, ve kterých byl určen detekční limit pro ethanol 3,3 g/l. Následně byl biosenzor použit pro analýzu různých druhů českých piv, kdy v případě světlých ležáků byly výsledky srovnatelné s plynovou chromatografií. Ve vzorcích tmavých ležáků byl stanoven vyšší obsah ethanolu než pomocí plynové chromatografie. [29]

Angeloni a kol. vyvinuli dvě různé enzymové elektrody pro stanovení ethanolu v alkoholických nápojích. Elektrody byly vytvořeny imobilizací alkoholoxidasy či alkoholkatalázy v k-karagenanové gelové vrstvě překrývající Clarkovu kyslíkovou elektrodu. Biosenzor na bázi katalasy se jevil jako vhodnější vzhledem k větší selektivitě vůči ethanolu. Odpověď katalázového biosenzoru nebyla ovlivněna přítomností methanolu a jeho provozní stabilita byla výrazně vyšší než u senzoru s alkohol-oxidase. Jediná nevýhoda spojená s používáním katalázového biosenzoru v porovnání s metodou založenou na alkohol-oxidase je mírně prodloužený čas potřebný pro provedení analýzy u každého vzorku alkoholického nápoje. [30]

Wen a kol. vyvinuli mikrobiální biosenzor pro stanovení ethanolu. Mikrobiální biosenzor se skládá z imobilizované bakterie *Methylobacterium organophilum* na podskořápečné bláně a kyslíkové elektrody. Mikrobiální biosenzor má detekční limit pro ethanol roven 0,025 mmol/l. Optimální pracovní podmínky pro mikrobiální biosenzor jsou pH 7,0 fosfátového pufru (50 mM) při 20-25 °C. Biosenzor byl testován na vzorcích alkoholických nápojů a poskytl srovnatelné výsledky s plynovou chromatografií. [31]

Pereira a kol. vyvinuli voltametrickou metodu ke stanovení ethanolu a methanolu v palivovém ethanolu. K tomuto účelu použili cyklickou voltametrii na zlaté elektrodě. Do elektrochemické cely, která obsahovala elektrolyt složený z 0,5 mol/l NaOH a 0,1 % obj. methanolu, byl přidán určitý podíl palivového ethanolu. Oba analyty byly následně stanoveny pomocí cyklické voltametrie. Ethanol byl selektivně detekován při +0,19 V a suma obou byla detekována při +1,20 V. Meze detekce byly stanoveny na 0,028 % obj. pro ethanol a 0,045 % obj. pro methanol. [32]

Sehovcová připravila biosenzor s alkoholdehydrogenázou a oxidem platičitým a dále biosenzor s alkoholdehydrogenázou a oxidem rutheničitým pro stanovení ethanolu. Srovnání

ukázalo, že biosenzory připravené s modifikací oxidem platičitým jsou citlivější, mají až třikrát vyšší odezvu. U obou biosenzorů byly proměřeny kalibrační křivky a bylo zjištěno, že biosenzor s oxidem rutheničitým je schopen detekovat 1% koncentraci ethanolu, zatímco biosenzor s oxidem platičitým již koncentraci 0,05 % ethanolu. Biosenzory byly ozkoušeny na reálných vzorcích alkoholických nápojů a bylo zjištěno, že jsou vhodné pro jejich analýzu. [33]

1.2.4.3 Spektrometrické metody

Fortunato a kol. vypracovali metodu pro stanovení ethanolu v benzínu pomocí průtokového systému, který využívá extrakci kapalina-kapalina a detekci pomocí Ramanovy spektrometrie při vlnové délce 785 nm. Tato metoda byla použita pro komerční vzorky benzínu a výsledky byly porovnány s hodnotami získanými pomocí referenční metody. V rámci porovnání obou metod nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. [34]

Zuriarrain a kol. provedli analýzu ethanolu v cideru pomocí protonové nukleární magnetické rezonance ^1H NMR. Ethanol ve spektru poskytl tripletový signál při 1,18 ppm a jeho plocha byla použita pro stanovení jeho koncentrace. K jablečnému moštu byla přidána sodná sůl 3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3-d(4)-propionové kyseliny, která měla dvojí účel: sloužila jako referenční hodnota pro 0,00 ppm a také jako vnitřní standard. Výsledky získané touto metodou byly porovnány s výsledky získanými plynovou chromatografií. Bylo zjištěno, že obě metody poskytují shodné výsledky. Tato metoda se vyznačuje především svou rychlostí a jednoduchostí. [35]

Choengchan a kol. předložili nový model bezmembránové plynové difúzní jednotky s duálním akceptorovým kanálem pro separaci, sběr a simultánní stanovení dvou těkavých analytů v kapalných vzorcích. Jednotka se skládá ze tří paralelních kanálů, které se nachází v uzavřeném modulu. Samotný vzorek je odsáván do centrálního kanálu a do zbylých dvou kanálů se zavádí dva různé druhy činidel. Dva analyty jsou izolovány z matrice vzorku difúzí do hlavního prostoru a jsou absorbovány do specifických činidel. Neabsorbovaná pára se uvolňuje otevřením programovatelného víka. Jednotka byla aplikována na kapaliny obsahující ethanol a acetaldehyd s použitím reverzní průtokové analýzy. Jako činidla pro kolorimetrickou detekci ethanolu a acetaldehydu byly použity dichroman a nitroprusid. Výsledky této metody byly porovnány s výsledky získanými pomocí metody plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID). Mezi jednotlivými výsledky těchto metod nebyl pozorován žádný významný rozdíl. [36]

Pinyou a kol. vyvinuli průtokovou kolorimetrickou metodu pro stanovení ethanolu. K tomuto účelu využili reakci ethanolu s dusičnanem ceričitoamonným za vzniku intenzivně červeně zbarveného komplexu, jehož intenzita zbarvení byla následně proměřena při vlnové délce 415 nm. S takto vytvořeným systémem lze dosáhnout detekčního limitu 0,03 % obj. Vytvořená metoda byla odzkoušena na vzorcích několika alkoholických nápojů. [37]

1.2.4.4 Pyknometrické stanovení ethanolu

V této metodě stanovení je ethanol vydestilován ze vzorku a pyknometricky je stanovena měrná hmotnost destilátu. Metoda je využívána pro stanovení ethanolu v destilátech, ve víně a také lze tuto metodu využít pro stanovení ethanolu v různých výrobcích potravinářského průmyslu.

50 ml neutrálního vzorku nebo vzorku po zmýdelnění bylo odměřeno do destilační baňky a bylo přidáno 20 ml vody. Vzorky, které obsahovaly více než 15 % ethanolu bylo nutno před destilací dvojnásobně zředit, u pevných vzorků bylo podle obsahu ethanolu naváženo 50 – 100 g a bylo přidáno 250 ml vody, ke vzorkům, které při destilaci pěnilo bylo přidáno několik kapek oleje, popřípadě malé množství taninu a skleněných korálků a u vzorků, u kterých hrozilo nebezpečí připékání ke dnu destilační baňky, bylo výhodnější provádět destilaci s vodní parou.

U stanovení kapalného vzorku bylo destilováno, po sestavení destilačního přístroje, přímo do pyknometru, který obsahoval několik mililitrů vody, po nadezilování asi tři čtvrtin objemu byl pyknometr doplněn vodou, poté byl vytemperován při 20 °C a nakonec byl zvážen.

V případě pevného materiálu bylo vydestilováno asi 150 ml destilátu do předlohy, která obsahovala asi 10 ml vody, destilát byl poté slabě zalkalizován a znovu predestilován do pyknometru.

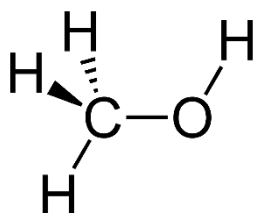
K vypočtené hodnotě měrné hmotnosti destilátu bylo vyhledáno hmotnostní procento ethanolu v destilátu a bylo přepočteno na procentové množství v původním vzorku. [22]

1.3 Methanol

1.3.1 Charakteristika methanolu

Methanol neboli také methylalkohol je chemická sloučenina patřící mezi primární alkoholy, obsahující funkční hydroxylovou skupinu –OH. Triviální název methanolu

je dřevný líh. Methanol je nejjednodušší jednosytný alkohol a jedná se o jednouhlíkatý alkohol. Methanol je alkohol o molekulární hmotnosti 32,042 g/mol. Chemický vzorec methanolu je CH₃OH nebo také CH₄O. Methanol lze také zapsat ve zkrácené podobě MetOH. Bod varu methanolu je 64,7 °C a bod tání -97,7 °C. Hustota methanolu je 0,791 g/cm³, hodnota pK_a 15,3 a index lomu je 1,33141. Methanol je chemická sloučenina, která je stejně jako ethanol neomezeně mísitelná s vodou a vlastnosti methanolu jsou ovlivněny přítomností funkční hydroxylové skupiny. [4]



Obrázek 10: Struktura metanolu [4]

Metanol je bezbarvá, hořlavá, lehká a toxická kapalina charakteristické chuti a zápachu, méně výrazného než v případě ethanolu. Methanol se oproti ethanolu vyznačuje mírnějším, štiplavým a sladším zápachem. Methanol se používá při výrobě formaldehydu, kyseliny mravenčí a různých methylesterů. Dále se využívá jako meziprodukt v chemické syntéze, je součástí nemrznoucích směsí a také se používá jako rozpouštědlo a konzervační prostředek či jako palivo. Vyrábí se ze syntézního plynu. [2,4,12,13,15,38]

Nadměrné požití methanolu může mít za následek sebevraždné myšlenky, může způsobit otravy, které mohou končit smrtí či trvalými následky na zdraví jedince. Toxicita methanolu je způsobena metabolickými produkty, kterými jsou formaldehyd a kyselina mravenčí. Rychlá a přesná diagnóza toxické otravy methanolem má zásadní význam pro samotnou prevenci a léčbu otravy a závažných nežádoucích účinků. Letální dávka methanolu v nepřítomnosti léčby je mezi 0,3 až 1 g/kg.

Methanol může být absorbován do organismu inhalací par, kůží či samotným požitím. Methanol se snadno vstřebává z gastrointestinálního traktu a dýchacích cest daného organismu.

Metabolismus methanolu probíhá ve třístupňovém procesu. V první fázi metabolismu methanolu dochází k oxidaci methanolu na formaldehyd pomocí jaterního enzymu alkoholdehydrogenázy. Ve druhém kroku je formaldehyd dále oxidován enzymem aldehyddehydrogenázou na kyselinu mravenčí. Ve třetím a posledním kroku je kyselina mravenčí detoxikována na oxid uhličitý a vodu. Odstranění methanolu z organismu

je na rozdíl od ethanolu pomalé. U lidí je koncentrace methanolu v moči přímo úměrná koncentraci methanolu v krvi.

Zvýšené vystavení organismu výparům methanolu či jeho nadměrná konzumace může způsobit podráždění očí, rozmazané vidění, únavu, bolesti hlavy, závratě, nevolnost a ospalost. Vysoké koncentrace mohou způsobit depresi centrálního nervového systému a poškození zrakového nervu, dokonce mohou vést až ke smrti organismu.

