

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**



ANALÝZA FURANŮ V POTRAVINÁCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Petr Doležal

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2010

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Rád bych tímto poděkoval panu Doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a za jeho cenné rady a zkušenosti v průběhu celého vypracování, zejména experimentální části.

Také bych chtěl poděkovat kolektivu Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci za jejich obětavý přístup při mém nekonečném měření experimentální části.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Výskyt senzoricky aktivních látek v potravinách.....	2
2.1.1 Aromatické látky v potravinách	2
2.1.2 Maillardova reakce	3
2.1.2.1 Vlivy podporující Maillardovu reakci a vznik produktů.....	5
2.2 Víno a jeho charakteristika	8
2.2.1 Třídění vína	8
2.2.2 Fortifikovaná vína.....	9
2.2.3 Hlavní druhy fortifikovaných vín	9
2.2.3.1 Portské víno	10
2.2.3.2 Španělské Sherry	10
2.2.3.3 Madeira.....	12
2.2.3.4 České fortifikované víno – Mistelle de Muscat.....	12
2.2.4 Deriváty furanu a jejich vliv na vůni vína	14
2.2.4.1 Chemický popis furanů a laktonů.....	14
2.2.5 Přehled zkoumaných látek ve víně	15
2.2.5.1 Sotolon.....	16
2.2.5.2 2-furfural a 5-(hydroxymethyl)furfural	18
2.2.5.3 2-furfurylalkohol, 4-karboethoxybutyrolakton.....	19
2.3 Kritický pohled na zjištění těkavých složek vína.....	20
2.3.1 Senzorická analýza vína	20
2.4 Chemická separace a analýza těkavých látek ve víně	22
2.4.1 Izolace těkavých sloučenin vína – extrakce	22
2.4.2 Metoda SMPE (mikroextrakce tuhou fází).....	23
2.4.3 Chromatografie	24
2.4.3.1 Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC/MS).....	26
2.4.3.2 Plynová chromatografie s plamen. ioniz. detektorem (GC-FID)	26
2.4.3.3 Plynová chromatografie s olfaktom. detektorem (GC-O)	27

2.4.3.4	Elektronický nos	28
2.4.5	Příklady typických stanovení těkavých podílů vína	28
2.4.6	Metody vyhodnocení obsahu látek	30
3.	PRAKTICKÁ ČÁST	32
3.1	Vzorky a provedení experimentu	32
3.2	Použité vzorky vína, chemikálie, pomůcky, přístroje	32
3.3	Příprava vzorku k měření.....	33
3.4	Provedení analýzy a nastavení přístroje GC/MS	34
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	35
4.1	Zhodnocení kvalitativní analýzy standardů furanových derivátů.....	35
4.1.1	Hmotnostní spektrum Sotolonu	36
4.1.2	Hmotnostní spektrum Furfuralu	36
4.1.3	Hmotnostní spektrum 2-furfurylalkoholu.....	37
4.1.4	Hmotnostní spektra 5-HMF a 4-COBL	38
4.2	Zhodnocení počáteční analýzy derivátu furanů	39
4.2.1	Kvalitativní zhodnocení chromatogramu vína	41
4.3	Vlastní chemická analýza vzorků vín	44
4.3.1	Kvantitativní metoda kalibrační křivky	44
4.3.2	Kvantitativní metoda pomocí vnitřního standardu	45
5.	ZÁVĚR	47
6.	CITACE.....	48
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52
8.	PŘÍLOHY	54

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na studium analýzy furanů v potravinách, pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním detekcí (GC/MS). Hlavní náplň práce pojednává o analýze pěti sloučenin ovlivňující aroma fortifikovaných vín: sotolon, 2-furfural (2-FF), 2-furfurylalkohol (2-FF-OH), 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) a 4-karbethoxybutyrolakton (4-COBL).

Vzorky vín (10 ml) byly extrahovány do 1 ml dichlormethanu (CH_2Cl_2) a analyzovány na GC/MS s ionizací elektronem (EI). Kvantitativní vyhodnocení metodou kalibrační závislosti bylo porovnáno s výsledky metody vnitřního standardu (IS). Množství jednotlivých furanů bylo stanoveno v rozmezí od jednotek do stovek $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Cíl práce byl vývin účinné metody, která by pomohla k přesné analýze vybraných těkavých derivátů furanů ve víně.

SUMMARY

This thesis is focused on the analysis of furans in foods by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The main content this work deals with the analysis of five major compounds that affect of flavor fortified wines: sotolone, 2-furfural (2-FF), 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), 4-carbethoxybutyrolactone (4-COBL), 2-furanmethanol (2-FF-OH).

Wine samples (10 ml) were extracted with 1 ml of dichloromethane (CH_2Cl_2) and analyzed by GC/MS with electron impact ionization (EI). Quantitative dependence method was compared with results from method of internal standard (IS). Quantities of furans were established in the range of units to hundreds $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Development of the effective method accurate analysis of selected volatile furans derivatives in wine was the main purpose of this study.

1. ÚVOD

Aroma potravin je výsledek celého komplexu nepřeberného množství chemických látek, které působí na naše smyslové receptory. Díky těmto rozeznávacím schopnostem můžeme již při prvním kontaktu s potravinou usuzovat o její kvalitě, čerstvosti či stáří. Vzájemná souhra všech složek v pochutině nám prozradí mnohé důležité informace o typických vlastnostech vzniklého produktu. Určování základních organoleptických parametrů v potravinářském průmyslu má velký vliv na distribuci, potažmo i zájem koncového zákazníka o daný výrobek.

Víno je jedním z nejvýznamnějších produktů kulturního a společenského života již od nejstarších dob. Jeho kvalita je závislá na všech krocích výrobní technologie, počínaje vysazením vinné révy na vinicích, jdoucí přes nejrůznější chemické procesy a u skladování žádané tekutiny konče. Tento lahodný alkoholický nápoj v sobě ukrývá velmi pestrou směsici nejrůznějších organických sloučenin, které musí být navzájem sladěné v dokonalou harmonii. Množství a účinek všech senzoricky aktivních látek ve víně bývá hodnoceno odbornými posudky tzv. degustátorskými zkouškami.

Pro zpřesnění informací o kvalitě a množství těkavých složek ve víně se staly nezastupitelným pomocníkem analytické metody, jejichž význam vzrostl v posledních desetiletích. Díky nim jsme dnes schopni s určitou přesností stanovit širokou škálu látek s požadovanou citlivostí. Z důvodu nízkých koncentrací sledovaných substancí a s ohledem na složitost analyzované tekutiny, je důležité vybrat vhodnou metodu zakoncentrování analytů, za kterou následuje účinná metoda separace a ukončenou požadovanou formou detekce.

Cílem předkládané diplomové práce je v první řadě uvedení do problematiky přítomnosti senzoricky aktivních látek v potravinách. Následující statě zhodnocují nejpoužívanější techniky analýzy derivátů furanu ve víně.

V další části je práce zaměřena na vývoj metody úpravu vzorku pro analýzu vybraných těkavých sloučenin a následnému stanovení pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Výskyt senzoricky aktivních látek v potravinách

Důležitou součástí každé potraviny jsou senzoricky aktivní látky (SAL) působící na naše smyslové receptory. Z obecného hlediska se jedná o systém počitků, které vnímáme všemi smysly, tedy čichem (olfaktometrické), chutí (gustrativní), zrakem (vizuální) či hmatem (haptické). Prostřednictvím těchto schopností můžeme tak rozpoznávat jednotlivé organoleptické vlastnosti potravin týkající se vůně, chuti, barvy nebo textury. Získaný celkový dojem z pochutiny je nepostradatelným parametrem přispívajícím k zájmu zákazníka o finální výrobek, a to již při prvním kontaktu. Podle původu lze SAL rozdělit do dvou skupin.

Primární SAL bývají produkty prvotních metabolismů. Jejich rozmanitost a množství závisí na dispozicích daného organismu. V rostlinné říši mají velkou zásluhu vnější vlivy, Jedná se o zeměpisnou lokalitu, stáří, vegetační stupeň, dobu sklizně či další environmentální faktory týkající se dostačující vláhky, půdních živin, světla, tepla apod.

Druhou skupinou jsou sekundární SAL, které se vyskytují na počátku úpravy pokrmu ve vázané, netěkavé podobě nebo ve formě prekursoru¹. Vlastní vznik pak souvisí s technologií výrobního procesu, jenž usnadňuje působení endogenních enzymatických či neenzymatických reakcí bílkovin, tuků či sacharidů. Na tvorbě a uvolňování SAL se z velké míry podílí vlivy během skladování: vlhkost, teplota, vystavení slunečnímu svitu apod.

V průběhu technologického postupu probíhají významné biochemické procesy (např.: kvašení), případně zpracování za vyšší teploty (pečení a smažení). Tímto zásahem jsou v potravinách podporovány především reakce autokatalyzační a Maillardova (odst. 1.2.1.).

Obdobným způsobem bychom mohli rozdělit i vznik zbarvení a textury produktu.[1,2]

2.1.1 Aromatické látky v potravinách

Skupina látek, působící na naše čichové a chuťové receptory, bývá označována souhrnným názvem aroma, přestože v nich jsou značné rozdíly. Vonné látky mají těkavý charakter, zpravidla jsou málo polárními nebo nepolárními a ve vodě omezeně rozpustné. Naproti tomu chuťové látky jsou vesměs netěkavé, ve vodě dobře rozpustné, polární

¹ Prekursor = výchozí sloučenina poskytující vlivem chemické reakce specifickou sloučeninu

sloučeniny. Jistou hranicí mezi těmito dvěma skupinami jsou aromatické látky ovlivňující zároveň naše chuťové a čichové smysly.

Běžně se v potravinách vyskytuje několik set nejrozličnějších vonných látek, ovšem řada z nich se na tvorbě vlastního aroma nepodílí. V ojedinělých případech může být ze vůni zodpovědná jedna nebo několik málo substancí s typickou vůní pro daný produkt, tzv. klíčová složka vůně (např. geraniol v muškátovém oříšku). Nutno podotknout, že těkavé látky v potravinách nemusí být jen příjemně vonícího charakteru. V mnoha případech tak záleží především na subjektivním posouzení. Mezi nejvýznamnější primární těkavé látky v potravinách řadíme terpeny, jejichž stavební jednotkou je isopren [3].

Během celého výrobního postupu vznikají látky sekundární, na jejichž tvorbu mají velký vliv fermentační, degradační, oxidační a termicky podporované procesy (např.: Maillardova reakce).

Všechny výše popsané druhy aromat musí být v konečné fázi v dokonalé vyváženosti, aby daný produkt nejenže odpovídal příslušné normě, ale aby se stal i předmětem zájmu kupujícího zákazníka v běžném obchodě. Na dokonalém harmonickém souznění všech aromatických látek je závislý i trh s vínem.

2.1.2 Maillardova reakce

Maillardova reakce (MR) byla už v 60. letech minulého století uznána za jednu z klíčových cest k získání typického aroma potravin [4]. Produkty reakce dávají potravinám lákavější vzhled, charakteristickou chuť i vůni. Díky jejímu působení má například pivo svou typicky zlatavou barvu; pečené či smažené pochutiny získávají své charakteristické aroma i hnědé zbarvení. Odtud také pochází označení – reakce neenzymatického hnědnutí.

J. E. Hodge v roce 1953 rozdělil reakci do několika skupin podle barvy produktů a absorbování UV paprsků (dle Schéma I.).