Při otravě organismu methanolem je léčba prováděna pomocí ethanolu, fomepizolu, kyseliny listové či hemodialýzy. [4,38]

Tabulka 3: Příznaky otravy methanolem [4]

Otrava	Příznaky
Lehká otrava (intoxikace) methanolem	Slabost, bolesti hlavy, zmatenost, poruchy vidění, mlhavé vidění, acidóza, pokles pH, hyperventilace, zvracení, průjem
Těžká otrava (intoxikace) methanolem	Poruchy vědomí, zraku, slepota, renální a jaterní insuficience, metabolický rozvrat, orgánové a oběhové selhání, smrt

1.3.2 Stanovení methanolu

Základní a nejvíce využívanou metodou pro stanovení methanolu je plynová chromatografie. Dalšími metodami, kterými lze stanovit obsah metanolu, jsou spektrometrie v infračervené a ultrafialové oblasti a elektrochemické metody (konduktometrie, volumetrie, biosenzory, ...). [4,22]

1.3.2.1 Chromatografické metody

Ma a kol. vyvinuli jednoduchou a citlivou metodu plynové chromatografie, která byla využita pro současné stanovení methanolu, ethanolu, dichlormethanu, ethylacetátu, 1,4-dioxanu a pyridinu v topiroxostatu. Separace probíhala na koloně Rtx-200 (30 m x 0,25 mm x 1 µm) naplněné polytrifluorpropyl(methyl)siloxanem a detekce byla provedena pomocí plamenově ionizačního detektoru. Vyvinutá metoda plynové chromatografie nabízela symetrický tvar píků a dobré rozlišení pro všechna použitá rozpouštědla. Byla získána dobrá linearita pro všechny analyty. Limity kvantifikace byly 0,006 % pro methanol, 0,005 % pro ethanol, 0,12 % pro dichlormethan, 0,0025 % pro ethylacetát, 0,0076 % pro 1,4-dioxan

a 0,004 % pro pyridin. Analýzy vzorků ukázaly, že tato metoda je jednoduchá, rychlá a proveditelná pro současné stanovení všech šesti zbytkových rozpouštědel v topiroxostatu. [39]

Pro klinické a toxikologické účely byla Bursovou a kol. vyvinuta jednoduchá a nízkonákladová metoda pro současné stanovení methanolu, ethanolu a kyseliny mravenčí v séru a moči pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí. Kyselina mravenčí byla derivatizována přebytkem isopropanolu za kyselých podmínek, za vzniku těkavého isopropylesteru, zatímco methanol a ethanol zůstaly nezměněny. Tato metoda byla úspěšně použita pro stanovení vybraných analytů v séru vzorků intoxikovaných pacientů, kteří byli otráveni methanolem v České republice v roce 2012. [40]

Pomocí metody plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí byla provedena současná analýza methanolu, acetaldehydu, acetonu a ethanolu ve vzorku lidské krve. Úprava vzorku byla následující – 50 μ l krve bylo zředěno 300 μ l sterilní vody, poté bylo přidáno 40 μ l 10% wolframanu sodného a 20 μ l 1% kyseliny sírové. Po centrifugaci byl do plynového chromatografu vstříkován 1 μ l supernatantu. K separaci byla použita kapilární kolona s dimethylpolysiloxanem. Mezní hodnoty detekce byly 0,80 mg/l pro methanol, 0,91 mg/l pro acetaldehyd, 0,58 mg/l pro aceton a 0,53 mg/l pro ethanol. Dle získaných výsledků bylo usouzeno, že tato metoda je vhodná pro rutinní klinické a forenzní analýzy. [41]

Hu a kol. vytvořili novou metodu pro stanovení methanolu v papírových produktech plynovou chromatografií. Princip metody je založen na hydrolýze celulózy nebo papírové matrice za použití roztoku kyseliny fosforečné (42,5%) při teplotě 120 °C během 5 hodin (bez kontaktu se vzduchem), za účelem uvolnění methanolu obsaženého v matrici, který by poté stanoven pomocí plynové chromatografie (GC). Výsledky dokázaly, že za daných podmínek hydrolýzy, nebyl v materiálu vytvořen methanol z methoxylových skupin. Zkoušky reprodukovatelnosti metody vykazovaly relativní směrodatnou odchylku < 3,5 %, přičemž výtěžnost byla v rozsahu 93,4 – 102 %. Tato metoda je spolehlivá, přesná a vhodná pro testování obsahu methanolu v papírenských materiálech. [42]

Obsah methanolu v různých vzorcích vína byl stanoven multidimenzionální plynovou chromatografií. Vzorky vína byly přímo vstříkovány autosamplerem. Metanol byl postupně oddělen na koloně obsahující nepolární stacionární fázi RTX-5ms a následně na koloně s polární stacionární fází HP-INNOWax. Obsah methanolu byl kvantitativně analyzován hmotnostní spektrometrií. Kalibrační křivky vykazovaly dobrou linearitu v rozmezí

1 – 10000 mg/l. Limit detekce byl 1 mg/l. Výtěžnost byla 91,3 % – 101,9 % s relativní směrodatnou odchylkou 4,5 – 8,6 % při koncentracích 5, 50, 250, 400 a 800 mg/l. [43]

Pro stanovení obsahu methanolu v kosmetice byla vyvinuta nová a spolehlivá analytická metoda, využívající multidimenzionální plynovou chromatografii spojenou s hmotnostní detekcí. Byla provedena kvantitativní analýza methanolu. Průměrná výtěžnost byla 99,8 % při relativní směrodatné odchylce (RSD) 4,3 %. Tato metoda prokázala dobrou přesnost a správnost, přičemž minimalizovala chybné výsledky v důsledku falešných pozitivních výsledků ve srovnání s konvenční jednodimenzionální plynově chromatografickou analýzou. [44]

1.3.2.2 Spektrometrické metody

Nelegální výroba alkoholických nápojů je běžným problémem ve většině zemí. V této studii bylo provedeno srovnání mezi technikami plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a Ramanovou spektrometrií pro stanovení množství methanolu v produktu BogmaRaki, což je padělaný alkoholický nápoj vyrobený v oblasti Hatay turecké provincie. Pro získání kalibrační křivky byly připraveny různé poměry koncentrací methanolu a ethanolu. Tato křivka byla použita k měření množství methanolu v reálných vzorcích za použití plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a Ramanovy spektroskopie. Hodnoty limitu detekce a limitu kvantifikace byly stanoveny jako 0,3 % obj. a 0,11 % obj. Obě techniky prokázaly podobnou citlivost při stanovení koncentrace methanolu v těchto padělaných produktech. Ramanova spektroskopie má však výhodu, že je snadno použitelná, rychlá a nedestruktivní analytická technika s malou nebo žádnou přípravou vzorku. [45]

Yangem a kol. byla navržena inovativní metoda pro stanovení koncentrace methanolu v alkoholických nápojích za použití dvojrozměrné korelační spektrometrie v blízké infračervené oblasti spektra (NIR) v kombinaci s vícerozměrnou kalibrací. Spektrální charakteristiky vzorků padělaných methanolem byly studovány na základě jednorozměrných spekter a dvourozměrných korelačních spekter v blízké infračervené oblasti. Pro srovnání byly sestaveny modely kvantitativní analýzy za účelem stanovení obsahu methanolu v alkoholickém nápoji s použitím synchronních dvourozměrných korelačních spekter a tradičních jednorozměrných spekter v blízké infračervené oblasti. Mezi jednotlivými metodami stanovení bylo provedeno porovnání, pomocí kterého bylo zjištěno, že navrhovaná

nová metoda má silnější prediktivní schopnost a může poskytnout lepší výsledky než tradiční jednorozměrné spektrum v blízké infračervené oblasti. [46]

Další možností stanovení je spektrofotometrické stanovení metanolu po reakci s kyselinou fuchsinsířičitou. Methanol je nejprve zoxidován manganistanem draselným na formaldehyd, který je následovně stanoven po reakci s kyselinou fuchsinsířičitou. Tato metoda je vhodná pro stanovení methanolu ve vzorcích s obsahem asi do 2 %. Pro přípravu kalibrační křivky byla vytvořena řada 100 ml odměrných baněk, do kterých bylo odměřeno 0 až 2 ml methanolu a baňky byly doplněny čistým ethanolem. Z takto připravených standardních roztoků bylo pipetováno po 0,5 ml do sady 25 ml odměrných válců, bylo přidáno 4,5 ml vody, 0,2 ml kyseliny sírové a 5 ml 1% manganistanu draselného. Tato směs byla poté promíchána a ponechána 2 minuty stát. Po této době byl přidán 1 ml 8% kyseliny šťavelové a 1 ml kyseliny sírové. Po odbarvení roztoku bylo přidáno 5 ml fuchsinsířičitého činidla (1 g fuchsinu byl rozpuštěn ve 100 ml vody, bylo přidáno 25 g heptahydrátu siřičitanu sodného a 15 ml kyseliny chlorovodíkové). Vzniklé zbarvení bylo po 3 hodinách proměřeno při 590 nm. Při vlastním stanovení byl z průměrného vzorku destilátu odměřen 1 ml do 25 ml odměrného válce a byly přidány 4 ml vody a dále bylo postupováno stejným způsobem jako u kalibrační křivky. [22]

1.3.2.3 Elektrochemické metody

V práci Mousaviho a kol. byla zkoumána elektrooxidace methanolu v alkalickém roztoku různými elektrochemickými metodami na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) modifikované bis-(salicylaldehyd)-nikelnato-dihydrátovým komplexem a redukováným oxidem grafenu. Bylo zjištěno, že methanol byl oxidován skupinami NiOOH generovanými další elektrochemickou oxidací hydroxidu nikelnatého na povrchu modifikované elektrody. Navíc pokusy metodou diferenciální pulzní voltametrie (DPV) ukázaly, že hodnoty proudů byly úměrné koncentraci methanolu ve dvou lineárních rozmezích. Získané lineární rozsahy byly od 0,5 do 100,0 mmol/l a 400,0 až 1300,0 mmol/l. Detekční limit pro stanovení methanolu byl 0,19 mmol/l. [47]

Stanovení obsahu methanolu a ethanolu ve vodných roztocích bylo provedeno měřením permitivity roztoků za použití bezkontaktního vodivostního detektoru, který se obvykle používá pro detekci v kapilární elektroforéze. Detekční buňkou je úsek kapiláry taveného oxidu křemičitého s vnitřním průměrem 50 μm a s dvojicí vodivých elektrod na vnějších stěnách. Odpověď detektoru na vzorky směsí methanol/voda a ethanol/voda

je v koncentračním intervalu lineární. Metoda byla testována na vzorcích MeOH/voda a při stanovení obsahu ethanolu v běžně dostupných destilovaných nápojích. [48]

Wenem a kol. byl vyvinut nový biosenzor pro stanovení methanolu. Tento biosenzor zahrnuje *Methylobacterium organophilum* a zlaté nanočástice imobilizované na podskořápečné vaječné bláně a komerční kyslíkový senzor. Mechanismus dané reakce je založen na respirační aktivitě bakteriálních buněk se současnou spotřebou rozpuštěného kyslíku při přítomnosti methanolu ve vzorku. Biosenzor vykazoval lineární odezvu na methanol v rozmezí 0,050 až 2,5 mmol/l s detekčním limitem 0,047 mmol/l a relativní směrodatnou odchylkou 2,3 %. Optimálními pracovními podmínkami pro mikrobiální biosenzor jsou pH fosfátového pufru rovno 7,0 (20 mmol/l) při teplotě 20-25 °C. Nakonec byl daný biosenzor využit k analýze obsahu methanolu v jablečných šťávách. Získané výsledky byly srovnatelné s hodnotami získanými metodou plynové chromatografie. Použití tohoto biosenzoru umožňuje pohodlnou, jednoduchou a spolehlivou metodu pro stanovení obsahu methanolu v reálných vzorcích. [49]

1.3.2.4 Další metody stanovení

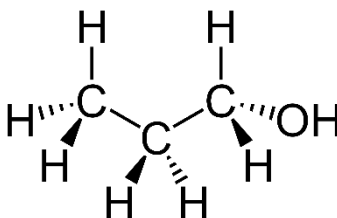
Bylo vytvořeno přímé automatické stanovení obsahu methanolu v červených vínech na základě teplotního účinku reakčního systému $\text{KMnO}_4/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{fuchsin}$ siřičitanu sodného. Standardní metoda pro stanovení methanolu ve víně je založena na reakčním systému: methanol/ $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4/\text{fuchsin}$ -siřičitan sodný (FSS). U tohoto testu je obtížné kontrolovat stupeň barvy a teplotu reakčního produktu, ale také jeho opakovatelnost, která je špatná v důsledku tvorby CO a CO_2 během reakce. K vyřešení těchto problémů stanovení byl používaný $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ nahrazen meta-disiřičitanem sodným. Byl vyvinut automatizovaný způsob, který umožňuje rychlé a přesné stanovení methanolu a lze ho také použít k vytvoření online analyzátoru. Bylo zjištěno, že reakce směsi methanolu, KMnO_4 , acetaldehydu a fuchsin-siřičitanu sodného (FSS) je exotermní, zatímco reakce methanolu, KMnO_4 , formaldehydu a fuchsin-siřičitanu sodného (FSS) je endotermní. V důsledku toho, na základě teplotního účinku, byla odstraněna interference ethanolu při detekci methanolu ve vínech, cílem tohoto výzkumu bylo dosažení přímého a přesného stanovení methanolu bez předběžné úpravy vzorku. Následnou optimalizací systému byly získány podmínky pro stanovení methanolu ve vzorcích vína. Díky své přesnosti, možnosti automatizace, reprodukovatelnosti, rychlosti samotné analýzy a nákladům na samotné stanovení je tato metoda využívána jako

doplňková forma methanolového testu a také jako kontrola kvality výroby vína, vína jako produktu a nápojů s nízkým obsahem alkoholu. [50]