1. Počáteční stav: Bezbarvý produkt, bez absorpce v UV oblasti (asi 280nm)

Reakce A: Reakce sacharidů s aminosloučeninami

Reakce B: Amadoriho přesmyk

2. Mezistupeň: Produkty bezbarvé nebo žluté se silnou absorpcí v UV oblasti

Reakce C: Dehydratace cukru

Reakce D: Fragmentace cukru

Reakce E: Degradace aminokyselin (Streckerova degradace)

3. Koncový stupeň: Produkty velmi zbarvené

Reakce F: Aldolová kondenzace

Reakce G: Kondenzace aldehydů s AMS a tvorba heterocyklických sloučenin

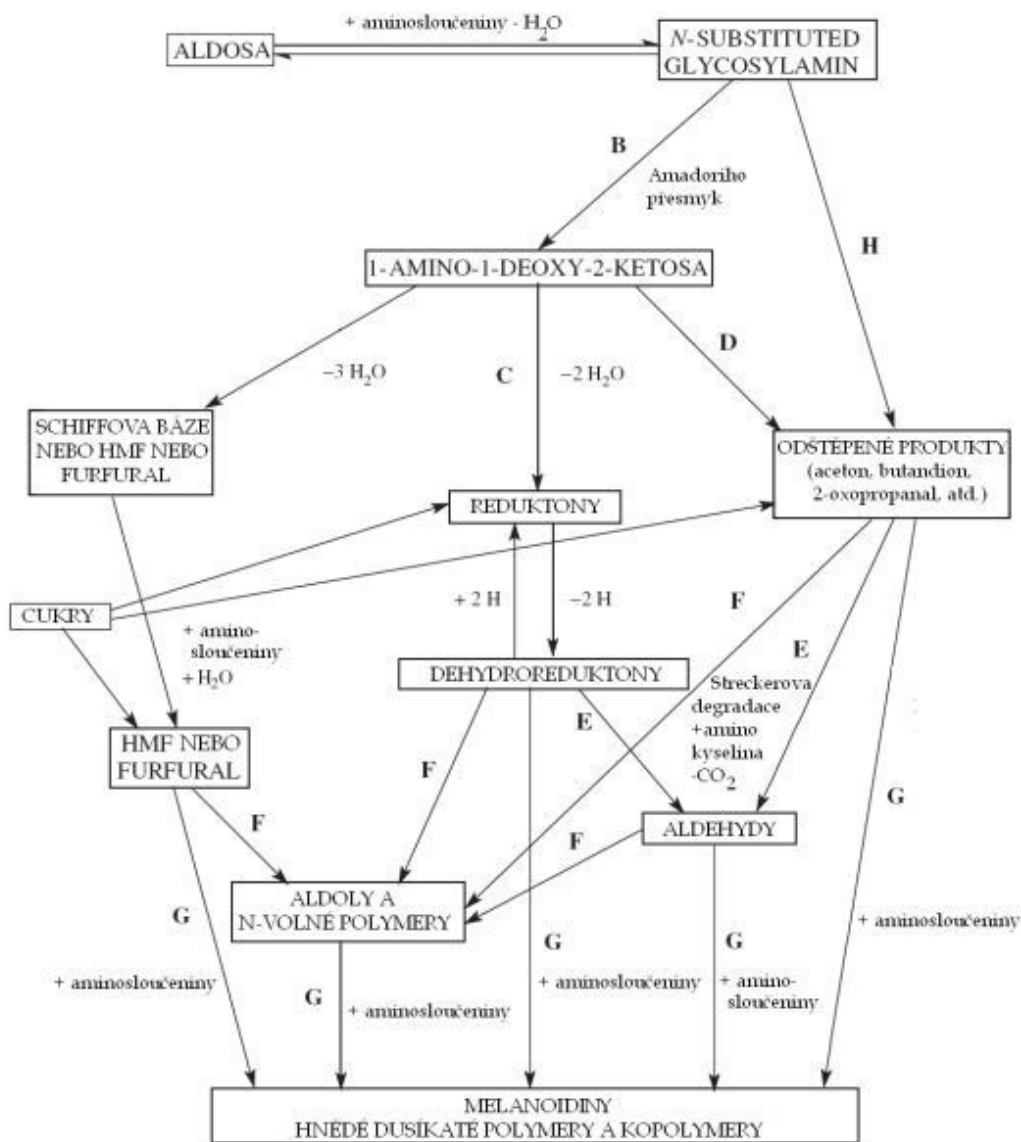


Schéma I: Neenzymatické hnědnutí na základě Hodgeova rozdělení.^{II}

Z chemického hlediska se jedná o nepřeborný soubor neenzymatických reakcí, při nichž spolu interagují redukující sacharidy (glukóza, maltóza, xylóza atd.) a aminosloučeniny

^{II} Redukton = sloučenina obsahující endiolové skupiny stabilizované mezomerními stavy a vodíkovými můstky. Jsou to velice silná redukční činidla, silné kyseliny. Často odvozené od sacharidů. Např. askorbovou kyselinu.

z bílkovin. Především se jedná o reakce α - a ε -aminoskupiny volných aminokyselin (u proteinů a peptidů N-koncové α -aminoskupiny). Produktem reakce produkuje N-substituovaný glykosylamin z něhož přesmykem a dehydratací vznikne 5-furfural a další jeho deriváty; hydroxyketony a dikarbonylové sloučeniny.

Dalším krokem je vznik iminů tzv. Schiffových bází, které v kyselém prostředí vlivem Amadoriho přesmyku přechází na 1-amino-1-deoxy-2-ketosy (Schéma II.), která účinkem teploty přechází v keto-enol tautomery. Ta může tvořit dvě řady izomerů, jež jsou důležitými meziprodukty MR [5].

Vzniklé Schiffovné báze dále postupně ztrácí imino skupinu a tři molekuly vody. Tato reakční cesta se také nazývá jako „reakce furfuralu“, při níž jako hlavní produkt vzniká 5-furfural (Schéma III). Pokud však v předposledním kroku ztratí ještě jednu molekulu vody a dále reaguje s přítomnými AMK, vznikají tak konečné fázi produkty zodpovědné za zbarvení výrobku [6].

Následuje Streckerova degradace aminokyselin (AMK). Tato cesta vede ke vzniku aldehydů, α -aminoketonů a aminoalkoholů během dekarboxylace a deaminace AMK.

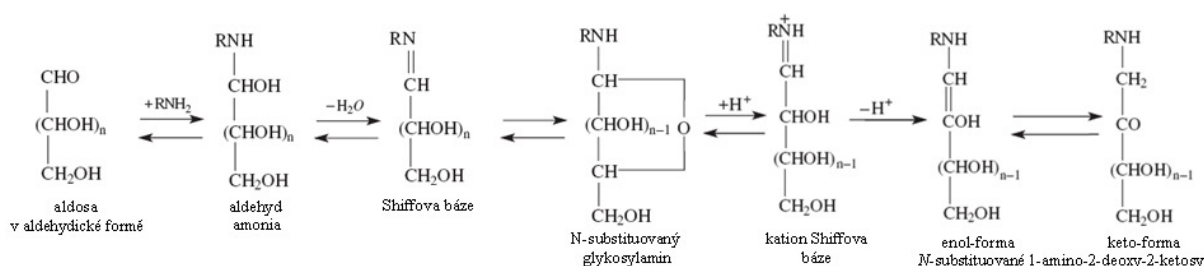


Schéma II: Maillardova reakce (vznik N-substituovaného glykosylaminu a produktu Amadoriho přesmyku: N-substituovaný 1-amino-2-deoxy-2-ketosa)

2.1.2.1 Vlivy podporující Maillardovu reakci a vznik produktů

Hlavními vlivy podporující MR jsou: zvýšená teplota, doba reakce (potažmo způsob skladování), pH prostředí, aktivita vody, množství a dostupnost reaktantů apod. Již při pokojové teplotě se tvoří velmi reaktivní sloučeniny, které reagují s dalšími komponenty, např. s aminy, AMK, aldehydy, sirovodíkem a amoniakem. Právě tyto interakce jsou velice důležité pro vznik sekundárních SAL – heterocyklů: pyrazinů, pyrrolů, furanů, oxazolů, thiazolů a thiofenolů (Schéma III.).

V případě, že budeme při přípravě pochutiny dále zvyšovat teplotu, bude MR přecházet v karamelizaci. Velmi důležitou roli zde hraje i hodnota pH. Optimální podmínky pro MR jsou při teplotě nad 50 °C a kyslejší pH 4-7. Naproti tomu karamelizace vyžaduje vyšší teplotu (nad 130 °C) a pH 9-3. Tvorba konečných produktů je tak závislá na tom, který z činitelů bude převažovat [7]. V konečné fázi reakce může docházet až ke vzniku tmavého zbarvení, kdy z finální produkty jsou vysoko polymerní pigmenty, tzv. melanoidiny.

Jednotlivé charakteristiky a vlivy na MR byly rozebrány v mnohých odborných publikacích a monografiích [8-10].

Nevýhodou procesu MR je i fakt, že dává také možnost vzniku velmi toxických látek např. neurotoxický akrylamid či cytotoxický 5-hydroxymetylfurfural. Z toho důvodu bývají obsahy některých tox striktně monitorovány. V posledních letech byl zkoumán fyziologický i význam produktů in-vivo ve vztahu k diabetickým a kardiovaskulárním onemocněním. Výsledky testů prokázaly jasnou souvislost s jejich přítomností ve stravě [11].

Všechny zmíněné skupiny produktů přispívají k typickému aroma potravin, např. pečeného masa, čokolády nebo pronikavému aroma pražené kávy [12,13].

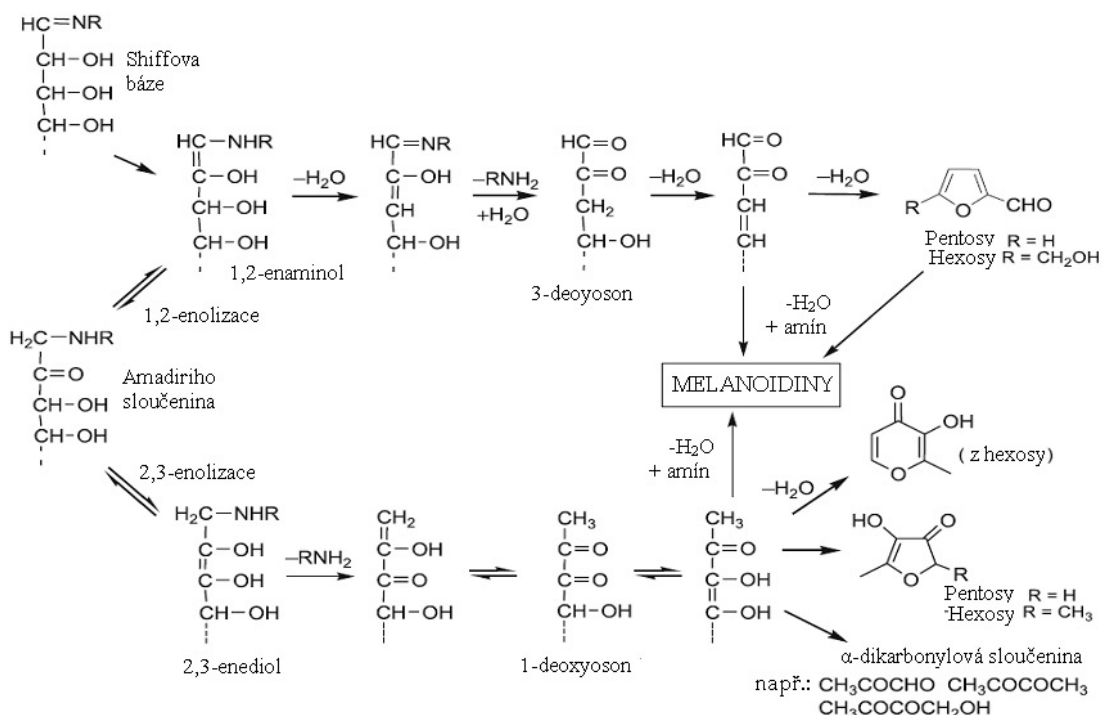


Schéma III: Mezistupeň MR pro vznik melanoidinů a karbonylových sloučenin

Z výše uvedených údajů vyplývá, že celkový popis Maillardovy reakce je natolik složitý, že by to přesáhlo rámec diplomové práce. Navíc většina reakčních mechanismů a tvorba produktů není dodnes zcela objasněna. Z toho důvodu se zde omezím pouze na tento zevrubný popis reakce vedoucí ke vzniku sekundárních SAL, přičemž hlavní pozornost dále bude věnována těkavým furanovým derivátům, které tvoří jednu z klíčových složek při hodnocení kvality vína.

2.2 Víno a jeho charakteristika

K docenění kvality všech složek nejstaršího kulturního nápoje je zapotřebí nejen odborných popisů zprostředkovaných vjemů, ale i hlubší proniknutí do spektra látek, které jsou množství vyvolaných požitků zodpovědné. Jednotlivé charakteristiky vína se liší odrůdou révy vinné (*Vitis vinifera*), stupněm zralosti a technologií zpracování (kvašení, zrání).

V porovnání s ostatními kvašenými nápoji, jsou vína kyselější povahy (pH 2,7–3,8), mají relativně vysoký obsah alkoholu, jehož koncentrace závisí na stupni fermentace nebo případném „dolihování.“ U klasických tichých vín se obsah ethanolu pohybuje v rozmezí 8,5–15%. Pro likérová, aromatizovaná vína nabývá vyšší hodnoty, kolem 14–22%. Množství lihu v nápoji má velký vliv na intenzitu výsledného aroma. [12, 14].

Termín aroma se (dle Clarke R. J. 2004) nejčastěji používá k popisu vůní získaných z hroznů, tedy během zrání na vinicích. Zato pojem buket označuje soubor všech vůní, jež víno získává až během výrobní technologie, případně následného zrání [15].

2.2.1 Třídění vína

Vína se dají rozlišovat podle několika klasifikací. Základní členění je podle druhu a kvality na vína tichá, šumivá a vína originální certifikace.

Skupina tichých vín zahrnuje vína stolní, zemská, jakostní (jakostní odrůdové, jakostní známkové), s přívlastkem (kabinetní víno, pozdní sběr, výběr z hroznů, výběr z bobulí, výběr z cibéb, ledové a slámové víno). Podle zbytkové cukernatosti lze tichá vína dělit na suchá, polosuchá, polosladká a sladká (Tabulka I.). Své členění mají i šumivá vína [12].

Čistě přírodní vína jsou speciálně vyrobené druhy (bez chemického zásahu). Do této kategorie náleží vína mešní a košer, jejichž výroba je sledovaná příslušnými církevními institucemi. Mezi dalšími bychom mohli najít i vína aromatizovaná či likérová spadající do skupiny fortifikovaných. Přesnou taxonomii vín lze dohledat české legislativě [17].

Druh vína	Obsah zbytkového cukru [g.l ⁻¹]
suché	do 4,0
polosuché	4,1 – 12
polosladké	12,1 - 45
sladké	min. 45

Tabulka I: Rozdělení vín podle zbytkového cukru

2.2.2 Fortifikovaná vína

Fortifikovaná neboli dolihovaná vína hrají ve vinařském světě nepostradatelnou roli. Jedná se přitom o speciální postup vinifikace, kdy se na začátku (tzv. mutage), v průběhu kvašení (časné dolihování) nebo až na konci fermentace (pozdní fortifikace) přidává do rmutu^{III} vysokoprocentní etanol (70 až 80%) vyrobeného z místních vín – vínovice nebo brandy.

Do skupiny přírodních fortifikovaných vín se etanol přidává přímo do kvasícího moštu, a to ve chvíli, kdy hladina zbytkového cukru dosáhne koncentrace 90 g.l⁻¹. Zpravidla se dolihovává na 16 až 22 %. Přítomné kvasinky při tak vysoké koncentraci alkoholu nemají vhodné podmínky pro svou existenci, čímž je jejich činnost přeměny cukru na etanol zastaví.

Druhou skupinou jsou vína aromatizovaná. Do nich se kromě alkoholu přidávají i různá aditiva přispívající ke zvýraznění požadovaných vlastností konečných produktů. Jedná se přitom o legislativou povolena dochucovadla, výtažky z různých koření, ovocné plody, barviva apod. Pro dosazení nebo zahuštění se do některých druhů navíc přidává glukóza, příp. sacharóza. Vlivem tohoto zásahu se zaručuje možnost utváření nových aromatických látek, jejichž tvorba je umocněna v následném zrání. [12].

Důležité je též poznamenat, že všechny kategorie dolihovaných vín typu Madeira, Porto jsou velmi bohaté na cukry (nad 25 g.l⁻¹) a během výrobní technologie jsou vystaveny zvýšené teplotě.

2.2.3 Hlavní druhy fortifikovaných vín

Mezi hlavní zástupce fortifikovaných vín řadíme vína portská (z oblasti kolem portugalské řeky Douro), sherry (klasické španělské víno), madeira (světoznámé portugalské víno), malaga (ze španělského města Magala) či francouzské doux naturels.

V našich zeměpisných šířkách není tvorba dolihovaných vín až tak rozšířená. Mezi jinými zde můžeme najít velice oblíbená moravská vína typu zlatavě žlutého likérového Mistella de Muscat, Šaler, Auerův kříž či dezertní Porta pannonica.

Klasickým příkladem aromatizovaného vína je vermut, do něhož se s alkoholem přidávají i extrakty z pelyňku, vanilky a dalších bylinek.

^{III} Rmut – rozmělněné bobule révy vinné, které jsou připraveny ke kvašení

Jak již bylo uvedeno, technologie výroby fortifikovaných vín se liší od výroby klasických nejen přidáváním ethanolu ale i způsobem jejich zrání a skladování. Stávek J. (2005) se ve své knize zabývá výrobou nejvýznamnějších fortifikovaných vín, které jsou nositeli charakteristických aromat [18].

2.2.3.1 Portské víno

Produkce pravých portských vín je založená na nejstarším způsobu výroby v portugalské oblasti regionu Douro a Minho. Výrobní technologie začíná rozmělněním bobulí pomocí mechanických strojů. U těch nejkvalitnějších vín se dodnes používá několikahodinové nožní šlapání v kamenných vanách – lagares. Následujícím krokem je klidová fáze, která je důležitá pro rozvoj kvasinek. Vlastní nastartování fermentačního procesu začíná po 24 – 36 hodinách od sběru při vyšší teplotě (až 32 °C).

Stupeň vykvašení je zde brán jako funkce provozní teploty, množství cukru a hustoty vzniklého alkoholu. Souhrnná analýza těchto parametrů napoví, kdy je možno do kvasícího přidat moštu destilát (na 440 litrů vína se přidává přibližně 110 litrů destilátu). Dolihováním vína se ukončí proces kvašení a začíná fáze zrání. Portské získává svou sladkost z nezkvašených cukrů v moštu, na rozdíl od sherry, které se doslazuje hroznovým koncentrátem. Tekutina je následně čířena, scelována^{IV} a plněna do menších dubových sudů (550 l), kde „odpočívá“ desítky až stovky let při teplotách rovnajících se venkovnímu prostředí (v letních měsících kolem 30-45 °C). Změna barvy vína jde od fialově červené až po hnědou. Celý postup výroby je v dnešní době uskutečněn moderních provozovnách s nerezovými vinifikátory [18].

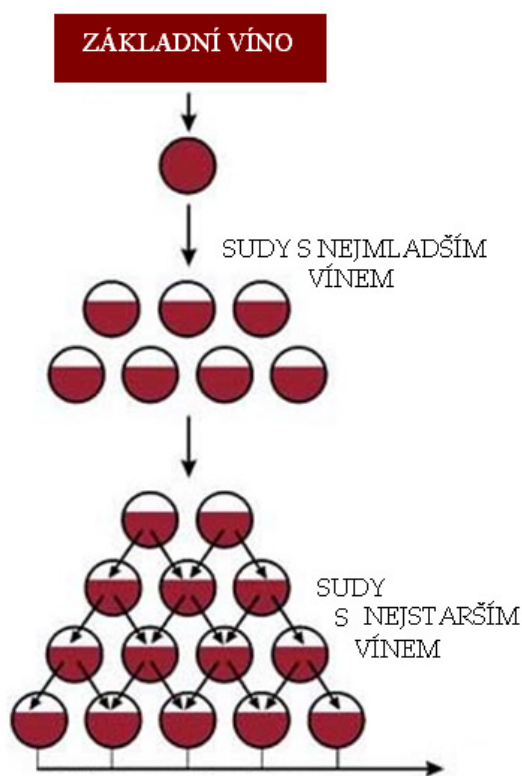
2.2.3.2 Španělské Sherry

Z oblasti Španělska pochází klasické, jantarově zbarvené sherry. Jedná se o víno suché nebo polosuché, výjimečně sladké, které bylo fortifikováno až po ukončení kvašení. Pro získání typického „sherry-aroma“ se do vína přidávají kvasinky čeledi *Saccharomycea*. Nejvýznamnějšími z nich, *Saccharomyces beticus*, má navíc tu vlastnost, že po odumření vytvoří tenkou blanku na hladině vína, která se označuje jako sherry-flor.

^{IV} Scelování vín – mísení dvou nebo více odrůdových vín, za účelem zlepšení kvality

Výrobní technologie sherry se od portských výrazně liší. Seskírané bobule jsou nejprve sušeny 10-21 dní na přímém slunci. Tím se v nich zvýší cukernatost, zatímco obsah kyseliny jablečné a taninu se snižuje. Teprve pak jsou seschlé bobule rozmělněny na rmut, do kterého se přidává malé množství sádry, kvůli jednak vysrážení malých krystalků vlnanu draselného a naopak se zvýšením obsah kyseliny vinné. Pro výrobu budoucího sherry se jímá první frakce jemného stlačení z lisu.

Rmut se moderně plní do ocelových tanků (40000 l), ve kterých se nechává kvasit několik měsíců při teplotě 24-30 °C. Teprve po fermentaci se víno fortifikuje na 15% - 17% (podle kvality) a je plněno do sudů z amerického dubu do 2/3 objemu (600 l). Dalším krokem je přemístění do tzv. solery (Obr. 1).



Obr. 1: Systém solera (část výrobní technologie sherry-vín) [19]

Jedná se o soustavu, v nichž víno zraje. Důmyslným postupem přečerpávání a ředěním staršími ročníky s mladšími si víno získává své typické nezaměnitelné aroma. Z posledního sudu se odebere 1/5 objemu a doplní náplní předchozího. Ten se doplní obsahem 3. sudu vína

od konce, a tak to se pokračuje dále. Víno takto zpracované se k zákazníkovi dostává nejdříve po pětiletém „zrání“ [18].

Systém solera má striktně stanovené podmínky, při nichž se celý postup provádí. Jedná se především o optimální pH tekutiny (2,8 – 3,5) a teplotu, která se udržuje v mezi 16 – 26 °C. Příhodné podmínky umožňují působení kvasinek a tvorbu flor-blány. Flor ovlivňuje sherry tím, že přeměňuje zbytkový cukry, dále snižuje hladinu glycerinu a těkavých kyselin. Naopak však značně zvyšuje množství esterů a aldehydů.

2.2.3.3 Madeira

Významným celosvětovým producentem fortifikovaných vín je Portugalsko se svou Madeirou. Nutnost do vína přidávat ethanol, a tím i víno zakonzervovat, se stala předmětem zájmů již dávných mořeplavců, kteří se při svých plavbách občerstvovali touto lahodnou tekutinou.

Brzy se taky ukázalo, že zvýšená teplota a dlouhé plavby vínu neškodí, ale spíše naopak přispívá k vytvoření vína vysoké kvality. Madeirské víno se dolihovává až po vykvašení. Technologie výroby je založena na způsobu prvotního zrání, kdy se víno zahřívá na teplotu 45 – 50 °C v estufasach^V po dobu šesti měsíců za přístup vzduchu. Víno tak získá své typické znaky, známé jako madeirské tony. Tento proces „stažení“ vína je kontrolován vládou příslušné země. V následujícím kroku je víno dolihováno na 18 – 25% a dle potřeby doslazeno na požadovanou hodnotu cukernatosti.

Vína stočená do dubových sudů jsou ponechány ve sklepích při teplotě 35 °C minimálně tři roky [20]. Během stanovené doby se ve víně rozvinou všechna klasická aroma [21].

2.2.3.4 České fortifikované víno – Mistelle de Muscat

Mistelle de Muscat je příklad českého dolihovaného vína typu cuvée^{VI}. Základ vína je tvořen odrudou Moravský muškát smíšený s Veltlínským zeleným. Poměr obou moštů je volen tak, aby si výsledný lahodný nápoj zachoval muškátové aroma s vyšším obsahem kyselin. Fortifikace se uskutečňuje během několika hodin v raném stádiu kvašení. Následně je

^V Estufas – tradiční sklep nebo komora, kde se víno po delší dobu zahřívá.