1.4 Propanol

1.4.1 Charakteristika propanolu

Propanol neboli 1-propanol, propan-1-ol, propylalkohol je chemická sloučenina patřící do skupiny primárních alkoholů. Jedná se o tříuhlíkatý alkohol. Molekulová hmotnost propanolu je 60,096 g/mol. Propanol lze také zapsat pomocí chemického vzorce C_3H_8O nebo $CH_3CH_2CH_2OH$. Bod varu propanolu je 97,2 °C, bod tání 126,1 °C a hustota 0,8053 g/cm³ při teplotě 20 °C. Hodnota pK_a tohoto alkoholu je 16,1 a index lomu se rovná 1,3862. Jedná se o neomezeně mísitelnou sloučeninu s vodou. [5]



Obrázek 11: Struktura propanolu [5]

Propanol je čirá, bezbarvá, hořlavá a toxická kapalina vyznačující se charakteristickým ostrým zápachem podobným ethanolu. Propanol je alkohol typické ovocné, pálivé chuti. Vyrábí se především oxidací alifatických uhlovodíků. Tento alkohol má široké spektrum využití. Propanol se zpravidla používá jako rozpouštědlo například ve farmaceutickém průmyslu a také pro pryskyřice nebo estery celulózy. Propanol se také používá při výrobě kosmetických přípravků, přípravků na kůži a vlasy, farmaceutických přípravků, parfémů, laků, roztoků barviv, nemrznoucích prostředků, mýdel, čističů oken a dalších chemikálií a výrobků. Propanol může mít korozní účinek na některé formy plastů, pryže a nátěrů. Propanol se v malém množství přirozeně vytváří při fermentačních procesech a malé množství propanolu je produkováno střevní mikroflórou. Propanol může být také vyráběn frakcionací přiboudliny. [5,13,15]

Propanol je absorbován především v gastrointestinálním traktu, dále může být absorbován kůží. Propanol je v prvním kroku metabolizován alkoholdehydrogenázou, která způsobuje oxidaci propanolu v organismu na kyselinu propionovou. Ve druhém kroku je tato

kyselina v organismu dále oxidována aldehyddehydrogenázou až na oxid uhličitý, vodu a malé množství kyseliny mléčné.

Určitá dávka propanolu v lidském organismu může způsobit různá onemocnění, například v podobě celiakie, Crohnovy nemoci, syndromu dráždivého střeva a ulcerózní kolitidy. Páry propanolu jsou těžší než vzduch a mírně dráždí oči a horní cesty dýchací (nos, hrdlo...). Kontakt roztoku propanolu s očima může způsobit popáleniny a silné podráždění. Při vysokých koncentracích může způsobit nevolnost, křeče, zvracení, průjem, bolesti hlavy, slabost a malátnost. Páry propanolu jsou v prostředí kyslíku výbušné. [5]

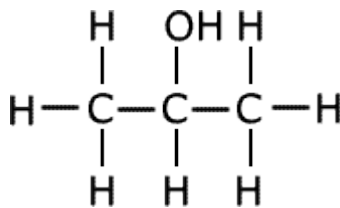
1.4.2 Stanovení propanolu

Metoda, vyvinutá Sierrou a kol., pro současné stanovení propanolu a butanolu je založena na principu vnitřní fluorescence alkoholdehydrogenázy (ADH). Alkohol reaguje s nikotinamidadeninukleotidem (NAD) za tvorby aldehydu a jeho redukované formy NADH. Nikotinamidadeninukleotid (NAD) i jeho redukovaná forma NADH snižují intenzitu fluorescence alkoholdehydrogenázy, ovšem každý jinou měrou. Za předpokladu, že nikotinamidadeninukleotid (NAD) je během reakce přeměněn na svoji redukovanou formu NADH, celková intenzita fluorescence enzymu se během reakce snižuje. Toto snížení je úměrné koncentraci alkoholu v roztoku. [51]

1.5 Isopropanol

1.5.1 Charakteristika isopropanolu

Isopropanol neboli také 2-propanol či isopropylalkohol je chemická sloučenina patřící do skupiny alkoholů. Isopropanol obsahuje hydroxylovou funkční skupinu –OH, ovlivňující jeho vlastnosti. Molekulová hmotnost isopropanolu je 60,096 g/mol. Chemický vzorec isopropanolu je C_3H_8O nebo $CH_3CHOHCH_3$ nebo také $(CH_3)_2CHOH$. Bod varu isopropanolu je 82,3 °C, bod tání je -89,5 °C a hustota odpovídá hodnotě 0,79 g/cm³. Hodnota pK_a isopropanolu se rovná 17,1 a index lomu je 1,3852. Z hlediska rozpustnosti isopropanolu, jedná se o neomezeně mísitelnou chemickou sloučeninu s vodou. [6]



Obrázek 12: *Struktura isopropanolu [6]*

Isopropanol je izomerem 1-propanolu. Jedná se o těkavou, hořlavou, toxickou, bezbarvou kapalinu s ostrým zápachem a mírně hořkou chutí, která se vyznačuje dezinfekčními a antibakteriálními vlastnostmi. Dále se používá jako rozpouštědlo a lokálně ho lze také využít jako antiseptikum. Isopropanol se používá k výrobě acetonu a jeho derivátů, dále k výrobě kosmetických, čistících a farmaceutických přípravků, laků, barviv, nemrznoucích směsí a jedná se o sloučeninu, která je také součástí výroby mýdel. Isopropanol je potravinářskou přísadou aromatických přípravků. Malé množství tohoto alkoholu je přirozeně produkováno střevní mikroflórou. [6,13,15]

Páry isopropanolu mají větší hustotu než vzduch a mírně dráždí oči a horní cesty dýchací. Může způsobovat ospalost, závratě, bolest hlavy. Při požití působí na centrální nervový systém, játra a ledviny člověka. Isopropanol je uchováván za nepřístupu světla v úzkých lahvích a na určité materiály má leptavé účinky. Isopropanol je pro organismus toxický a může způsobit smrt. Letální dávka isopropanolu pro člověka je přibližně mezi 100 až 250 ml. Vyznačuje se poměrně rychlou absorpcí do organismu, jak ve formě perorálních dávek přes gastrointestinální trakt, tak i přes kůži při dlouhodobém kontaktu organismu s isopropanolem. Úplná distribuce trvá přibližně dvě hodiny, alkoholdehydrogenáza oxiduje isopropanol na aceton, poměrně velké množství isopropanolu je ledvinami vylučováno v nezměněné podobě a k největší exkreci dochází v žaludku a slinách. [6]

1.5.2 Stanovení isopropanolu

Pro stanovení isopropanolu se nejčastěji používá plynová chromatografie, která je současně také referenční metodou. [22]

Chien a kolektiv vyvinuli metodu ke stanovení isopropanolu ve vydechovaném vzduchu. Analýza vydechovaného vzduchu díky svým výhodám, kterými jsou neinvazivnost a také možnost neustálého sledování, získala značnou pozornost. Určité množství isopropanolu nacházející se ve vydechovaném vzduchu může poukazovat na určitá onemocnění, jako jsou onemocnění jater, ledvin, horních cest dýchacích či rakovinu plic. V této studii byl zkonstruován a optimalizován biochemický plynový senzor (bio-sniffer)

pro stanovení isopropanolu ve vydechovaném vzduchu. Tento senzor měří koncentraci isopropanolu dle intenzity fluorescence oxidovaného nikotinamidadenindinukletidu (NADH), který je produkován enzymatickou reakcí sekundární alkoholdehydrogenázy. Výsledky prokázali, že se jedná o vysoce citlivou a selektivní metodu. [52]

V práci Zoua a kol. byly zkoumány adsorpční charakteristiky čtyř kalixarenových supramolekulárních sloučenin, jako povlakových materiálů křemenných krystalických mikrobalačních senzorů reagujících na výpary isopropanolu. Výsledky této metody prokázaly, že nejlepším potahovým materiálem pro páry isopropanolu byla kalixarenová supramolekula krystalinitu libovolné teploty (RCT). Snímač piezoelektrický krystalový rezonátor (Quartz Crystal Microbalance QCM) potažený nátěrovým materiálem RCT vykazoval poměrně dobrou stabilitu a vysokou citlivost stanovení. Výsledky této metody byly srovnatelné s plynovou chromatografií. [53]

1.6 Ethylenglykol

1.6.1 Charakteristika ethylenglykolu

Ethylenglykol neboli 1,2-ethandiol či ethan-1,2-diol je chemická sloučenina obsahující hydroxylovou funkční skupinu –OH, patřící do skupiny alkoholů. Molekulová hmotnost ethylenglykolu je 62,068 g/mol. Chemický vzorec této chemické sloučeniny lze vyjádřit ve formě HOCH₂CH₂OH dále také ve tvaru C₂H₆O₂ nebo CH₂OHCH₂OH. Bod varu ethylenglykolu je 198 °C a bod tání -13 °C. Hustota tohoto alkoholu je 1,11 g/cm³. Rozpustnost ethylenglykolu je za laboratorní teploty 100 mg/ml vody. Dále je velmi dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. [7]



Obrázek 13: Struktura ethylenglykolu [7]

Ethylenglykol je bezbarvý a toxický viskózní dihydroxyalkohol. Jedná se o čirou, nezapáchající látku, která je charakteristická svojí sladkou chutí. Ethylenglykol je nejdůležitější komerčně dostupný glykol. Jedná se o látku, která snadno proniká do okolního prostředí (půdy) a tím může způsobit kontaminaci životního prostředí. Jedná se o kapalinu, jejímž zahřátím se uvolňují výpary dráždící horní cesty dýchací. [2,7,12,15]

Využití ethylenglykolu je poměrně pestré. Používá se jako nemrznoucí směs v chladících a topných systémech, hydraulických brzdových kapalinách, jako rozpouštědlo, průmyslové zvlhčovací činidlo, složka elektrolytických kondenzátorů a dále se používá k výrobě dynamitu a pryskyřic. Možné využití ethylenglykolu je také ve formě potravinářské přísady. Je součástí kosmetiky, barev a plastů. Roztok ethylenglykolu lze využít pro lékařské účely, například jako projímadlo či dezinfekce.

Ethylenglykol je pro člověka, při jeho konzumaci toxický. Akutní (krátkodobé) vystavení lidského organismu určitému množství ethylenglykolu může způsobit tři různé zdravotní komplikace. Těmito komplikacemi mohou být deprese centrálního nervového systému, dále kardiopulmonální účinky a poškození ledvin. Inhalací ethylenglykolu mohou být podrážděny horní cesty dýchací.

Absorpce, vstřebávání ethylenglykolu a jeho metabolismus v lidském organismu je nevýrazný, a proto je vylučován v nezměněné podobě. Absorbovaná část ethylenglykolu je vylučována močí. [7]

1.6.2 Stanovení ethylenglykolu

Základní metodou využívanou pro samotnou analýzu ethylenglykolů je plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí a její různé modifikace. [22]

Robsonem a kol. byla úspěšně vyvinuta metoda pro stanovení ethylenglykolu v plné krvi. Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu fungující na principu tepelné desorpční plynové chromatografie (TD-GC) s plamenově-ionizační detekcí. Pro provedení této metody nebyly vyžadovány žádné extrakční ani derivatizační kroky. Do tepelné desorpční jednotky byl zaveden alikvotní podíl 1 μ l vzorku, který byl následně vysušen a tepelně desorbován přímo do plynového chromatografu. Byla vytvořena kalibrační křivka v rozmezí koncentrací 1 až 200 mmol/l. Teoretická mez detekce byla vypočítána na hodnotu 50 μ mol/l. Nebyly pozorovány žádné interference. [54]

Yu a kol. vytvořili jednoduchou kolorimetrickou metodu pro stanovení ethylenglykolu ve vodném roztoku. Tato metoda je založena na tom, že ethylenglykol zabráňuje agregaci nanočástic stříbra při zmrazení a rozmrazování. V nepřítomnosti ethylenglykolu dochází k agregaci nanočástic stříbra vyvolané mrazením a rozmrazením, protože jejich povrch je narušen ledovými krystaly. Výsledkem toho je, že daný roztok se stává bezbarvým.