^{VI} Cuvée – vína vyrobená ze smíšených moštů různých odrůd vinné révy

víno stáčeno do malých dubových nebo akátových soudků, bez předchozí filtrace. V nich zraje nejméně dva roky. Vůně vína je komplexní, aroma je intenzivně ovocné (po vyzrálých hroznech až rozinkách) příjemně pikantní po akátovém dřevě, s espretem pylu lučních květů a kvetoucí lípy. Chuť je originální, kulatá, medově nasládlá, jemně ostrá a s měkkými tříslovinami dubového sudu [18].

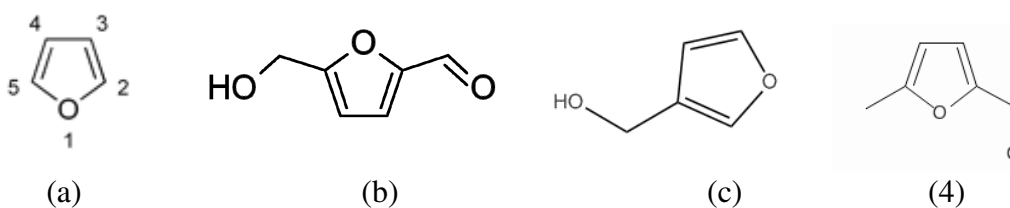
2.2.4 Deriváty furanu a jejich vliv na vůni vína

Jedna z možností vzniku derivátů furanů ve víně souvisí s již zmíněnou Maillardovou reakcí. Její mechanismus je navíc umocňován podmínkami, které v průběhu vinifikace mohou nastat. Jedná se především o procesy probíhající u vín s vyšší cukernatostí, která jsou vystavena zvýšené teplotě buď během úpravy (termovinifikace, případně vysokoteplotní lahvování) nebo během dlouhém vyzrávání za příhodných podmínek [22].

Látky tohoto typu, bývají v případě degustátorských zkouškách kladně hodnoceny. Aromata vín obsahující furany bývají popisována jako ořechová, kořeněná, kávová, karamelová či s madeirskými tóny. Koncentrace některých furanových derivátů nám může prozradit informace o způsobu nakládání s vínem, stupni vyzrání nebo stáří atd. [23].

2.2.4.1 Chemický popis furanů a laktonů

Všechny zkoumané látky spadají do kategorie heterocyklů, jejichž základ tvoří furan (Obr. 2a). Na něm mohou být v polohách 2-, 3-, 4-, 5- navázané různé funkční skupiny. Ve víně můžeme najít např. furfural, 5-hydroxymetylfurfural (2b), 3-furanmetanol (2c), 5-methyl-2-furaldehyd (2d), 2-hydroxymethylfuran apod. Většina z nich je ve vyšších koncentracích toxická, přičemž hladiny 5-furfuralu a 5-hydroxymetylfurfuralu je ze zákona kontrolována, např. v medu [24].



Obr. 2: Furan (a) a jeho některé deriváty: 5-hydroxymetylfurfural (b), 3-furanmethanol (c), 5-methyl-2-furaldehyd (d)

Furanu příbuzné laktony jsou vnitřní estery hydroxykarboxylových kyselin v cyklickém uspořádání. Vznikají odštěpením vody z některých organických hydroxykyselin (Schéma IV). Jednotlivé laktony rozlišujeme podle vzdálenosti hydroxylové skupiny v příslušné hydroxykyselině a označujeme řeckými písmeny α -, β -, γ -, δ -.

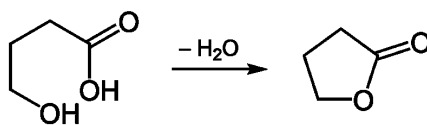
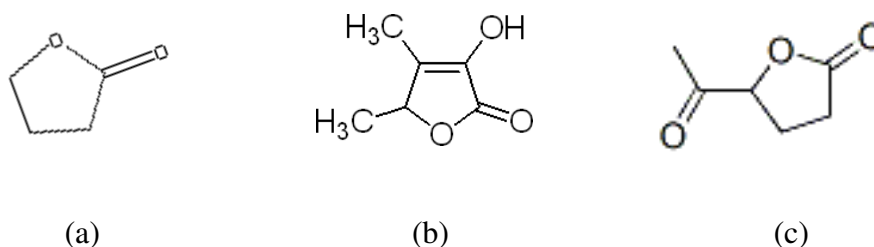


Schéma IV: Vznik γ - butyrolaktonu vnitřní esterifikací 4-hydroxybutanové kyseliny

V literatuře jsou často γ -laktony popisovány jako deriváty furanu, neboť se za základ bere furanový kruh. Z hlediska termodynamiky jsou stálejší pětičlenné cykly nad šestičlennými [25].

Z laktonů, které vytvářející aroma dolihovaných vín, bychom mohli zmínit furan-2-on (Obr. 4a), 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2,5-dihydrofuran-2-on (4b), nebo klasický sherry lakton [26] (5-oxo-4-hexanoliden – soleron) (4c).



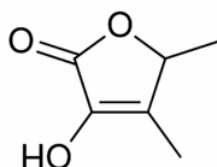
Obr. 4: Některé významné laktony ve víně furan-2-on (a), 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2,5-dihydrofuran-2-one (b), soleron (c)

2.2.5 Přehled zkoumaných látek ve víně

Těžištěm diplomové práce je analýza vybraných derivátů furanu ve víně. Z celé palety chemických sloučenin se předkládaná práce zabývá níže uvedenými deriváty, které rozličnou měrou přispívají k pozitivně či negativně laděným vůním finálního produktu. Sledované látky jsou: 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on (Sotolon), 2-furfurylalkohol (2-FF-OH) 2-furfural (2-FF), 5-(hydroxymetyl)furfural (5-HMF), a 4-Karboethoxybutyrolakton (4-COBL). Kromě jejich významnějších vlastností zde také budou nastíněny možné chemické cesty vzniku.

2.2.5.1 Sotolon

Sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on) je lakton (Obr. 5.) bývá označován jako klíčová látka podílející se na aroma starších, především fortifikovaných vín. Z důvodu jeho velkého účinku na aroma vína, budou jeho vlastnosti podrobněji rozebrány. Kromě vína se hojně nachází v mnoha dalších potravinách [22, 27].



Obr. 5: Racionální vzorec sotolonu

Z fyzikálního hlediska se jedná o těkavou látku, s teplotou tání 35 °C a varu 184 °C. Je dobře rozpustná v polárních rozpouštědlech, její molekulová hmotnost je 128 g/mol a z hlediska toxicity ji řadíme k látkám dráždivým. Má typický pronikavý zápach s velmi nízkým prahem vnímání.

Clarke J. (2004) popisuje prahové koncentrace, od kterých je možno sloučeninu v daném prostředí kvalitativně smysly rozpoznat. Rozptýlenou látku ve vzduchu o koncentraci 0,01 – 0,20 $\mu\text{g.m}^{-3}$ vnímá čichový receptor jako negativní vjem. Ve vodě se koncentrace pachového vnímání pohybuje o něco výše, kolem 20 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (ppb). Abychom docílili příjemné vůně, musí koncentrace sotolonu ve vodě klesnout na 1 – 5 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (ppb). Při tomto množství byla popsána aroma typu: připálená, kořeněná (kari), vlašsko-oříšková, oříšková či sladká [15]. Minimální koncentraci 10 $\mu\text{g.m}^{-3}$ látky jako práh vnímání zmiňuje i Pham T.T. (1995) a další autoři [28, 29]. Nutno podotknout, že výsledné množství sloučeniny ve víně bývá závislé na typu vína, postupu výroby, době a procesu stárnutí i na podnebí jednotlivých vinařských regionů [30].

Přítomnost sotolonu ve víně byla poprvé zaznamenána ve španělském sherry v roce 1976. Následně bylo realizováno nepřeborné množství analýz k důkazu přítomnosti látky i v dalších vínech – ve francouzském Jura, v Portském, Tokajském či ve vínech z hroznů infikovaných plísní šedou (*Botrytis cinerea*) [31-35].

Ve studii sotolonu Martina B. a kol. (1992) byla zjištěna korelace mezi množstvím sotolonu a závislosti na stáří portských vín, potažmo skladování za oxidativních podmínek.

Vysoký korelační koeficient ($R > 0,95$) jasně prokázal přímo úměrnou závislost. Do budoucna by se tak sotolon mohl stát dalším z ukazatelů stáří a kvality vína [36].

O vzniku 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-onu se dodnes vedou nesčetné diskuse. Bylo prokázáno, že zvýšená cukernatost ve víně přímo souvisí s koncentrací sotolonu v konečném produktu. Jednou z možností je Maillardova reakce (viz. odst. 2.2.2.), jejíž mechanismus je postaven na reakcích reduktivních cukrů s aminokyselinami za zvýšené teploty nebo dlouhodobým vyzráním [37].

Některé hypotézy upřednostňují tvorbu sotolonu z α -ketomásečné kyseliny a acetaldehydu při teplotě 24 °C a nízkém pH. Pham T. T. navrhuje mechanismus vzniku ve francouzském víně Vin Jaune. Ke generování aminokyselin z bílkovin dochází v důsledku autokatalýzy kvasinek během zrání. Kyselina α -ketomásečná vzniká deaminací L-threoninu a ten dále reaguje s acetaldehydem na konečný produkt (Schéma V). [38, 39].

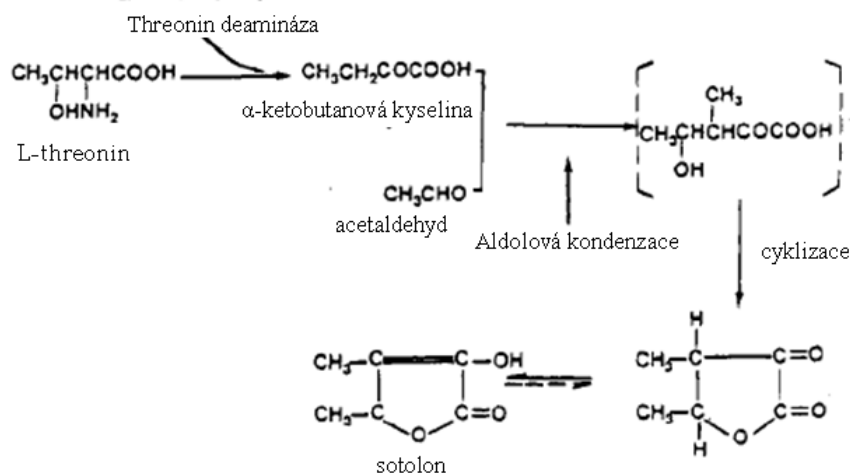


Schéma V: Vznik sotolonu reakcí α -ketomásečné kyseliny a acetaldehydu

Blank I. (1996) se zaměřil na tvorbu sotolonu z 4-hydroxy-L-isoleucinu (HIL) jako prekurzoru. Vlivem nižšího pH a tepelně indukované oxidativní deaminace (Schéma VI) vzniká 3-amino-4,5-dimethyl-3,4-dihydro-2(5H)-furanon, jenž dále reaguje s α -ketoaldehydem na výsledný sotolon [40].

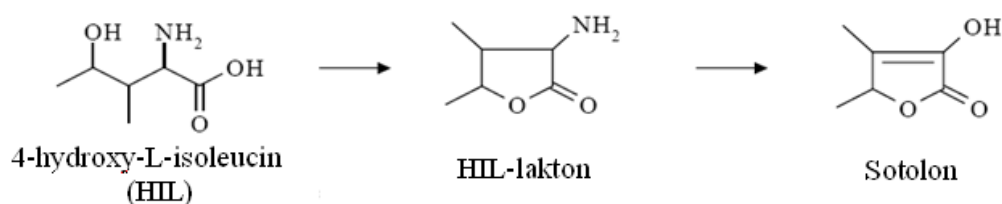
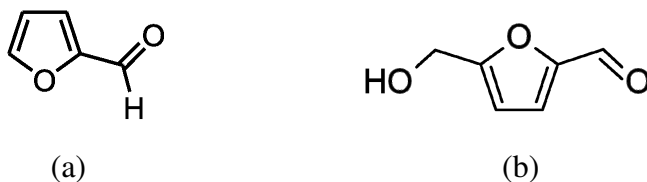


Schéma VI: Vznik sotolonu z 4-hydroxy-L-isoleucinu

2.2.5.2 2-furfural a 5-(hydroxymetyl)furfural

Další dva analyzované deriváty furanů (Obr. 6.) jsou závislé opět na procesu vinifikace a následném skladování za vyšších teplot (MR). K jejich tvorbě rovněž přispívá opět zvýšený obsah sacharidů a aminosloučenin.