Nicméně za přítomnosti ethylenglykolu se ledové krystaly netvoří a nedochází k agregaci a odbarvení roztoku. Byla provedena optimalizace fotometrického testu. Tento test se nejlépe provádí při vlnové délce 395 nm, v rozsahu koncentrací ethylenglykolu 10 až 400 mmol/l. [55]

Wei a kol. vyvinuli novou analytickou metodu pro kvantitativní stanovení neiontových povrchově aktivních látek obsahujících ethylenglykol, jako je polyethylenglykol 8000, polysorbát 80 a Pluronic F-68. Tyto povrchově aktivní látky jsou běžně využívány v přípravcích farmaceutických proteinů, a proto se vyžaduje testování v přítomnosti bílkovin. Tato metoda je založena na principu kapilární plynové chromatografie ethylenglykoldiacetátu vzniklého hydrolýzou a acetylací povrchově aktivních látek obsahujících ethylenglykol. Vzorky bílkovin obsahující volné povrchově aktivní látky jsou hydrolyzovány a acetylovány anhydridem kyseliny octové za přítomnosti p-toluensulfonové kyseliny. Acetylovaný ethylenglykol je poté extrahován dichlormethanem a analyzován plynovou chromatografií za použití plamenového ionizačního detektoru. Množství neiontové povrchově aktivní látky ve vzorku bylo stanoveno porovnáním uvolněného ethylenglykoldiacetátového signálu s měřeným kalibračním standardem. Limity kvantifikace této metody byly 5 µg/ml pro polyethylenglykol 8000 a Pluronic F-68 a 50 µg/ml pro polysorbát 80. [56]

Gras a kol. vytvořili praktickou a spolehlivou metodu pro analýzu ethylenglykolu ve vzorcích maziv na bázi uhlovodíků nebo syntetických maziv. Tato analýza byla provedena pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí. Byla provedena derivatizace za využití fenyloboronové kyseliny za účelem převedení ethylenglykolu na 2-fenyl-1,2,3-dioxaboran. Kompletní analýzu lze provést za méně než 15 minut. [57]

Ve studii Wurity a kol. byl popsán podrobný postup pro vysoce citlivé a současné stanovení ethylenglykolu, propylenglykolu a diethylenglykolu v plné lidské krvi metodou izotopové ředící plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). 0,25 ml alikvotní části plné krve obsahující glykoly bylo smícháno se 100 ng příslušného glykolu. Po provedené centrifugaci byla supernatantová frakce odpařena do sucha a poté byla derivatizována anhydridem kyseliny octové. Derivát byl následně extrahován n-hexanem. Určitá část n-hexanové vrstvy byla podrobena analýze izotopové ředící plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Touto analýzou bylo zjištěno značné množství ethylenglykolu, propylenglykolu a diethylenglykolu dokonce i ve vzorcích lidské plné krve získaných od zdravých subjektů. Pro každý vzorek byla poté následně sestavena

standardní kalibrační křivka. Ze získaných údajů byla tato metoda označena za jednu z nejcitlivějších metod. [58]

Meyer a kol. vyvinuli novou, rychlou a jednoduchou metodu pro současnou analýzu ethylenglykolu, 1,2-propylenglykolu, kyseliny mléčné, kyseliny glykolové, kyseliny gama-hydroxymáselné (GHB), di-, tri-, tetra-ethylenglykolu v lidské plazmě nebo moči. Bylo deproteinováno 50 μ l vzorku a následně odebráno 20 μ l deproteinovaného vzorku. Toto množství bylo derivatizováno za použití bis-N,O-trimethylsilyl trifluoroacetamidu a jako katalyzátor sloužil dimethylformamid. Po mikrovlnné derivatizaci byl vzorek vstříkovan do plynového chromatografu a po elektronové ionizaci analyzován hmotnostní spektrometrií v režimu selektivního monitorování iontů. Všechny sloučeniny byly odděleny během 12 minut a detekovány s limitem kvantifikace 0,05 a 0,01 g/l pro glykoly a kyselinu gama-hydroxymáselnou (GHB). Poté byla vytvořena kalibrační závislost, která byla lineární v rozsahu od 0,05 do 1 g/l pro glykoly a 0,01 až 0,2 g/l pro kyselinu gama-hydroxymáselnou (GHB). [59]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Izotachoforéza (ITP)

2.1.1 Úvod

Izotachoforéza je moderní analytická elektroseparační metoda, umožňující analyzovat směsi ionogenních látek v roztocích vlivem elektrického pole. Na základě pohyblivosti jsou ionty rozděleny na jednotlivé zóny. Pomocí izotachoforézy lze získat v poměrně krátké době (obvykle v rozmezí 4 až 40 minut) snadno vyhodnotitelné údaje a záznamy o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku. Běžná chyba kvantitativního stanovení je 1 až 3 %.

Izotachoforéza pracuje s malým množstvím vzorku a zpravidla umožňuje stanovit ještě desítky ng látek, což při nástřiku jednotek až desítek μl vzorku vede k analyzovaným koncentracím na úrovni desítek až jednotek ppm.

Izotachoforéza je řazena mezi poměrně novou techniku, přestože teoretické základy této metody byly popsány již v roce 1897. Největší rozvoj této metody je však datován až od konce 60. let 20. století. V roce 1970 izotachoforéza získala svůj název, který je používán dodnes. Mezi starší označení této metody patří: displacement electrophoresis, multiphasis zone electrophoresis, steady-state stacking atd.

Izotachoforéza je metoda založená na principu elektroforézy. Elektroforézou rozumíme pohyb nabitých částic v roztoku vlivem působení elektrického pole. Rychlost pohybu dané částice v určitém místě roztoku je přímo úměrná intenzitě elektrického pole. Protože směr pohybu daného iontu závisí na jeho náboji, přisuzujeme znaménko také pohyblivosti. Pohyblivost je charakteristickou konstantou této metody. Iontová pohyblivost závisí na iontové síle a teplotě roztoku.

V izotachoforéze je daný vzorek umístěn mezi dva pomocné elektrolyty – vedoucí a koncový. Po ukončení separace každá zóna obsahuje kromě protiiontu pouze ionty jediné látky. Všechny zóny migrují stejnou rychlostí a vyznačují se ostrými rozhraními. V rámci izotachoforetické separace jsou analyzovány pouze složky migrující jedním směrem, proto rozlišujeme u izotachoforézy kationtovou nebo aniontovou separaci.

Izotachoforetická analýza zahrnuje nástřik daného vzorku či roztoku, separaci a detekci. Po nástřiku neboli aplikaci vzorku či roztoku se analyzované ionty pohybují v elektrickém poli, nejdříve se separují a poté dochází k detekci těchto separovaných izotachoforetických zón. Samotný proces separace probíhá v kapiláře o konstantním průřezu

s konstantní koncentrací vedoucího elektrolytu. Izotachoforézu lze použít jak pro kvalitativní analýzu, tak i pro analýzu kvantitativní. [8]

2.1.2 Kvalitativní analýza

Izotachoforéza neposkytuje, podobně jako ostatní separační analytické metody, poskytnou přímé údaje o kvalitativním složení vzorku či roztoku. Kvalitativní analýza probíhá pomocí relativní výšky schodu (RSH – viz vzorec níže) vzhledem k poloze vedoucího a koncového elektrolytu. Tato hodnota se porovnává s relativními výškami zón látek, jejichž přítomnost ve vzorku předpokládáme. Potvrzením identity je přidavek standardu stanovované složky ke vzorku – identická zóna se vzhledem k předchozí analýze prodlouží.

$$RSH = \frac{h_A - h_L}{h_T - h_L},$$

kde h_A je výška zóny analytu, h_L výška zóny vedoucího elektrolytu a h_T výška zóny koncového elektrolytu. [8]

2.1.3 Kvantitativní analýza

V izotachoforéze je kvantitativní analýza prováděna pomocí měření délek jednotlivých zón. Čas průchodu zóny detektorem je přímo úměrný množství látky při nástřiku. Ostré rozhraní mezi zónami umožňují velmi přesné měření délek zón, a tedy i vysokou přesnost výsledků. [8]

2.2 Použité chemikálie

V tabulce 4 jsou uvedeny všechny použité chemikálie.

Tabulka 4: Použité chemikálie

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Histidin-chlorid	p.a.	Reanal
Histidin	p.a.	Reanal
Dichroman draselný	p.a.	Lachema
Kyselina sírová (98%)	p.a.	Lachema
Ethanol	p.a.	Lachema
Kyselina chlorovodíková (36%)	p.a.	Lachema
β -alanin	p.a.	Serva
Octan sodný	p.a.	Lachema
Kyselina 2-methylmásečná	p.a.	Sigma-Aldrich
Manganistan draselný	p.a.	Lachema
Hydroxid barnatý	p.a.	Lachema
Peroxid vodíku (30%)	p.a.	Penta
Mravenčan sodný	p.a.	Lachema
Šťavelan sodný	p.a.	Lachema

2.3 Příprava elektrolytů

2.3.1 Elektrolytový systém I

VEDOUCÍ ELEKTROLYT: 0,01 mol/l HCl + 0,02 mol/l β -alanin (pH 3,6)

Do 100 ml odměrné baňky byl odpipetován 1 ml 1 mol/l kyseliny chlorovodíkové a k tomuto množství bylo poté přidáno 178,2 mg β -alaninu. 100 ml baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku a byla řádně promíchána. Výsledné pH tohoto roztoku bylo 3,6.

KONCOVÝ ELEKTROLYT: 0,01 mol/l 2-methylmásečná kyselina

Do 50 ml baňky bylo odpipetováno 50 μ l 2-methylmásečné kyseliny. Baňka byla poté doplněna destilovanou vodou po rysku a řádně promíchána.

2.3.2 Elektrolytový systém II

VEDOUCÍ ELEKTROLYT: 0,01 mol/l histidin-chlorid s přídatkem histidinu (pH 6,2)

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 868 mg histidin-chloridu a k tomuto množství bylo poté přidáno 776 mg histidinu. Baňka byla poté doplněna destilovanou vodou po rysku a roztok byl řádně promíchán. Výsledné pH roztoku bylo 6,2.

KONCOVÝ ELEKTROLYT: 0,01 mol/l kyselina morfolinethansulfonová (MES)

Do 250 ml odměrné baňky bylo naváženo 976 mg MES. Baňka byla poté doplněna destilovanou vodou po rysku a roztok byl řádně promíchán.

2.4 Příprava roztoků

2.4.1 Příprava 5 mol/l kyseliny sírové

Do 100 ml baňky bylo pomocí odměrného válce nalito 75 ml destilované vody. K tomuto množství destilované vody bylo, za neustálého chlazení studenou vodou, pomalu přidáváno 25 ml koncentrované kyseliny sírové o koncentraci 20 mol/l. Roztok byl po ochlazení důkladně promíchán.

2.4.2 Příprava 0,001 mol/l kyseliny octové

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 4,1 mg octanu sodného a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl poté řádně promíchán.

2.4.3 Příprava 0,001 mol/l kyseliny mravenčí

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,4 mg mravenčanu sodného. Roztok byl poté řádně promíchán.

2.4.4 Příprava 0,001 mol/l kyseliny šťavelové

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 6,7 mg šťavelanu sodného a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl poté řádně promíchán.

2.4.5 Příprava 3% peroxidu sodného

Do 50 ml odměrné baňky bylo odměřeno 5 ml 30% roztoku peroxidu sodného (H₂O₂) a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

2.5 Reálné vzorky

2.5.1 Vzorek 1 – Skotská whisky

Skotská whisky Ballantines Finest (země původu: Spojené království, prodávající v ČR: Jan Becher, Karlovarská Becherovka a. s., složení: voda, obilný destilát, barvivo karamel, obsah alkoholu 40 % obj.).