Informace o přítomnosti a koncentraci 2-FF a 5-HMF v potravinách má velký význam zejména z hlediska škodlivého působení. Proto je jejich pohyb v potravinovém řetězci kontrolován. Obě látky se hojně vyskytují v tepelně upravených potravinách, např. v sušenkách, pečivu, marmeládě, cereáliích, víně a medu [41].



Obr. 6: Racionální vzorce 2-furfural (a) a 5-hydroxymethylfurfural (b)

Tvorba 2-FF ($M_r = 96 \text{ g.mol}^{-1}$, $T_v = 31 \text{ }^{\circ}\text{C}$) bývá často odvozená od pětičlenných polysacharidů (pentosanů). Bylo prokázáno, že zrání vína v nových dubových sudech mělo pozitivnější vliv na jeho tvorbu než ve starších. Furfural je vysoce reaktivní látka a ve vyšších koncentracích životu nebezpečná. Společnost EPA (2006) ho hodnotí jako kancerogenní a genotoxický s $L_{D50} = 60,5 \text{ g.kg}^{-1}$ (orálně potkan) [42,43].

Podobně je to i s 5-HMF ($M_r = 126 \text{ g.mol}^{-1}$), jehož cesty vzniku bývají odvozené jako produkty hexosanů, případně dehydratací ketopentos v kyselém prostředí nebo za zvýšené teploty (Schéma VI.). Codex Alimentarius (EU Directive 110/2001) udává maximální množství 5-HMF v medu, které stanovuje na 40 mg.kg^{-1} a v jablečném džusu 50 mg.kg^{-1} . Pro další potraviny již maximální přípustná množství nebyla doposud stanovena [44].

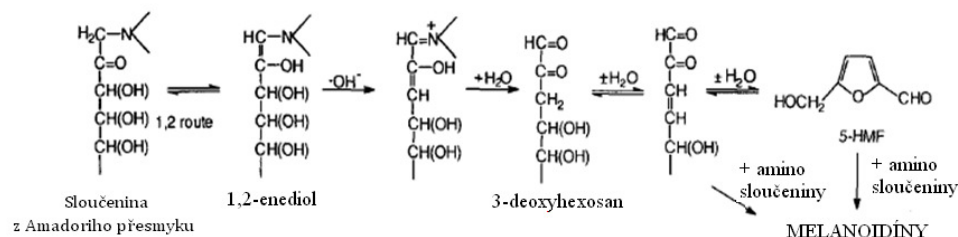
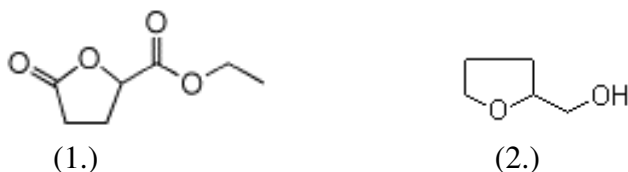


Schéma VI: Vznik 5-(hydroxymetyl)furfuralu při Maillardovy reakci[4]

Jednoznačně bylo prokázáno, že 5-HMF je cytotoxický, mutagenní, kancerogenní a genotoxický [45, 46].

2.2.5.3 2-furfurylalkohol, 4-karbethoxybutyrolakton

Poslední zkoumané látky, 2-FF-OH a 4-COBL, bývají opět označovány jako produkty MR. Jejich vliv na výsledné aroma vína je výrazně menší v porovnání s ostatními deriváty.



Obr. 7: 4-karbethoxybutyrolakton (1.) a 2-furfurylalkohol (2.)

2-FF-OH je významný i z hlediska toxicity. Ve větším množství je kancerogenní. Podle Merck indexu LD_{50} p.o. pro krysy 275 mg/kg. Samotná tekutina má hořkou chuť, slabý zápach po spálenině. Ve vodě je rozpustná, ale nesálá. Snadno se rozpouští v ethanolu a etheru [47].

2.3 Kritický pohled na zjištění těkavých složek vína

Cílem analytických studií je zjištění kvalitativní a/nebo kvantitativní stránky zkoumaného subjektu. Co se vína týče, kvalitou rozumíme souhrn všech vlastností produktu, které mají uspokojit spotřebitele. Kvantitou pak označujeme množství jednotlivých látek podílejících se na těchto vlastnostech.

Za nejstarší metodu rozlišování těkavých složek vína bývá označována senzorická analýza. Jedná se o cílevědomou činnost zaměřenou na vnímání podnětů všemi smysly (viz odst. I.). Rozlišovací schopnosti jedince bývají ovšem ovlivněny různými dispozicemi, což má pak za následek zkreslení výsledného hodnocení, potažmo pokles objektivity a přesnosti.

Nepostradatelným doplňkem organoleptické analýzy jsou fyzikálně-chemické rozbor, které nám s jistou přesností dokáží objektivně určit obsah a druh zkoumaných látek. Jejich určitá nevýhoda však spočívá v tom, že neposkytují celkový obraz skutečnosti, týkající se vyváženosti, harmonie, intenzity odrůdového aroma apod.

2.3.1 Senzorická analýza vína

Chceme-li naplno vnímat všechny složky vína, tak se nevyhneme senzorické zkoušce. Ve své podstatě se jedná o odborné testování za účelem zjištění informací dle příslušné státní normy. Lidé zodpovědní za ověřování požadovaných vlastností vína musí projít speciálními degustátorskými zkouškami, jejichž smyslem je zjištění citlivosti na různé smyslové podněty a určení jejich prahu citlivosti respondentů. [12].

Minimální intenzita působení bývá označována jako práh poznání nebo identifikace. Z definice vyplývá, že jde o minimální koncentraci látky schopné vyvolat vjem, z něhož lze rozpoznat přítomnost látky v prostředí. Naproti tomu podměťový práh nám charakterizuje minimální koncentraci látky v prostředí, při které dokážeme zjistit její přítomnost při srovnání s prostředím, které tuto látku neobsahuje. K tomu, aby se člověk stal schopným degustátorem, je nezbytné co nejlépe rozpoznávat všechny podněty.

Odborné hodnocení aroma vína by mělo probíhat ve světlé, uzavřené místnosti izolované od nežádoucích vlivů, do kterých spadá cigaretový a jiný kouř, vůně květin, parfémů apod. K čerstvě nalité sklenici s vínem se přičichne přibližně třikrát ve zhruba dvouminutových intervalech.

Prvním přivoněním k čerstvě nalité sklenici se určuje primární aroma, které nám dobře charakterizuje odrůdu. Odráží se v něm ovocné, květinové a rostlinné tóny pocházející z hroznů a moštu. Sekundární aroma, vzniklé během výroby (kvašení nebo zrání), lze vyhodnotit mírným roztočením vína ve sklenici a následným opětovným přičichnutím. Terciární aroma se ve víně určuje až po napití. Požití víno se v ústech provzdušňuje a přes nosohltan pak lze vnímat zbytkové vůně. Tento poslední druh vůní se vytváří až během zrání tekutiny v sudu nebo v lahvi vlivem biochemických a nebiochemických procesů. Čichovou analýzou získáme informace o odrůdě (příp. použitých odrůdách), typu vína, geografickém původu, stáří a hlavně o jeho zdraví. [16].

Prezentace vína a starost o něj ve společnosti náleží osobě zvané sommeliér (z franc. sklepmistr, číšník). Jeho vědomosti spočívají v zažitých znalostech precizních detailů a testovacích technikách, jež mají bezprostřední význam pro umění nabídnout k dané příležitosti nevhodnější víno [14, 48, 49].

Intenzita vůně svědčí o jisté známce vyspělosti produktu, která je velmi závislá na teplotě během degustace a dalších dílčích látkách ve víně (množství etanolu, vody apod.). Celkově lze říci, že analýza pomocí smyslů je dnes velmi perspektivní obor kontroly kvality vína na státní úrovni.

Účinným pomocníkem pro jednoduchý popis aroma vína se stal i tzv. Aromatický kruh vína (Noble A. C. 1990). V jednotlivých soustředných kružnicích lze vyhledat nejbližší původ aroma, k němu odpovídající vlastnost a potenciální látku zodpovědnou za jeho vznik (Příloha I.). Každý druh vína má svůj popisující kruh. Díky tomu lze tak jednoduše a rychle získat přehled o majoritních substancích bez nutnosti odborných zkoušek [50].

2.4 Chemická separace a analýza těkavých látek ve víně

Těkavé látky se ve víně vyskytují ve velmi nízké koncentraci, proto je k jejich analýze nutno zvolit velmi citlivé metody. Z důvodu velké rozmanitosti komponent v matrici se žádná analýza vína neobejde bez účinné separační jednotky, kterou dnes ve většině případů tvoří plynová (GC), příp. méně často kapalinová (LC) chromatografie.

Určité informace o přítomnosti látek nám mohou podat postupy založené na analýze odebraného plynného podílu studovaného systému bez předchozí náročné úpravy. Jedná se tu především o techniky head-space, nejčastěji mikroextrakci tuhou fází (SPME) [51].

Druhý přístup analýzy těkavých komponent je izolace z vlastní kapalně složky. Tato část v sobě zahrnuje nejčastěji používanou extrakci v systému kapalina-kapalina. Jednotlivé podmínky bývají voleny tak, aby navíc docházelo k zakoncentrování žádaného analytu.

Zvýšení citlivosti stanovení se docílí zařazením vhodné detekční techniky. V nejjednodušších případech se může setkat s klasickým tepelně vodivostním detektorem (TCD) nebo plamenově ionizačním detektorem (FID). Tyto dva detektory bývají součástí techniky pro měření přímého senzorického vnímání dané látky – olfaktometrie (GC-O). Z důvodu univerzálnosti a poskytnutí co nejvíce dat z jedné analýzy se stal nezastupitelnou součástí všech výzkumných analytických metod hmotnostní detektor (MSD) [52].

Nejnovější trendy analýzy těkavých komponent se snaží vyhovět požadavkům soudobé společnosti, a to především rychlostí, správností, vysokou kvalitou a citlivostí. Za tímto účelem bylo sestrojeno zařízení známe jako elektronický nos [53].

O použití vhodné analytické metody rozhodují nejen vlastnosti zkoumaných substancí ale i požadavky zákazníků na získání relevantních dat. Nejvýznamnější metody budou v následujících odstavcích více rozvedeny.

2.4.1 Izolace těkavých sloučenin vína – extrakce

Cílem všech analytických metod pro přípravu vzorků před analýzou je získání co nejčistší formy analytu v dostatečném detekovatelném, případně stanovitelném množství pro danou instrumentální metodu.

Extrakční metody lze dělit podle skupenství fází, mezi kterými se ustanovuje dynamická rovnováha přechodu inkriminované složky, tedy pevná fáze – kapalina (S-L), kapalina – kapalina (L-L), kapalina – plyn (L-G) a extrakce z kapaliny a/nebo plynu na

pevnou látku, např. SPME. O tom, jak moc daná látka bude ochotně přecházet (extrahovat) z jednoho prostředí do druhého, nám vypovídá velikost distribuční konstanty K_D (Rov. 2.1.). V čitateli bývá uvedena buď molární koncentrace látky v plynné nebo v kapalně (organické) fázi.

$$K_D = \frac{[A]_{fáze}}{[B]_{vino}} \quad (2.1)$$

Head space je metoda, kde se ustaluje rovnováha mezi kapalnou (vino) a plynnou složkou (nad kapalinou). Zde se předpokládá, že analyzované látky mají dostatečnou energii potřebnou na uvolnění se z potravin do plynné fáze, z které jsou – po ustanovení rovnováhy – odebrány k analýze. Vzhledem k tomu, že většina těkavých látek má méně polární charakter, je nutno v roztoku upravit např. zvýšením iontové síly přidáním vhodné sloučeniny (nasycený roztok NaCl). Tímto krokem docílíme zvýšení koncentrace analyzovaných látek v plynné fázi. Všechny metody založené na odběru těkavé fáze ze vzorku budou ze své podstaty velmi neobjektivní, jelikož diskriminují analyty s menší těkavostí.

Při extrakci L-L se ustaluje rovnováha mezi kapalinou (vino) a kapalinou (extrakční činidlo). Jde o separační techniku, při níž analyzovaná složka přechází z vína do jiné kapaliny, přičemž musí být splněna vzájemná nemísitelnost obou fází. Optimálně volené podmínky poskytují vyšší výtěžky, ovlivnění míry selektivity a účinnosti extrahovaných látek.

Při samotném výběru se bere v potaz polarita analytů a dostatečná těkavost rozpouštědla pro následnou instrumentální metodu. Klasickými činidly jsou např.: chlorované uhlovodíky těžší než voda: chloroform, trichlormethan, perchlorethylen nebo DCHM. Poslední zmíněné rozpouštědlo je kvůli svým dobrým vlastnostem (nízká teplota varu, Mr, dokonalé oddělení od vody) pro tento druh analýzy nejvíce používán. Jistou nevýhodou je jeho nemalá toxicita [54-56].

2.4.2 Metoda SMPE (mikroextrakce tuhou fází)

Jedná se o velice propracovanou sorpčně-desorpční techniku přípravy vzorků tam, kde není zapotřebí přítomnosti rozpouštědla. Princip je shodný s klasickou extrakcí na tuhou fázi (SPE), liší se jen technika provedení. Základem je tenké vlákno z vytaveného křemene umístěné v duté ocelové jehle. Vlákno bývá pokryto různými typy stacionárních fází, které se od sebe liší rozdílnou polaritou a sorpčními vlastnostmi, což do značné míry ovlivňuje faktor

selektivity. Polymery na pokrytí vlákna se nejčastěji používají ve směsi – polyakrylát (PA), polydimethylsiloxan (PDMS), carbowax (CW) a divinylbenzen (DVB). [57-60].

Základní provedení extrakčního stupně experimentu spočívá v umístění vlákna do prostoru nasycené páry nad kapalinou (head-space HS-SPME) nebo přímé ponoření do kapaliny (direct immersing DI-SPME) na stanovenou dobu. Dalším stupněm je analytická separace, což bývá plynová nebo kapalinová chromatografie (s adapterem pro SPME-HPLC). V dávkovači přístroje GC se vlákno zahřeje na teplotu 250 – 300 °C na 10 – 15 min., při níž probíhá tepelná desorpce analytů z vlákna, které vstupují do separačního systému. Poslední část je detekce sloučenin příslušným detektorem.

SPME se od klasických extrakčních metod liší tím, že analyt není extrahován ze vzorku v co největším množství, ale pouze v koncentraci odpovídající rovnovážnému stavu mezi dvěma druhy rovnováh. Výtěžek závisí především na hodnotě rozdělovacího koeficientu rovnováhy L-G a G-S [58].

Optimalizace metody spočívá hlavně ve volbě správného polymeru a jeho tloušťky, čímž se dosáhne maximálního výtěžku a významného zlepšení sorpční selektivity. Podpoření extrakce se docílí také přidáním silného elektrolytu do vzorku, úpravou pH nebo způsob vzorkování z prostoru headspace (HS) [61].

Předností této techniky spočívá v rychlosti, požadované účinnosti, potřebném zkoncentrování analytu, případně i možnosti stanovení organických sloučenin přímo z přírodních vzorků. SPME se hodí jak pro kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu. Mezi výhodami bychom mohli zmínit i opakované použití a nízké provozní náklady. Výhodným zautomatizováním celého systému lze spojit úpravu vzorku i analýzu do jednoho kroku. K negativním faktorům SMPE bychom mohli přičíst stárí a opotřebenost vlákna, což má negativní dopad na reprodukovatelnost dat [62].

2.4.3 Chromatografie

Chromatografie je separační technika, která je založena na rozdělování látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Při separaci dochází k neustále opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. V případě, že budeme nahlížet na chromatografický systém jako na ideálně rovnovážný, můžeme distribuci analytu mezi dvěma fázemi popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D

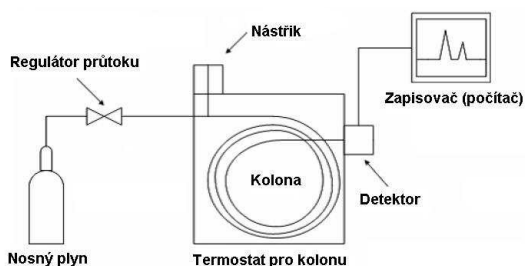
(rov. 2.2.). Distribuční konstanta složky A je poměr rovnovážných koncentrací této složky ve stacionární a mobilní fázi:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s} \quad (2.2.)$$

kde $[A]_s$ a $[A]_m$ jsou molární koncentrace složky A ve stacionární a mobilní fázi, $(n_A)_s$ a $(n_A)_m$ jsou látková množství složky A ve stacionární a molární fázi, V_s a V_m značí objemy stacionární a mobilní fáze[57].

Trvalý pohyb mobilní fáze zabrání dosažení skutečné termodynamické rovnováhy a posune separované molekuly do další části stacionární fáze, kde se znovu vytvoří nový tranzitní rovnovážný stav. Pokud se bude hodnota K_D zvyšovat, bude látka ve stacionární fázi déle zadržována. To se navenek projeví delší dobou strávenou v separačním prostoru. Složky vzorku s odlišnými K_D budou prostupovat separačním prostorem odlišnými rychlostmi, což bude mít za následek jejich separaci. Molekuly, co mají menší zadržovanost, budou opouštět systém dříve. Na konci kolony jsou vycházející látky detekovány. V případě, že analyty budou mít stejné hodnoty K_D , nebudou ve výsledku rozděleny (budou tzv. koeluovány). Hodnota K_D závisí nejen na povaze dané sloučeniny, ale také na vlastnostech stacionární a mobilní fáze [63].

Chromatografické metody je možno dělit podle různých hledisek, například podle povahy mobilní fáze (kapalina LC/plyn GC), způsobu provedení (kolonové/plošné uspořádání), principu separace (rozpuštění/adsorpce/iontová výměna) a dalších kritérií.



Obr. 8: Blokové schéma plynového chromatografu

Z pohledu analýzy těkavých látek je nejdůležitější plynová chromatografie, v níž separace funguje na základě rozdělovací (GLC) nebo adsorpční (GSC) rovnováhy mezi plynnou mobilní fází a kapalnou nebo pevnou stacionární fází. Na podobných principech lze

dělit i kapalinovou chromatografií, kde mobilní fáze je kapalina a stacionární kapalina nebo pevná látka [58].

2.4.3.1 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem (GC/MS)

Pro účinnou separaci těkavých substancí z komplikované směsi je výhodné zvolit metodu, která na základě analýzy plynné složky pracuje. Z této úvahy vyplývá jako nejvýhodnější použití plynové chromatografie (na Obr. 8), kde mobilní fáze je inertní plyn. Důležitou částí každé separační jednotky je přístroj, který zaznamenává přítomnost vycházejících látek – detektor.

Jedním z detektorů poskytujících přímou identifikaci a informace o kvantitativní stránce komponent ve směsi je hmotnostní spektrometr (MS). Spojení těchto dvou přístrojů (GC/MS) kombinuje vzájemné výhody. Tím jsou poskytována daleko kvalitnější data, než kdyby každý z nich pracoval samostatně. Principem MS je ionizace molekul, jejich následná fragmentace a detekce podle náboje. Důležitou předností MS je i fakt, že i zde může docházet k účinnému rozlišení iontů.

Cyklus v MS detektoru začíná převedením vzorku do plynného stavu (odpaření). Následujícím krokem je ionizace, čímž vznikají nabyté částice. Ve spojení GC/MS se nejčastěji používají metody ionizace elektronem (EI) nebo chemická ionizace (CI) prostřednictvím pomocného plynu (např. CH_4). V případě HPLC/MS se jedná o nejběžnější ionizační techniky ESI, APCI, případně APPI. Po ionizaci se ionty urychlují do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k vlastní separaci – podle hodnoty m/z (hmotnost/náboj). Konečnou fází je dopad iontů na kolektor s elektronásobičem zaznamenávající odezvu [55, 58].

Metoda GC/MS si do svého vzniku, v roce 1950, našla svá uplatnění jak na poli vědy, a výzkumu, tak v běžných rutinních analýzách v běžný provozu. Díky své relativně rychlé a správné analýze rozličných směsí bývá metoda hojně používána i ve speciálních případech, forenzní chemie, analýze drog, výbušnin na letištích apod. [64].

2.4.3.2 Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID)

Jedná se o destruktivní, citlivý detektor založený na vedení elektřiny v plynech. Základem aparatury jsou dvě desky – nabitě elektrody v izolované nádobě, přes které proudí nosný plyn. Eluát přivedený z kolony se v detektoru ionizuje v kyslíkovodíkovém plameni

mezi deskami. Přítomnost analytu zvýší ionizaci a tím i elektrický proud. Jako nosný plyn se používá dusík, helium apod. Detekuje prakticky vše, kromě anorganických par a plynů (jako rozpouštědlo použít i vodu). Za nevýhody bychom mohli označit značnou citlivost na výkyvy v průtoku mobilní fáze a necitlivost na nespálitelný uhlík ve sloučenině [58].

2.4.3.3 Plynová chromatografie s olfaktometrickým detektorem (GC-O)

Analýza těkavých látek pomocí GC-O je jedna z nejpoužívanějších technik, jejímž prostřednictvím lze získat kombinaci kvalitativních a kvantitativních dat společně s popisem vnímání čichovým receptorem (nosem). Využívá se k tomu speciálně upravený detektor plynového chromatografu, který rozděljuje separované podíly z kolony tak, že část jde do olfaktometrického vývodu a zbytková část do FID nebo MSD. Vhodným vzorkovacím médiem je zde SPME, čímž se docílí požadované extrakci bez nutnosti použití rozpouštědla.

Olfaktometrický detektor je tvořen vývodem se zvláštním typem nástavce. K této části je pak přiložen čichový orgán (nos znalce), který vlastní vonný vjem zaznamenává. Výsledná data z obou detektorů jsou posléze porovnávána. Hlavní nevýhoda tohoto druhu analýzy je častá obtížnost přiřazení příslušné eluované látky z chromatogramu k pozorovanému aromatu. Tato chyba nabývá na významu zejména u složitých směsí, kde výsledek bývá značně ovlivněn koelujícími zónami či sloučeninami s intenzivnější vůní [65].

Z důvodu zvýšení účinnosti je nutné přistoupit k propracovanějšímu postupu, jenž zahrnující metodu analýzy ředění extraktu vzorku (AEDA). Pro hodnocení dat z GC-O byla zvedná veličina **OAV** (odour activity value), která je definována jako podíl koncentrace systému ku práh rozpoznání sloučeniny.

Vzorek s analyty je postupně ředěn rozpouštědlem a následně analyzován na GC-O. Během analýzy se sledují retenční charakteristiky (odezvy látek) a popisy jednotlivých školených hodnotitelů. Poměrná část výluhu, který byl použit v prvním kroku se ředí vhodným rozpouštědlem, například v poměrech 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 a 1:1024. Každé ředění se opětovně testuje. Tímto postupem se pokračuje až do doby, kdy již pachové hodnoty analyzovaných látek nejsou rozpoznatelné. Nejvyšší ředění, při nichž sloučeniny ještě mohou být cítit, je definováno jako relativní faktor ředěného aroma (FD). Tento faktor FD přímo koreluje s konstantou OAV. Hlavní nevýhodou je zde přílišná závislost na objemu přidávané tekutiny (ředění) a individuální posouzení, což může být častým zdrojem chyb. [62].

2.4.3.4 Elektronický nos

Nejnovější sofistikované metody se snaží nejen splnit požadavky soudobé společnosti, ale i nahradit nejvíce subjektivní článek v celkové analýze aroma – lidský nos. Proto není překvapující, že nesčetné vědecké výzkumy vedly k sestrojení zařízení pracující na podobném principu. Vzniklý analyzátor obsahuje celou řadu malých elektronicko-chemicko senzorů s částečnou specifičností. Tímto se zaručuje schopnost přístroje rozpoznat jednoduché látky ve složitých směsích.

Přestože používané systémy pracují s požadovanou citlivostí, nemohou v častých případech úplně nahradit klasickou separační metodu či senzorické testování. K jistým potenciálním oblastem použití přístroje patří bezesporu potravinářský průmysl, kde bývá použit pro kontrolu kvality surovin, hotových výrobků, sledování čerstvosti, zralosti i mikrobiálních patogenů. Dále nachází uplatnění v chemickém průmyslu, farmacii nebo pro kontrolu zdraví a životního prostředí [53, 64].