Obrázek 14: Skotská whisky Ballantines Finest

2.5.2 Vzorek 2 – Slovenská borovička

Slovenská Borovička (země původu: Slovenská Republika, výrobce: ST. NICOLAUS DISTILLERY a. s., Klasik, Jalovcová lihovina, složení: voda, líh, jalovcový destilát, přírodní aroma, obsah alkoholu 40 % obj.).



Obrázek 15: Slovenská Borovička

2.5.3 Vzorek 3 – Tuzemák

Jindřichohradecký Tuzemák (země původu: Česká Republika, výrobce: Fruko-Schulz s. r. o., Jindřichův Hradec, složení: líh, rumové a vanilkové aroma, cukr, barvivo karamel, obsah alkoholu 37,5 % obj.).



Obrázek 16: Jindřichohradecký Tuzemák

2.5.4 Vzorek 4 – Pepermint

Pepermint (zelená) (země původu: Česká Republika, výrobce: Stock Plzeň-Božkov s. r. o., Plzeň, složení: cukr, líh, peprnomátová silice, kyselina citronová, barviva: tatrazin, brilantní modř, obsah alkoholu 19 % obj.).



Obrázek 17: Český Božkov Pepermint

2.5.5 Vzorek 5 – Mexická tequila

Mexická Sierra Tequila Silver (země původu: Mexiko, prodávající v ČR: Global Spirits s. r. o., Praha, složení: voda, tequilla z modré agáve, obsah alkoholu 38 % obj.).



Obrázek 18: Mexická sierra Tequila

2.6 Postup oxidace ethanolu v reálných vzorcích

Vzorky byly připraveny podle následujícího postupu: 150 μ l vzorku bylo odpipetováno do 50 ml odměrné baňky, doplněno destilovanou vodou po rysku a pomocí hydroxidu barnatého bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 12. Poté bylo přidáno 0,8 g pevného manganistanu draselného a po uplynutí 200 minut byl odebrán 1 ml reakční směsi do 100 ml odměrné baňky. Následně byl přidáván 3% roztok peroxidu vodíku do odbarvení a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Dále byl připraven roztok vzorku se standardním přídatkem ethanolu, kdy do 50 ml odměrné baňky bylo kromě vzorku odpipetováno 100 μ l ethanolu. Další postup byl stejný jako v případě přípravy roztoku vzorku. Takto připravené roztoky byly analyzovány pomocí kapilární izotachoforézy v elektrolytovém systému s vedoucím elektrolytem o složení 0,01 M histidin-chlorid a histidin k úpravě pH na hodnotu 6,2 a koncovým elektrolytem 0,01 M MES.

2.7 Instrumentace

Pro analýzy byl použit analytický přístroj *Electrophoretic Analyser EA 102* (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovensko). Jedná se dvoukolonový izotachoforetický analyzátor. Tento analyzátor se skládá z předseparační kolony o vnitřním průměru 0,8 mm o délce 160 mm a analytické kolony o vnitřním průměru 0,3 mm, délky 160 mm. Celkový objem kapiláry v prvním případě je přibližně 100 μl a ve druhém případě je přibližně 10 μl . Na konci těchto kolon jsou zabudovány vodivostní detektory.

Vzorek je do přístroje vnášen pomocí dávkovacího kohoutu o objemu 30 μl . Nastavení pracovního proudu pro danou analýzu je nezávislé pro obě dvě kolony a maximální hodnota tohoto proudu je 500 μA . Analýza je řízena počítačem, kde také dochází k zaznamenávání jejího průběhu. Vyhodnocení dané analýzy se provádí pomocí programu ITP Pro32.

Pro navažování byly využity analytické váhy KERN ATB 120-4M (Balingen, Německo) s přesností 0,1 mg a chybou 1 mg, dále byly využity jednobáňové pipety Biohit (Helsinki, Finsko) o různém rozmezí objemů a hodnoty pH byly měřeny pomocí laboratorního pH metru Sentron (VD Leek, Nizozemsko). K urychlení rozpuštění vzorků či roztoků byla využita ultrazvuková lázeň Kraintek (Podhájská, Slovensko). Pro zahřívání roztoků byla použita ploténka s magnetickou míchačkou Fisher Scientific (Pardubice, ČR). K přípravě roztoků bylo využito běžné laboratorní sklo.



Obrázek 19: Izotachoforetický analyzátor



Obrázek 20: Analytické váhy



Obrázek 21: Pipeta, špička, odměrná baňka

2.8 Zpracování dat

Data získaná experimentální analýzou byla zpracována pomocí osobního počítače značky Lenovo G50. Ke zpracování výsledků byl použit počítačový program ITP Pro32, Microsoft Excel a Microsoft Word a grafický program (malování) pro úpravu výsledků.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Oxidace ethanolu na kyselinu octovou

Vzhledem k tomu, že ethanol je látka neiontové povahy, je pro jeho stanovení pomocí ITP nutná derivatizace. K tomuto účelu byla vybrána oxidace ethanolu na kyselinu octovou. Byly zkoušeny dva způsoby oxidace – pomocí dichromanu draselného v kyselém prostředí a pomocí manganistanu draselného v zásaditém prostředí.

3.1.1 Oxidace ethanolu pomocí dichromanu draselného

Oxidace ethanolu dichromanem draselným v kyselém prostředí probíhá za vzniku kyseliny octové, chromité soli a vody (viz rovnice 1).



Byly zkoušeny tři způsoby provedení oxidace – byly připraveny tři roztoky podle následujícího postupu: 5 ml 5 mol/l kyseliny sírové bylo vloženo do třech různých odměrných baňek o objemu 50 ml. Do každé baňky bylo poté přidáno 1,74 g dichromanu draselného, 100 μl ethanolu a všechny byly doplněny destilovanou vodou po rysku a důkladně promíchány. U první baňky byla provedena oxidace ethanolu za laboratorní teploty. Druhá baňka byla vložena do ultrazvukové lázně a třetí baňka byla vložena do vroucí vodní lázně.

Pro samotnou analýzu bylo z první 50 ml odměrné baňky, kde probíhala oxidace ethanolu za laboratorní teploty, v páté minutě odebráno potřebné množství vzorku do čisté a vysušené kádinky, aby bylo dosaženo přesné pipetáže. Z této kádinky byl poté odpipetován 1 ml roztoku do 50 ml baňky a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl nadávkován do izotachoforetického analyzátoru a byla provedena analýza. Stejným způsobem byla provedena analýza i u druhé 50 ml odměrné baňky, kde probíhala oxidace ethanolu za účinku ultrazvuku a u třetí 50 ml odměrné baňky, kde byla provedena oxidace za zvýšené teploty. Odběr potřebného množství vzorku pro samotnou analýzu byl dále proveden v 10., 20., 50., 100. a 200. minutě pro všechny probíhající oxidace v první, druhé a třetí baňce.

Izotachoforetické stanovení vzniklého množství kyseliny octové bylo provedeno v elektrolytovém systému I. Pro zjištění účinnosti konverze byla provedena analýza

standardního roztoku kyseliny octové o koncentraci 0,001 mol/l. Účinnost byla počítána podle následujícího vzorce:

$$\text{účinnost}(\%) = \frac{\frac{c_{st} \cdot l_{vzn}}{l_{st}}}{\frac{\rho_{EtOH} \cdot V_{EtOH}}{M_{EtOH} \cdot V_{celk} \cdot f_{zř}}} \cdot 100,$$

kde c_{st} je koncentrace standardního roztoku kyseliny octové, l_{st} je délka zóny standardního roztoku kyseliny octové, l_{vzn} je délka zóny vzniklé kyseliny octové po oxidaci ethanolu, ρ_{EtOH} je hustota ethanolu, V_{EtOH} je objem ethanolu, M_{EtOH} je molární hmotnost ethanolu, V_{celk} je objem odměrné baňky a $f_{zř}$ je faktor zředění.

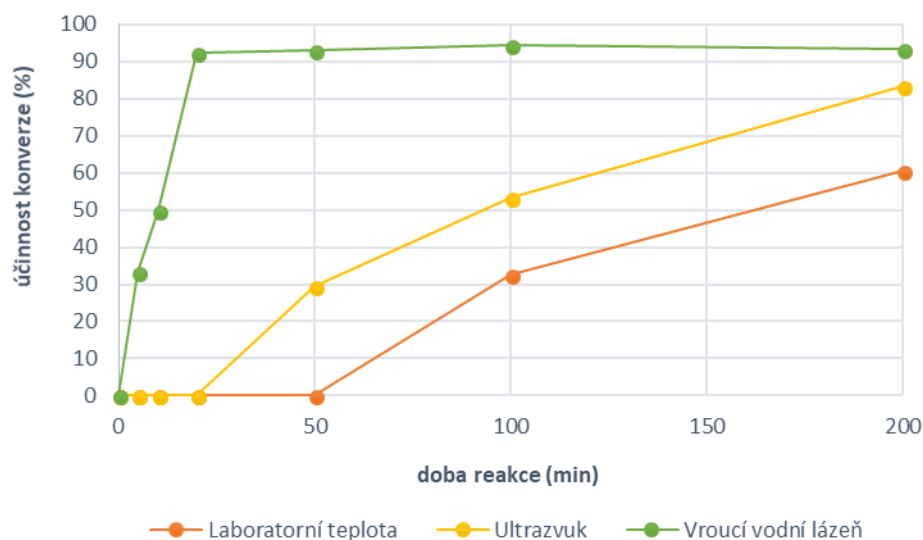


Obrázek 23: Oxidace ethanolu dichromanem draselným v kyselém prostředí



Obrázek 22: Oxidace ethanolu dichromanem draselným v kyselém prostředí ve vroucí vodní lázni

Z jednotlivých izotachforeogramů byly určeny délky zón vzniklé kyseliny octové a podle výše uvedeného vzorce byla spočítána účinnost konverze ethanolu na kyselinu octovou pro všechny způsoby oxidace. Vliv doby a podmínek reakce na účinnost konverze ethanolu je uveden v grafu 1.

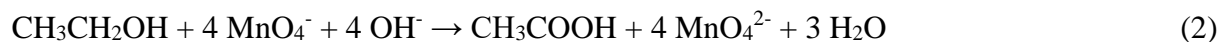


Graf 1: Závislost účinnosti konverze ethanolu na době a způsobu oxidace pro oxidaci dichromanem draselným v kyselém prostředí, elektrolytový systém: vedoucí elektrolyt 0,01 M HCl + β -alanin (pH 3,6), koncový elektrolyt 0,01 M 2-methylmásečná kyselina, předseparační kolona

Z grafických závislostí je patrné, že podmínky a doba oxidace výrazně ovlivňují rychlost a míru oxidace ethanolu na kyselinu octovou. Jako nejefektivnější způsob oxidace se jevila oxidace dichromanem za zvýšené teploty, kdy bylo dosaženo 92% účinnosti konverze během 20 minut. Při oxidaci dichromanem za laboratorní teploty a s využitím ultrazvuku nebylo dosaženo dostatečné konverze.

3.1.2 Oxidace ethanolu pomocí manganistanu draselného

Oxidace ethanolu pomocí manganistanu draselného v alkalickém prostředí za přítomnosti hydroxidu barnatého probíhá za vzniku kyseliny octové, mangananu draselného, mangananu barnatého a vody (viz rovnice 2).