2.4.4 Příklady stanovení těkavých podílů vína

Pro přesnější určení těkavých a méně těkavých molekul ve víně lze použít spojení metod SPME-GC/MS. Tao, Y.(2008) navrhuje extrakci tuhou fází, což často řeší problémy spojené s přesným dávkováním. 8 ml vzorků červených vín bylo odměřeno do 15 ml skleněných vzorkovnic. K nim byl přidán 1 g nasyceného roztoku NaCl pro zvýšení iontové síly roztoku. Lahvičky s roztokem byly ponechány v termostatované lázni (45 °C) a míchány 10 min při vyšších otáčkách, čímž se docílilo ustanovení rovnováhy. Za stejné teploty následovalo i 10 minutové vzorkování HS-SMPE s PDMS vláknem (100 µm Polydimethylsiloxan). Konečnou částí byla desorpce analytů v dávkovacím zařízení plynového chromatografu. Ke kvantitativnímu vyhodnocení analýzy byl použit vnitřní standard, oktan-3-ol, který se dělil na koloně. Účinná separace byla provedená na analytické koloně DB-WAX (30m-0,32mm-0,25µm), s teplotním programem 40°C – 4 min – 10°C/ min – 230°C – 5 min., teplotou nástřiku 250 °C a rychlostí mobilní fáze 1 ml.min⁻¹(He). Hmotnostní spektrometr MS-EI (70 eV) s jednoduchým kvadrupólem byl nastaven na skenovací napětí v rozmezí 33-450 amu [67].

K účinnému zkoncentrování těkavých látek byla navrhnutá kombinace metod extrakce do DCHM za studena, následnou centrifugací vzniklé emulze při -4 °C (na 11600 g) a

konečnou destilací těkavých frakcí. Tím se získal 200x koncentrovanější vzorek než původní extrakt z vína, čímž se zlepšila citlivost [68].

Metoda AEDA-GC-O, publikovaná v článku Ferreira A. C. S. (2003), poskytuje výhodu smyslového stanovní. Jedná se o rychlý, relativně levný proces pro získání informací o identifikaci látek, jejich množství, a to dohromady se senzorickým rozpoznání obsahu. Pozornost zde byla zaměřena hlavně na analýzu sotolonu. Extrakce vzorků 30 vín (50ml) probíhala 2x do 5 ml DCHM. Odebraná organická fáze byla sušená síranem sodným. Pro olfaktometrii byl nastříknut dávkovací objem 2 μ l (split/splitless) na kolonu s polární stacionární fází (BP21). Mobilní fáze bylo He s průtokem 1ml.min⁻¹. Jednotlivé složky byly olfaktometricky (čichově) posouzeny skupinou 7 odborníků při 20 °C. Pro přesnější určení aromatických látek zodpovědných za vůni byl extrakt zředěn v různých poměrech (1:1, 2:1, 10:1...300:1) rozpouštědlem DCHM a analyzován za stejných podmínek. Výsledky z olfaktometrické analýzy byl porovnány s výsledky z GC/MS s CI-ionizací (pro sotolon ion v SIM-módu $[M + NH_4]^+$ m/z 146). Kvantifikace sotolonu se uskutečnila na základě metody vnitřního standardu s použitím oktan-3-lu. Cílem studie bylo senzorické rozpoznání obsah těkavé sloučeniny v závislosti na stáří vína [35].

Pro přímou analýzu 5-HMF, 2-FF ve víně popisuje Gaspar E. M. S. M. (2009) metodu DI-SPME ve spojení s GC-FID a/nebo GC/MS-TOF. Autor používal SPME-extrakci s vláknem v kombinaci DVB/CAR/PDMS pro přímé ponoření do roztoku při 20 °C, Navržená metoda poskytla dobrou reprodukovatelnost (RSD < 8%), při dobré výtěžnosti (77-107%) a výhodné meze detekce pro stanovované látky (GC-FID: 1.37 μ g.l⁻¹ pro 2-FF, 6.52 μ g.l⁻¹ pro 5-HMF; GC-TOF-MS: 0.3; 0.9 ng.l⁻¹ pro 2-FF a 5-HMF) [69].

Kvůli zvýšení citlivosti pro metodu GC/MS lze stanovované analyty derivatizovat N,O-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamid (BSTFA), případně 3-etinyl-trimethylsilan. Pro BSTFA se ukázalo, že analýza poskytuje lepší výsledky [70].

Jako vnitřní standard bývají, kromě 3-oktanolu, používány i další sloučeniny: 2-oktanol, 4-nonanol, dodekan, 3,4-dimethylphenol, γ -hexalakton, thymol 2,4- dimethylfenol a 4-methyl-2-pentanol. [71-74].

Jiná metoda stanovení sotolonu, využívá možnosti absorpce vlnových délek v UV oblasti. Analyty z vína byly nejprve 3x extrahovány rozpouštědlem (CH₂Cl₂), a pak analyzovány na RP-HPLC-UV/VIS s λ = 235 nm. Mobilní fází zde tvořila směs acetonitrilu a vody s gradientovou elucí [68, 75].

RP-HPLC byla navrhnutá i pro toxický 5-HMF. Mobilní fáze tvoří nejčastěji metanol s vodou (gradientová eluce). Detekce je zde UV při 280 nm [76]. Vylepšení citlivosti se může dosáhnout vhodnou derivatizací činidlem 2,4-dinitrofenylhydrazinu s následnou UV-detekcí při 400 nm [77].

2.4.5 Metody vyhodnocení obsahu látek

Kvantitativní analýza směřuje k zjištění množství sledovaných látek. S ohledem na složitost matrice (víno) a těkavost inkriminovaných sloučenin je potřeba zvolit vyhovující metodu stanovení. Ze čtyř nejběžnějších metod lze za vhodné považovat následující metody:

Metoda vnitřního standardu – je založená na přidání standardní látky (std.), která je dostatečně podobná analytu, ale ve vzorku se nevyskytuje. V konečné fázi se musí od vzorku dokonale oddělit. Porovnáním odezev vnitřního standardu a stanovované látky se přes faktor odezvy vypočtou požadované hodnoty (rov. 2.3.)

$$c_i = (A_{i(vz)} / A_{IS(vz)}) * c_{IS(vz)} * f_i \quad (2.3.)$$

kde A_i a $A_{i(vz)}$ značí plochy signálu analytu i ve std. roztoku a v vzorku, A_{IS} a $A_{IS(vz)}$ jsou plochy signálu IS ve std roztoku a ve vzorku s analytem i , f_i – odezvosý faktor látky ve std. roztoku a ve vzorku. Písmena c_i , $c_{i(vz)}$ značí koncentrace látky i ve std. směsi a ve vzorku a c_{IS} , $c_{IS(vz)}$ je koncentrace IS ve std. směsi a ve vzorku s analytem i . Na tuto rovnici navazuje výpočet odezvosého faktoru (rov. 2.4.)

$$f_i = (A_{IS} / A_i) * (c_i / c_{IS}) \quad (2.4.)$$

Tímto postupem se dobře korigují matricové efekty. Nevýhoda metody však tkví v přesném určení odezvosého faktoru, což je u těkavých látek s nelineární odezvou v závislosti na zvyšující se koncentraci složitý problém. Další komplikace plynou z nalezení std. vhodné látky. Pro analýzu furanů ve víně bývají autory článků doporučeny sloučeniny: 2,3,5-trimethylfenol, 2,5-dimethyldenol, thymol, a n-oktanol (Odst. 2.4.4).

Metoda standardního přídávku – do sérií vzorků se přidá známá množství stejné analyzované látky. Míra nárůstu odezvy je pak přímo závislá na množství přidaného std. Touto postupem se do jisté míry vyřeší matricové efekty.

Metoda vnějšího standardu – metoda je založena na dávkování vzorku a roztoků standardů v definovaných koncentracích za stejných experimentálních podmínek. Vyhodnocení se provádí podle kalibrační křivky nebo přímým srovnáním ploch získaných analytických signálů (píků). Metoda je velmi závislá na matricových efektech, proto je vhodné kalibrační roztoky dělat ze stejné matrice jako je vzorek. Hlavním zdrojem chyb je zde dávkovaný objem, jehož přesnost je zde důležitá [55, 58].

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Vzorky a provedení experimentu

V rámci prezentované diplomové práce byl proveden vývoj metody pro analýzu pěti derivátů furanů: 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on (Sotolon), 2-furfural (2-FF), 5-(hydroxymethyl)furfural (5-HMF), 4-karbethoxybutyrolakton (4-COBL) a 2-furfurylalkohol (2-FF-OH). Vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HP 6890 & HP 5973N). Výsledky měření všech vzorků vín jsou uvedeny v následující části s jejich rozбором.

3.2 Použité vzorky vína, chemikálie, pomůcky, přístroje

Přehled použitých vlastností analyzovaných vín je zahrnut v Tabulce II.

Číslo vzorku vína	Barva, odstín	Teplota [°C]	Skladování	Ročník [rok]
1	zlatavěžluté	20	akát	2004
2	zlatavěžluté	15	sklo	2004
3	zlatavěžluté	20	sklo	2004
4	zlatavěžluté	8	akát	2004
5	zlatavěžluté	8	sklo	2004
6	zlatavěžluté	20	sklo	2004
7	červené	30	dub	neuvedeno
8	bílé	30	dub	neuvedeno
9	červené	30	dub	neuvedeno

Tabulka II: Přehled informací o použitých vínech (řazeno podle použití)

Vysvětlivky k tabulce: Teplota – při které bylo víno skladováno

Skladování – použitý materiál pro skladování

(sklo – skleněná nádoba, akát – akátový sud, dub – dubový sud).

Vzorky 1-6 od jednoho dodavatele (J. Stávek) – druh vína Mistelle de Muscat

Vzorek 7 – Červené víno Old Porter (společnost Petrz Baruero SA) Andalusie, Španělsko

Vzorek 8 – Bílé víno Old Porter (společnost Petrz Baruero SA) Andalusie, Španělsko

Vzorek 9 – Červené víno Armilar Tawny Port (spol. C. Da Silva Porto-Lídl) Portugalsko

Chemikálie:	Dichlormethan (výrobce Penta) - DCHM Sotolon (výrobce Sigma Aldrich – SAFC Čína) Furfural (výrobce Sigma-Aldrich USA) 2-furfurylalkohol (výrobce Reachim – Rusko) 2,5-dimethylfenol (výrobce Sigma-Aldrich USA) – 2,5-DMF 2,3,5-trimethylfenol (Sigma-Aldrich USA) – 2,3,5-TMF Aceton (Lachema, Neratovice) Thymol (Sigma-Aldrich USA)
Použité pomůcky:	Laboratorní sklo Automatické pipety Eppendorf Centrifuga Eppendorf 5702 + plastové zkumavky Analytické váhy Topná deska Víno Veltlín – matrice pro tvorbu kalibrační křivky
Přístroje a vybavení:	Plynový chromatograf HP 6890 Nosný plyn – He (99,998 %, SIAD, Itálie) Křemenná kapilární kolona HP ZB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Automatický dávkovač HP 7683 Hmotnostní spektrometr Agilent 5973N

3.3 Příprava vzorku k měření

10 ml vzorku vína bylo odebráno pomocí automatické pipety a přeneseno do plastové zkumavky. K vínu byl přidán 1 ml dichlormethanu a 100 µl ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku vnitřního standardu (2,5-DMF). S obsahem bylo asi 5 minut zvolna třepáno. Ke konci se třepání zintenzívnilo. Extrakt ve zkumavkách byl dále 5 min. centrifugován při nejvyšších otáčkách, přičemž došlo k žádoucímu oddělení dichlormethanu od zbytku směsi. Agregované nečistoty se kumulovaly v mezifázi. Celý cyklus byl pro každý vzorek 3x zopakován. Vodná (horní) fáze byla následně odstraněna a spodní (organická) přenesena do mikrozkušavky (vialky) pro následnou analýzu GC/MS. Před odebráním byly vzorky vín uchovávány při laboratorní teplotě (20-25 °C).