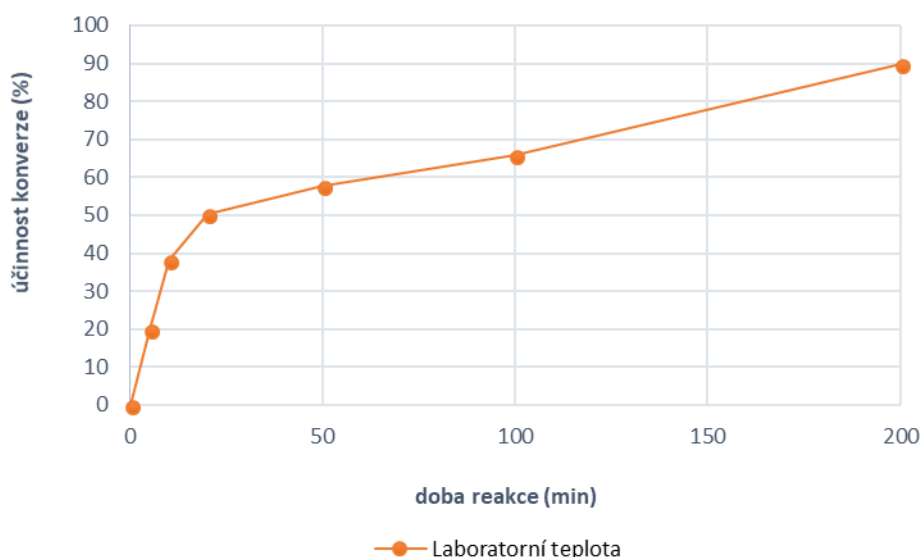
Reakční směs byla připravena v 50 ml odměrné baňce, do které bylo napipetováno 100 μl ethanolu a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rýsku. Obsah baňky byl převeden do kádinky, do které byl postupně za současného míchání přisypáván pevný hydroxid barnatý k úpravě pH na hodnotu 12. Následně byl obsah kádinky opět převeden do 50 ml odměrné baňky a bylo přidáno 0,8 g pevného manganistanu draselného. Reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě a v určitých časech (5, 10, 20, 50, 100 a 200

minut) byl odebrán vždy 1 ml do čisté 50 ml odměrné baňky, přidáván 3 % roztok peroxidu vodíku do odbarvení, a nakonec byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl dávkován do izotachforetického analyzátoru a byla zjišťována délka zóny kyseliny octové. V tomto případě byl k analýzám použit elektrolytový systém II.



Obrázek 24: Oxidace ethanolu manganistanem draselným v alkalickém prostředí

Pro zjištění účinnosti konverze byla provedena analýza standardního roztoku kyseliny octové o koncentraci 0,001 mol/l. Výťažnost byla vypočtena pomocí výše uvedeného vzorce. Vliv doby oxidace na účinnost konverze ethanolu je uveden v grafu 2.

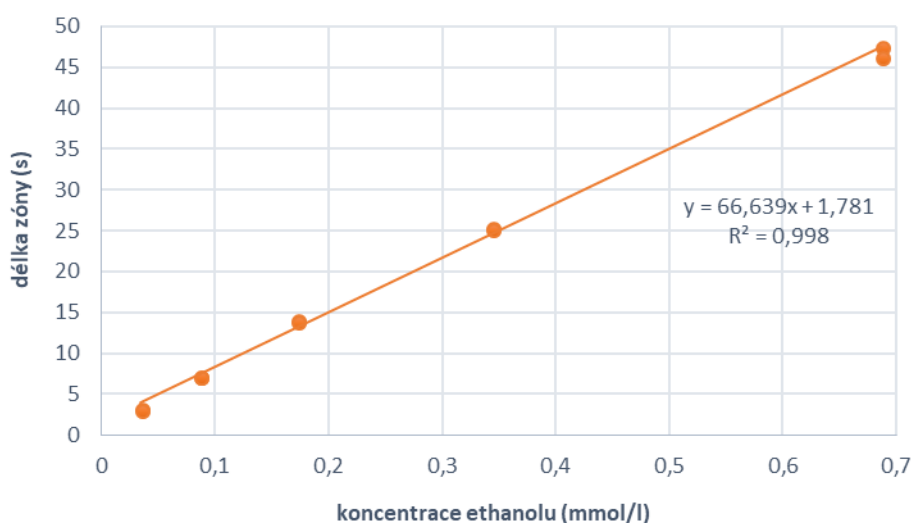


Graf 2: Závislost účinnosti konverze ethanolu na době oxidace při oxidaci manganistanem draselným v alkalickém prostředí, elektrolytový systém: vedoucí elektrolyt 0,01 M histidin-chlorid + histidin (pH 6,2), koncový elektrolyt 0,01 M MES, předseparační kolona

V případě oxidace manganistanem draselným v alkalickém prostředí bylo po 200 minutách reakce při laboratorní teplotě dosaženo 90% účinnosti konverze. Další výhodou tohoto způsobu oxidace bylo, že po zredukování nezreagovaného manganistanu peroxidem nebyl v záznamu kromě octanu přítomen žádný další iont, který by způsoboval prodloužení analýzy. Vzhledem k těmto faktům a také vzhledem k tomu, že při zahřívání roztoku může docházet k úniku kyseliny octové, byla pro další analýzy vybrána oxidace manganistanem draselným v alkalickém prostředí.

3.2 Stanovení parametrů metody

Pro tuto metodu stanovení ethanolu byla sestavena kalibrační křivka (graf 3) v rozmezí koncentrací 34 – 686 $\mu\text{mol/l}$, která v tomto rozmezí koncentrací vykazovala dobrou linearitu. Z prvních dvou bodů kalibrační přímky byly vypočteny meze detekce a stanovení. Mez stanovení, 13,1 $\mu\text{mol/l}$, byla určena jako koncentrace odpovídající délce zóny 1 sekunda a mez detekce, 4,4 $\mu\text{mol/l}$, odpovídá jedné třetině meze stanovení.



Graf 3: Kalibrační křivka ethanolu po konverzi na kyselinu octovou pomocí manganistanu draselného v alkalickém prostředí. Elektrolytový systém: vedoucí elektrolyt 0,01 M histidin-chlorid + histidin (pH 6,2), koncový elektrolyt 0,01 M MES, analytická kolona.

Dále byla určena opakovatelnost stanovení 2,94 %, jako relativní směrodatná odchylka deseti po sobě následujících měření roztoku konvertovaného ethanolu o koncentraci 172 $\mu\text{mol/l}$. Byla stanovena také výtěžnost metody pomocí stejného roztoku jako v případě opakovatelnosti dvěma metodami – metodou kalibrační křivky a metodou standardního přídatku. Pomocí metody kalibrační křivky byla zjištěna výtěžnost $109,3 \pm 1,2$ % a metodou

standardního přídatku $100,6 \pm 0,6$ %. Z těchto výsledků je patrné, že ke kvantifikaci je lepší použít metodu standardního přídatku, u které je výtěžnost bližší 100 %.

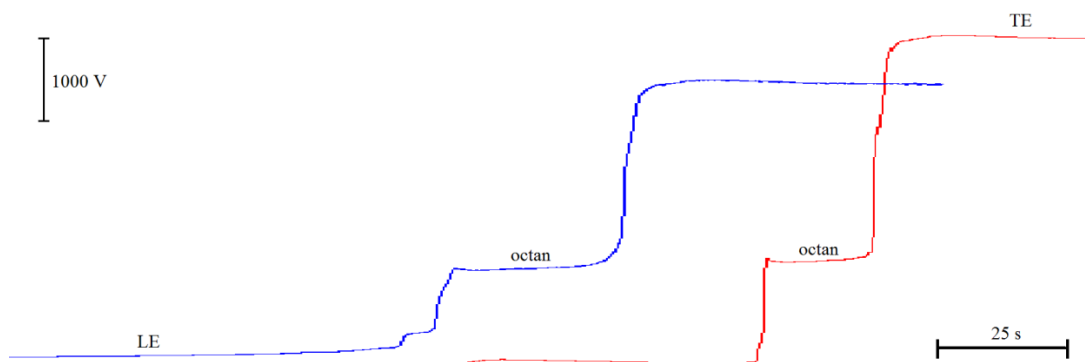
3.3 Analýza reálných vzorků

Vypracovaný postup byl odzkoušen na analýze reálných vzorků. Jako vzorky byly vybrány lihoviny obsahující poměrně vysoké množství ethanolu a neobsahující látky, které by mohly rušit stanovení. Všechny vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 5.6 Příprava reálných vzorků.

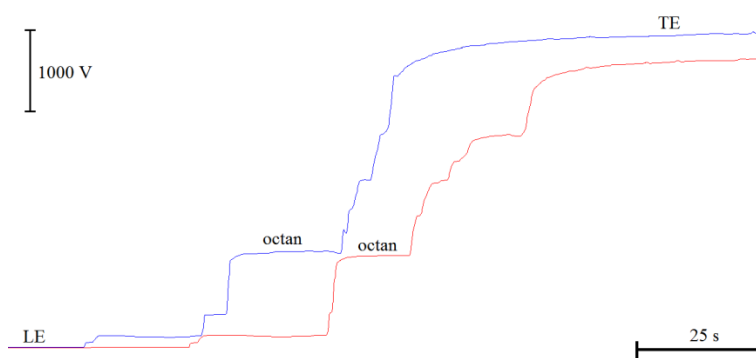
Získaná data byla kvantifikována pomocí metody kalibrační křivky (graf 3) a metody standardního přídatku. Pro každou metodu byla provedena dvě měření, ze kterých byla vypočtena směrodatná odchylka. Zjištěné obsahy ethanolu včetně výrobcem deklarovaných množství jsou uvedeny v tabulce 4. Z výsledků je patrné, že obě metody kvantifikace poskytují výsledky blízké deklarovanému obsahu. Experimentálně naměřené hodnoty délek zón jsou uvedeny v příloze v tabulce 5. Jednotlivé izotachforeogramy vzorků jsou znázorněny na obrázcích 14 – 18.

Tabulka 5 : Stanovený a deklarovaný obsah ethanolu ve vzorcích lihovin

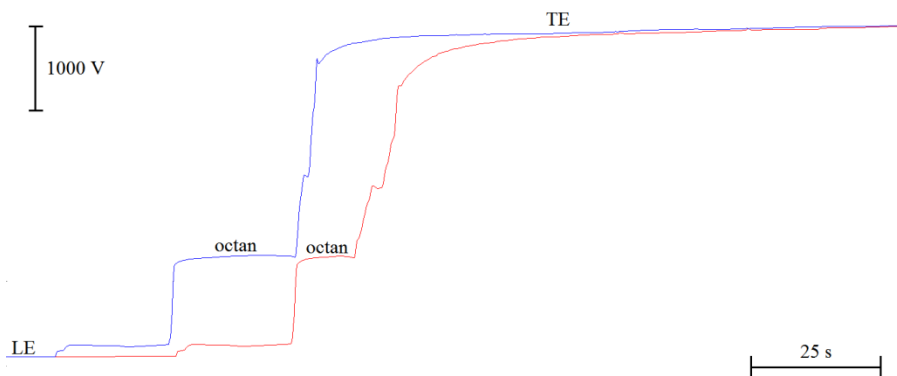
vzorek	stanovený obsah EtOH (% obj.)		deklarovaný obsah EtOH (% obj.)
	kalibrační křivka	standardní přídavek	
Skotská whisky	$40,06 \pm 0,86$	$41,80 \pm 0,22$	40
Slovenská borovička	$37,19 \pm 0,06$	$40,86 \pm 0,06$	40
Tuzemák	$28,39 \pm 0,24$	$35,10 \pm 0,33$	37,5
Pepermint	$18,78 \pm 0,14$	$20,26 \pm 0,28$	19
Mexická tequila	$38,42 \pm 0,29$	$38,16 \pm 0,11$	38



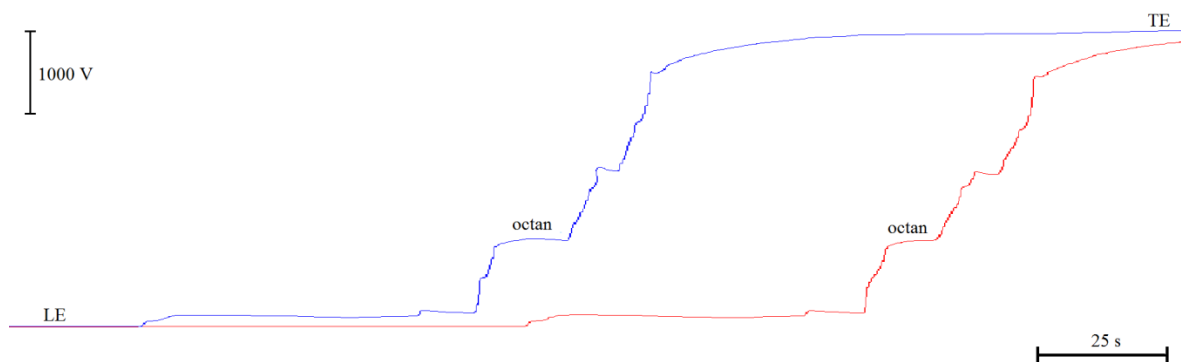
Obrázek 25: Izotachoforeogramy vzorku whisky – bez standardního přídavku (červená), se standardním přídavkem (modrá). Elektrolytový systém: LE: vedoucí elektrolyt 0,01 M histidin-chlorid + histidin (pH 6,2), TE: koncový elektrolyt 0,01 M MES, analytická kolona.



Obrázek 26: Izotachoforeogramy vzorku borovičky – bez standardního přídavku (červená), se standardním přídavkem (modrá). Elektrolytový systém: LE: vedoucí elektrolyt 0,01 M histidin-chlorid + histidin (pH 6,2), TE: koncový elektrolyt 0,01 M MES, analytická kolona.



Obrázek 27: Izotachoforeogramy vzorku tuzemáku – bez standardního přídavku (červená), se standardním přídavkem (modrá). Elektrolytový systém: LE: vedoucí elektrolyt 0,01 M histidin-chlorid + histidin (pH 6,2), TE: koncový elektrolyt 0,01 M MES, analytická kolona.



Obrázek 28: Izotachoforeogramy vzorku zelené – bez standardního přídavku (červená), se standardním přídavkem (modrá). Elektrolytový systém: LE: vedoucí elektrolyt 0,01 M histidin-chlorid + histidin (pH 6,2), TE: koncový elektrolyt 0,01 M MES, analytická kolona.



Obrázek 29: Izotachoforeogramy vzorku tequily – bez standardního přídavku (červená), se standardním přídavkem (modrá). Elektrolytový systém: LE: vedoucí elektrolyt 0,01 M histidin-chlorid + histidin (pH 6,2), TE: koncový elektrolyt 0,01 M MES, analytická kolona.

4 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá jak rešerší na téma základní charakteristika a stanovení vybraných alkoholů a glykolů v různých matricích, tak experimentální částí na téma izotachoforetické stanovení ethanolu.

V teoretické části této práce je uvedena základní charakteristika alkoholů. Alkoholy jsou jednou ze základních sloučenin v rámci organické chemie. Jedná se o deriváty uhlovodíků, které obsahují hydroxylovou skupinu. Podle počtu hydroxylových skupin dělíme alkoholy na primární, sekundární a terciární. V rámci této charakteristiky bylo také popsáno názvosloví alkoholů, fyzikální a fyziologické vlastnosti alkoholů, chemické vlastnosti a základní reaktivita alkoholů, kde byly popsány základní typy reakcí alkoholů se zvýšeným důrazem na oxidaci alkoholů.

Velká část této práce byla dále věnována metodám stanovení vybraných alkoholů a glykolů, konkrétně ethanolu, methanolu, propanolu a isopropanolu a ethylenglykolu. V rámci této části bylo nejvíce popsáno stanovení ethanolu.

V experimentální části se tato bakalářská práce zabývá izotachoforetickým stanovením ethanolu. Pro toto stanovení byly využity dvě různé metody. První metodou je oxidace ethanolu dichromanem draselným v kyselém prostředí na kyselinu octovou následovanou izotachoforetickým stanovením kyseliny octové za použití elektrolytického systému 0,01 mol/l kyseliny chlorovodíkové s přídavkem β -alaninu (pH 3,6) a kyseliny 2-methylmáslé o koncentraci 0,01 mol/l. Druhou metodou je oxidace ethanolu manganistanem draselným v alkalickém prostředí na kyselinu octovou a její izotachoforetické stanovení za použití elektrolytického systému 0,01 mol/l histidin-chlorid s přídavkem histidinu (pH 6,2) a MES o koncentraci 0,01 mol/l.

V rámci této části práce byly zjištěny optimální podmínky stanovení. Jako výhodnější metoda byla zvolena oxidace ethanolu manganistanem draselným v alkalickém prostředí. Tato metoda vykazovala dobrou účinnost konverze a po redukci nadbytečného manganistanu draselného 3% roztokem peroxidu vodíku byl i snížen obsah iontů nepříznivě ovlivňujících kapacitu analyzátoru ovlivňující tuto analýzu. Dále byly stanoveny parametry této metody. Mez detekce i mez stanovení se pohybovala v řádech $\mu\text{mol/l}$, opakovatelnost byla rovna přibližně 3 % a výtěžnost metody byla jak pro kalibrační křivku, tak pro standardní přídavek blízká 100 %. Nakonec byla provedena analýza vybraných reálných vzorků. Analýzou lihovin byly získány výsledky blízké a shodné s výrobcem deklarovaným množstvím ethanolu.

5 PŘÍLOHY

Tabulka 6: Oxidace ethanolu na kyselinu octovou pomocí dichromanu draselného v kyselém prostředí

čas reakce (min)	délka zóny (s)			účinnost konverze (%)		
	vroucí vodní lázeň	ultrazvuk	lab. teplota	vroucí vodní lázeň	ultrazvuk	lab. teplota
5	2,45	0,00	0,00	33,16	0,00	0,00
10	3,67	0,00	0,00	49,75	0,00	0,00
20	6,80	0,00	0,00	92,23	0,00	0,00
50	6,86	2,18	0,00	93,05	29,50	0,00
100	6,97	3,94	2,40	94,48	53,36	32,48
200	6,89	6,14	4,46	93,40	83,29	60,51

Tabulka 7: Oxidace ethanolu na kyselinu octovou pomocí manganistanu draselného v alkalickém prostředí

čas reakce (min)	délka zóny (s)	účinnost konverze (%)
	lab. teplota	lab. teplota
5	1,46	19,79
10	2,82	38,23
20	3,71	50,29
50	4,27	57,88
100	4,87	66,02
200	6,63	89,88

Tabulka 8: Kalibrační křivka

koncentrace ethanolu (mmol/l)	délka zóny (s)		průměr (s)	sm. odch. (s)
0,034	3,34	3,19	3,27	0,11
0,086	7,25	7,23	7,24	0,01
0,172	14,13	14,01	14,07	0,08
0,343	25,41	25,31	25,36	0,07
0,686	47,66	46,34	47,00	0,93

Tabulka 9: Reprodukovatelnost metody

č. měření	délka zóny (s)
1	14,17
2	14,41
3	14,09
4	13,95
5	14,09
6	13,25
7	13,35
8	13,86
9	13,65
10	13,30
průměr	13,81
sm. odchylka	0,41
RSD (%)	2,94

Tabulka 10: Výtěžnost metody

metoda	koncentrace ethanolu (mmol/l)	délka zóny (s)		průměr (s)	sm. odch. (s)
kal. křivka	0,172	14,43	14,22	14,33	0,15
st. přídavek	0,372	30,86	30,97	30,92	0,08
	koncentrace (mmol/l)	výtěžnost			
skutečná konc.	0,172	-			
zjištěná konc. (kalib.kř.)	0,188 ± 0,002	109,3 ± 1,2 %			
zjištěná konc. (stand.příd.)	0,173 ± 0,001	100,6 ± 0,6 %			

Tabulka 11: Analýza reálných vzorků

vzorek	metoda kvantifikace	délka zóny (s)		průměr (s)	sm. odch. (s)
whisky	bez příd.	15,74	15,71	15,73	0,02
	s příd. (0,343 mmol/l)	23,00	22,96	22,98	0,03
borovička	bez příd.	14,74	14,68	14,71	0,04
	s příd. (0,343 mmol/l)	22,02	21,96	21,99	0,04
tuzemák	bez příd.	11,76	11,54	11,65	0,16
	s příd. (0,343 mmol/l)	18,52	18,78	18,65	0,18
zelená	bez příd.	8,24	8,37	8,31	0,09
	s příd. (0,343 mmol/l)	16,40	16,73	16,57	0,23
tequila	bez příd.	15,15	15,13	15,14	0,01
	s příd. (0,343 mmol/l)	22,81	22,68	22,75	0,09

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HANUSEK, Jiří. *Organická chemie: Bakalářský studijní program*. 4. opr. vydání. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2014. ISBN 978-8-073-95762-9.
- [2] VACÍK, Jiří. *Přehled středoškolské chemie*. 4. vydání. Praha: SPN, 1999. ISBN 80-723510-8-7.
- [3] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=702. *PubChem: Ethanol* [online]. 2004 [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>
- [4] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=887. *PubChem: Methyl Alcohol* [online]. 2004 [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/887>
- [5] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1031. *PubChem: Propyl Alcohol* [online]. 2004 [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1031>
- [6] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3776. *PubChem: Isopropyl Alcohol* [online]. 2004 [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3776>
- [7] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=174. *PubChem: Ethylene Glycol* [online]. 2004 [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174>
- [8] BOČEK, Petr. *Analytická kapilární izotachoforéza*. Praha: Academia, 1987.
- [9] JANEČKOVÁ, Anna, KLOUDA, Pavel. *Organická chemie*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1998, ISBN 80-902155-6-4.
- [10] ROBERTS, John D., CASERIO, Marjorie C. *Basic Principles of Organic Chemistry*. 2nd ed. Menlo Park, CA: W. A. Benjamin, 1977. ISBN 0-8053-8329-8.

- [11] *Structure and Classification of Alcohols - Chemistry LibreTexts* [online]. [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/LibreTexts/Purdue/Purdue_Chem_26100:_Organic_Chemistry_I_\(Wenthold\)/Chapter_10:_Alcohols/10.1_Structure_and_Classification_of_Alcohols](https://chem.libretexts.org/LibreTexts/Purdue/Purdue_Chem_26100:_Organic_Chemistry_I_(Wenthold)/Chapter_10:_Alcohols/10.1_Structure_and_Classification_of_Alcohols).
- [12] BŘÍŽDALA, Jan. *E-ChemBook: Multimediální učebnice chemie: Organická chemie, Alkoholy, fenoly a ethery* [online]. [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/cz/organicka-chemie/Alkoholy-fenoly-a-ethery.pdf>.
- [13] ČERVINKA, O., DĚDEK, V., FERLES, M. *Organická chemie*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1980.
- [14] ROCHE, Alex Jonathan. *Reactions of Alcohols* [online]. [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: <https://crab.rutgers.edu/~alroche/Ch11.pdf>.
- [15] *Český lékopis 2009 - Doplněk 2015*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-5522-9.
- [16] MANZARDO, Ann. *Alcoholism: The facts*. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2008. ISBN 978-0-199-23139-3.
- [17] GIFFORD, Maria. *Alcoholism*. Santa Barbara: Greenwood Press/ABC-CLIO, 2010. ISBN 978-0-313-35908-8.
- [18] NOVOTNÝ, Jan Sebastian, KŘEMÉNKOVÁ, Lucie. Změny kognitivních emočních, motorických a sociálních procesů u jedinců s FASD. *Journal of FASD*. 2007, **1** (1). ISBN 1802-5250.
- [19] FOJTŮ, Naděžda. *Vliv alkoholu na vývoj dítěte*. Brno, 2010, 72 s. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta humanitních studií. Institut mezioborových studií Brno. Vedoucí práce: MUDr. Juraj Tkáč.
- [20] Zdraví a zdravotnictví. *Alkohol a těhotenství*. [online] [cit. 2018-02-20] Dostupný z: <http://www.zdrav.cz/modules.php?op=modload&name=News&file=article&sid=4717>

- [21] ZIMA, Tomáš. Fetální alkoholový syndrom. *Protialkoholní obzor*. 1994, **29** (1), s. 7–14. ISSN 0862-0350.
- [22] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL, 1977.
- [23] MEAD, Ralph N., CALA, John M., FELIX, J. David, SHIMIZU, Megumi S., CASAS, Matthew S., LATHROPE, Thomas, AVERY, G. Brooks, KIEBER, Robert J., WILLEY, Joan D. A static headspace GC-MS/MS method for the determination of ethanol, iso-butanol, and *n*-butanol at nanomolar concentrations in aqueous environmental samples. *Limnology and Oceanography: Methods*. 2017, **15** (12), s. 1007-1014. ISSN 1541-5856.
- [24] MOLAVI, Hoda, YOUSEFPOUR, Abbas, MIRMOSTAFA, Akbar, SABZI, Ali, HAMED, Sepideh, NARIMANI, Milad, ABDI, Nazanin. Static Headspace GC/MS Method for Determination of Methanol and Ethanol Contents, as the Degradation Markers of Solid Insulation Systems of Power Transformers. *Chromatographia*. 2017, **80** (7), s. 1129-1135. ISSN 1612-1112.
- [25] AVILA, Lorena Morine, DOS SANTOS, Amanda Pereira Franco, DE MATTOS, Danielle Ignácio Mançano, DE SOUZA, Cristiane Gimenes, DE ANDRADE, Débora França, D'AVILA, Luiz Antonio. Determination of ethanol in gasoline by high-performance liquid chromatography. *Fuel*. 2018, **212**, s. 236-239. ISSN 0016-2361.
- [26] MELICHAROVÁ, Šárka. *Stanovení vybraných látek v různých stádiích kvasného procesu medoviny*. Pardubice, 2016. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Katedra analytické chemie. Vedoucí práce: Soňa Řezková.
- [27] BARHOUMI, Lassaad, ISTRATE, Oana-Maria, ROTARIU, Lucian Ben, ALI, Mounir, BALA, Camelia. Amperometric Determination of Ethanol using a Novel Nanobiocomposite. *Analytical Letters*. 2017, **51** (3), s. 323-335. ISSN 0003-2719.

- [28] KUMAR, Manne Anupam, PATNAIK, Sai Gourang, LAKSHMINARAYANAN, V., RAMAMURTHY, Sai Sathish. Electrochemical Determination of Ethanol by a Palladium Modified Graphene Nanocomposite Glassy Carbon Electrode. *Analytical Letters*. 2016, **50** (2), s. 350-363. ISSN 0003-2719.
- [29] POLAN, Vojtěch, EISNER, Aleš, VYTRÁS, Karel. Simple and Rapid Determination of Ethanol Content in Beer Using an Amperometric Biosensor. *Chemosensors*. 2015, **3** (2), s. 169-177. ISSN 2227-9040.
- [30] ANGELONI, Riccardo, TOMASSETTI, Mauro, CASTRUCCI, Mauro, CAMPANELLA, Luigi. Ethanol Determination in Alcoholic Beverages Using Two Different Amperometric Enzyme Sensors. *Current Analytical Chemistry*. 2015, **11** (1), s. 56-67. ISSN 1875-6727.
- [31] WEN, Guangming, LI, Zhongping, CHOI, Martin M. F. Detection of ethanol in food: A new biosensor based on bacteria. *Journal of Food Engineering*. 2013, **118** (1), s. 56-61. ISSN 0260-8774.
- [32] PEREIRA, Polyana F., SOUSA, Raquel M. F., MUNOZ, Rodrigo A. A., RICHTER, Eduardo M. Simultaneous determination of ethanol and methanol in fuel ethanol using cyclic voltammetry. *Fuel*. 2013, **103**, s. 725-729. ISSN 0016-2361.
- [33] SECHOVCOVÁ, Hana. *Biosenzor pro stanovení ethanolu s alkoholdehydrogenázou a oxidem platičtým*. Pardubice, 2012. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Katedra analytické chemie. Vedoucí práce: Radovan Metelka.
- [34] FORTUNATO, Felipe M., VIEIRA, Alan L., GOMES NETO, José A., DONATI, George L., JONES, Bradley T. Expanding the potentialities of standard dilution analysis: Determination of ethanol in gasoline by Raman spectroscopy. *Microchemical Journal*. 2017, **133**, s. 76-80. ISSN 0026-265X.

- [35] ZURIARRAIN, Andoni, ZURIARRAIN, Juan, VILLAR, Mercedes, BERREGI, Iñaki. Quantitative determination of ethanol in cider by H-1 NMR spectrometry. *Food Control*. 2015, **50**, s. 758-762. ISSN 0956-7135.
- [36] CHOENGCHAN, Nathawut, POONTONG, Bangerdsuk, MATHAWEESANSURN, Arjnarong, MANEERAT, Noppadol, MOTOMIZU, Shoji, RATANAWIMARNWONG, Nuanlaor, NACAPRICHA, Duangjai. A “Dual-acceptor Channel” Membraneless Gas-diffusion Unit for Simultaneous Determination of Ethanol and Acetaldehyde in Liquors Using Reverse Flow Injection. *Analytical Sciences*. 2018, **34** (2), s. 169-175. ISSN 0910-6340.
- [37] PINYOU, Piyanut, YOUNGVISES, Napaporn, JAKMUNEE, Jaroon. Flow injection colorimetric method using acidic ceric nitrate as reagent for determination of ethanol. *Talanta*. 2011, **84** (3), s. 745-751. ISSN 0039-9140.
- [38] BASILE, Angelo, DALENA, Francesco. *Methanol: Science and Engineering*. Elsevier, 2017. ISBN 978-0-444-63903-5.
- [39] MA, Bo-Kai, GAO, Xia, LIU, Wei-Li, LIN, Yu-Qing. Simultaneous Determination of Six Residual Solvents in Topiroxostat by Headspace Gas Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2016, **10**, s. 1528-1532. ISSN 0253-3820.
- [40] BURSOVÁ, Miroslava, HLOŽEK, Tomáš, ČABALA, Radomír. Simultaneous Determination of Methanol, Ethanol and Formic Acid in Serum and Urine by Headspace GC-FID. *Journal of Analytical Toxicology*. 2015, **39** (9), s. 741-745. ISSN 0146-4760.
- [41] SCHLATTER, Joël., CHIADMI, Fouad., GANDON, V., CHARIOT, Patrick. Simultaneous determination of methanol, acetaldehyde, acetone, and ethanol in human blood by gas chromatography with flame ionization detection. *Human & Experimental Toxicology*. 2013, **33** (1), s. 74-80. ISSN 0960-3271.

- [42] HU, Hui-Chao, TIAN, Ying-Xin, JIN, Hui-Jun, CHAI, Xin-Sheng, BARNES, Donald G. A New Headspace Gas Chromatographic Method for the Determination of Methanol Content in Paper Materials Used for Food and Drink Packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, **61** (39), s. 9362-9365. ISSN 0021-8561.
- [43] YI, Xiong-Hai, GUO, De-Hua, DENG, Xiao-Jun, ZHU, Jian, FAN, Xiang, SHI, Jing-Yan. Determination of Methanol in Wines by Multidimensional Gas Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2011, **39** (5), s. 705-708. ISSN 0253-3820.
- [44] YI, Xiong-Hai, GUO, De-Hua, DENG, Xiao-Jun, LI, Bo, FAN, Xiang, ZHU, Jian. Determination of Methanol in Cosmetics by Headspace and Multidimensional Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection. *Journal of AOAC International*. 2011, **94** (2), s. 655-659. ISSN 1060-3271.
- [45] ZEREN, Cem, ACIKGÖZ, Gunez, SÜLEYMAN, Kahraman. Using Raman Spectroscopy for Determination Methanol Quantity in Illegal Alcoholic Beverages. *Spectroscopy and Spectral Analysis*. 2017, **37** (9), s. 2979-2983. ISSN 1000-0593.
- [46] YANG, YanRong, REN, Yufen, DONG, Guimei, YANG, Renjie, LIU, Hai-xue, DU, Yuhong, ZHANG, Weiju. Determination of Methanol in Alcoholic Beverages by Two-Dimensional Near-Infrared Correlation Spectroscopy. *Analytical Letters*. 2016, **49** (14), s. 2279-2289. ISSN 0003-2719.
- [47] MOUSAVI, Zeinab, BENVIDI, Ali, JAHANBANI, Shahriar, MAZLOUM-ARDAKANI, Mohammad, VAFAZADEH, Rasoul, ZARE, Hamid R. Investigation of Electrochemical Oxidation of Methanol at a Carbon Paste Electrode Modified with Ni(II)-BS Complex and Reduced Graphene Oxide Nano Sheets. *Electroanalysis*. 2016, **28** (12), s. 2985-2992. ISSN 1040-0397.
- [48] TŮMA, Petr, OPEKAR, František. Contactless conductometric determination of methanol and ethanol in samples containing water after their electrophoretic desalination. *Electrophoresis*. 2015, **36** (16), s. 1976-1981. ISSN 0173-0835.

- [49] WEN, Guangming, WEN, Xiangping, SHUANG, Shaomin, CHOI, Martin M. F. Whole-cell biosensor for determination of methanol. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014, **201**, s. 586-591. ISSN 0925-4005.
- [50] LI, Yong-Sheng, MO, La-Mei, GAO, Xiu-Feng. Direct automatic determination of the methanol content in red wines based on the temperature effect of the $\text{KMnO}_4/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ /fuchsin sodium sulfite reaction system. *RSC Advances*. 2018, **8** (15), s. 8426-8434. ISSN 2046-2069.
- [51] SIERRA, José F., DE PEDRO, Marta, DE MARCOS, Susana, GALBÁN, J., CASTILLO, Juan R., UBIDE, C. Simultaneous determination of propanol and butanol by a fluorometric enzymatic method based on the intrinsic fluorescence of the enzyme. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1999, **363** (7), s. 713-715. ISSN 0937-0633.
- [52] CHIEN, Po-Jen, SUZUKI, Takuma, TSUJII, Masato, YE, Ming, TOMA, Koji, ARAKAWA, Takahiro, IWASAKI, Yasuhiko, MITSUBAYASHI, Kohji. Bio-sniffer (gas-phase biosensor) with secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH) for determination of isopropanol in exhaled air as a potential volatile biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017, **91**, s. 341-346. ISSN 0956-5663.
- [53] ZOU, Rui Fen, CAO, Zhong, ZENG, Ju Lan, DAI, Yun Lin, SUN, Li Xian. Characteristics and Mechanism for Host–Guest Recognition of Isopropanol Vapor Based on Calixarene Supramolecules. *Advanced Materials Research*. 2011, **239-242**, s. 2050-2053. ISSN 1662-8985.
- [54] ROBSON, James, TOWNSEND, Stephen, BOWDLER, Paul, HONEYCHURCH, Kevin C. Direct thermal desorption gas chromatographic determination of toxicologically relevant concentrations of ethylene glycol in whole blood. *The Analyst*. 2018, **143** (4), s. 963-969. ISSN 0003-2654.
- [55] YU, Haili, LONG, Dengying. Visual and colorimetric detection of ethylene glycol based on freeze-thawing induced aggregation of silver nanoparticles. *Microchimica Acta*. 2017, **184** (3), s. 915-919. ISSN 0026-3672.

- [56] WEI, Ziping, BILBULIAN, Susanna, LI, Jingning, PANDEY, Ratnesh, O'CONNOR, Ellen, CASAS-FINET, Jose, CASH, Patricia W. Universal method for the determination of nonionic surfactant content in the presence of protein. *Journal of Separation Science*. 2015, **38** (8), s. 1318-1325. ISSN 1615-9306.
- [57] GRAS, Kaelyn, LUONG, Jim, LIN, Monica, GRAS, Ronda, HELLIE, Robert A. Determination of ethylene glycol in lubricants by derivatization static headspace gas chromatography. *Analytical Methods*. 2015, **7** (13), s. 5545-5550. ISSN 1759-9660.
- [58] WURITA, Amin, SUZUKI, Osamu, HASEGAWA, Koutaro, GONMORI, Kunio, MINAKATA, Kayoko, YAMAGISHI, Itaru, NOZAWA, Hideki, WATANABE, Kanako. Sensitive determination of ethylene glycol, propylene glycol and diethylene glycol in human whole blood by isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry, and the presence of appreciable amounts of the glycols in blood of healthy subjects. *Forensic Toxicology*. 2013, **31** (2), s. 272-280. ISSN 1860-8965.
- [59] MEYER, Markus R., WEBER, Armin A., MAURER, Hans H. A validated GC-MS procedure for fast, simple, and cost-effective quantification of glycols and GHB in human plasma and their identification in urine and plasma developed for emergency toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, **400** (2), s. 411-414. ISSN 1618-2642.