Kvalitativní analýza byla provedena porovnáním výsledků s daty analýzy dostupných standardů a srovnáním hmotnostních spekter se spektry z knihovny přístroje. Pro kvantitativní vyhodnocení analýzy byla použita metoda kalibrační přímky, jejíž výsledky byly porovnány s daty získanými z metody vnitřního standardu. Společně se vzorky byly připraveny i standardní roztoky DCHM obsahující známé koncentrace furanů a vnitřního standardu pro zjištění odezvového faktoru. Stejně tak byly přichystány roztoky vína (Veltlín) se zvyšující se koncentrací furanů pro tvorbu kalibrační přímky.

3.4 Provedení analýzy a nastavení přístroje GC/MS

Nastavení přístroje vycházelo z článku Silva Ferreira a kol. (2003) pro analýzu Sotolonu ve víně. Jednotlivé parametry byly v průběhu testů optimalizovány [35].

Analýza byla provedena pomocí plynového chromatografu HP 6890 vybaveným automatickým dávkovačem (autosamplerem) od stejné společnosti (HP 7683). Detekční jednotku zde zajišťuje připojený hmotnostní spektrometr Agilent 5973N.

Extrahované vzorky ve vilkách byly přeneseny do karuselu automatického dávkovače, načež byla spuštěná analýza. Cyklus začal propláchnutím mikrostříkačky Halmilton acetonem (2-3x), následně vzorkem (3x), a teprve pak byl nadávkován 1 μ l vzorku. K nadávkování vzorku na kolonu bylo využito metody pulzního dávkování bez děliče toku (Pulsed Splitless) 140 kPa/24s. Teplota nástřiku se optimalizovala na 200 °C. Separace byla provedena v křemenné kapiláře kolony (ZB-5MS) o délce 30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μ m. Teplotní program: 50°C – 2 min – 10°C/ 1 min – 300°C – 5 min. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 0,9 ml.min⁻¹. Spojení mezi GC a MS bylo udržováno na teplotě 270 °C. Doba jedné analýzy byla nastavena na 32 minut.

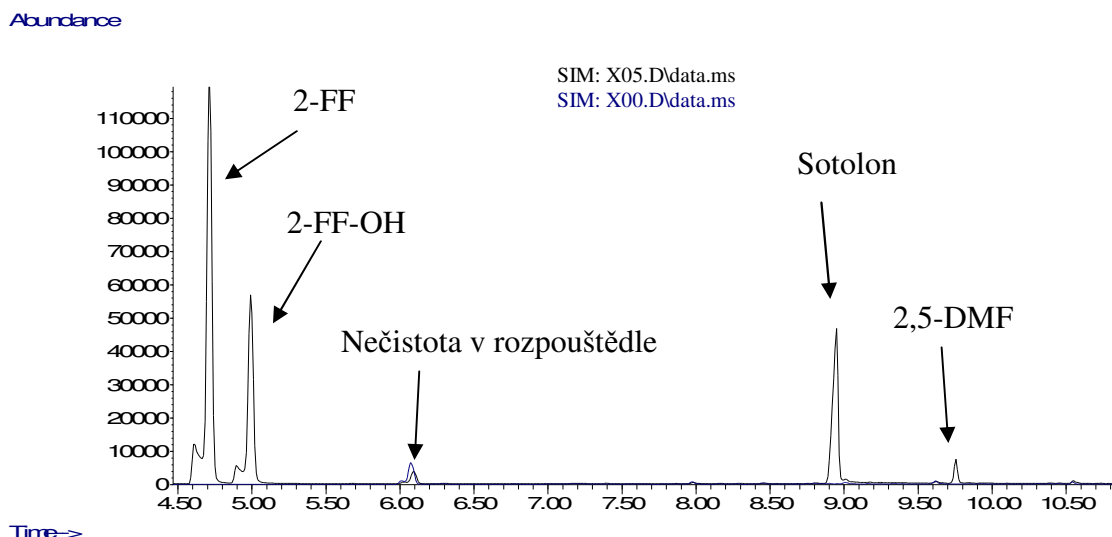
Použitý MS detektor, využívající ionizaci elektronem (EI) s energií ionizujících elektronů 70 eV, byl na počátku pracovního cyklu 4 min. vypnut, kvůli odstranění rozpouštědla (solvent delay). Sběr dat byl realizován ve dvou módech. „TIC“ mód zaznamenával sken iontů v intervalu 29 – 520 m/z frekvencí 2,96 Hz. Naproti tomu „SIM“ módem byly vybírány pouze selektivní ionty (83, 96, 98, 122 a 128 m/z).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Vlastní práce se zabývala optimalizací metody pro analýzu furanových derivátů ve víně. Důležitou informaci poskytla kvalitativní analýza, jejímž účelem bylo určení přítomnosti a zjištění chování jednotlivých separovaných furanů. Vybranými deriváty furanu byly: 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on (Sotolon), 2-furfural (2-FF), 2-furfurylalkohol (2-FF-OH), 5-(hydroxymethyl)furfural (5-HMF), a 4-Karboethoxybutyrolakton (4-COBL). Na touto část navázala optimalizace kvantitativní analýzy, která vyústila v analýzu devíti vzorků fortifikovaných vín. Jednotlivé kroky budou v následujících odstavcích popsány.

4.1 Zhodnocení kvalitativní analýzy standardů furanových derivátů

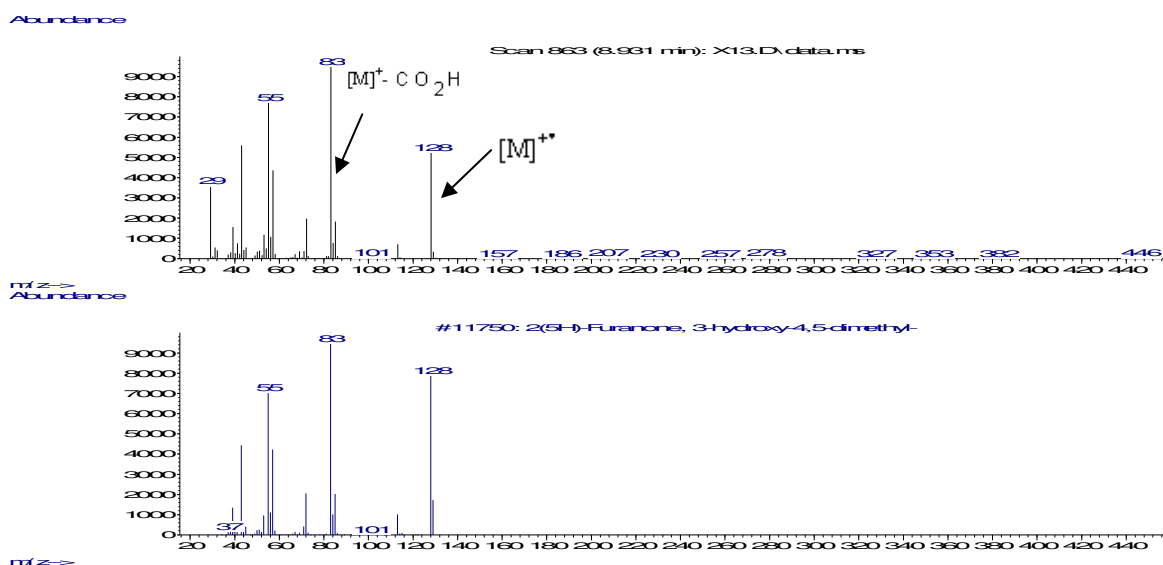
Vybrané deriváty furanu, jejichž vznik bývá spojen s MR, bývají označovány za jedny z klíčových složek podílejících se na výsledném aroma vína, byť se nachází v minimální koncentraci (odst. 2.2.5.). Jistou nevýhodou pro analýzu furanů je jejich zvýšená těkavost, což do jisté míry může ovlivňovat reprodukovatelnost stanovení. Dokonalou separaci látek ve standardním roztoku DCHM, obsahujícím 31 µg/ml jednotlivých analytů (Sotolon, 2-FF, 2-FF-OH) a 1 µg/ml vnitřního standardu (2,5-DMF) uvádí chromatogram na Obr. 9.



Obr. 9: Detail SIM chromatogramu standardních roztoku derivátů furanů s IS v porovnání s čistým extrakčním rozpouštědlem (CH_2Cl_2)

4.1.1 Hmotnostní spektrum Sotolonu

Silně aromatický 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on s molekulovou hmotností $M_r = 128,13$ g/mol, je z kolony eluován v čase 8,9 min. Ve spektru sotolonu (na Obr. 10) lze najít nejvíce intenzivní ion fragmentu m/z 83 s typickou ztrátou pro nenasycené γ -laktony 45 ($M - CO_2H$). Jak se ukázalo, tento ion při analýze byl značně ovlivněn matricové efekty. Pro kvantifikaci v režimu Single Ion Monitoring (SIM-mód) byl vybrán molekulární ion s m/z 128, jehož ovlivnění bylo menší. Ion 55 m/z odpovídá postupné ztrátě skupin $-COH$ a $-CO$.



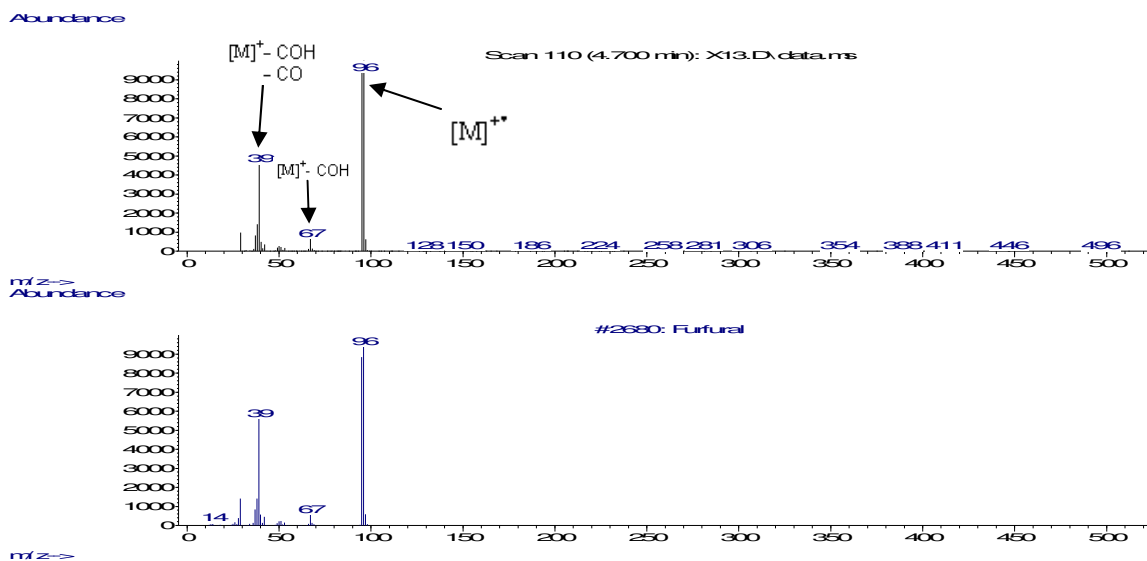
Obr. 10: Hmotnostní spektrum sotolonu s porovnáním se spektrem v knihovně přístroje

4.1.2 Hmotnostní spektrum Furfuralu

Silně mandlově vonící, kancerogenní furfural ($M_r = 96,08$ g/mol) se z kolony eluuje v čase 4,700 min. Jeho hmotnostní spektrum z analýzy standardu ukazuje Obr. 3. Ve spektru vidíme nejintenzivnější ion m/z 96, což odpovídá molekulárnímu iontu. Ten byl také vybrán pro kvantitativní analýzu v citlivějším SIM-módu. Vedle něho je pík iontu m/z 95 (ztráta protonu). Dále ve spektru vidíme méně intenzivní ion 39, který vznikl postupným odštěpením skupin $-COH$ a $-CO$ z molekulového iontu. Ten je charakteristický pro deriváty furanu. Úplně minoritní ion 67 odpovídající ztrátě 29, tedy $[M] - COH$, karbonylové skupině.

Na chromatogramu (Obr. 9) lze zpozorovat jisté rozštěpení píku (obdobně i u 2-FF-OH). Tento trend se u furanů často vyskytuje při vyšších koncentracích a zřejmě

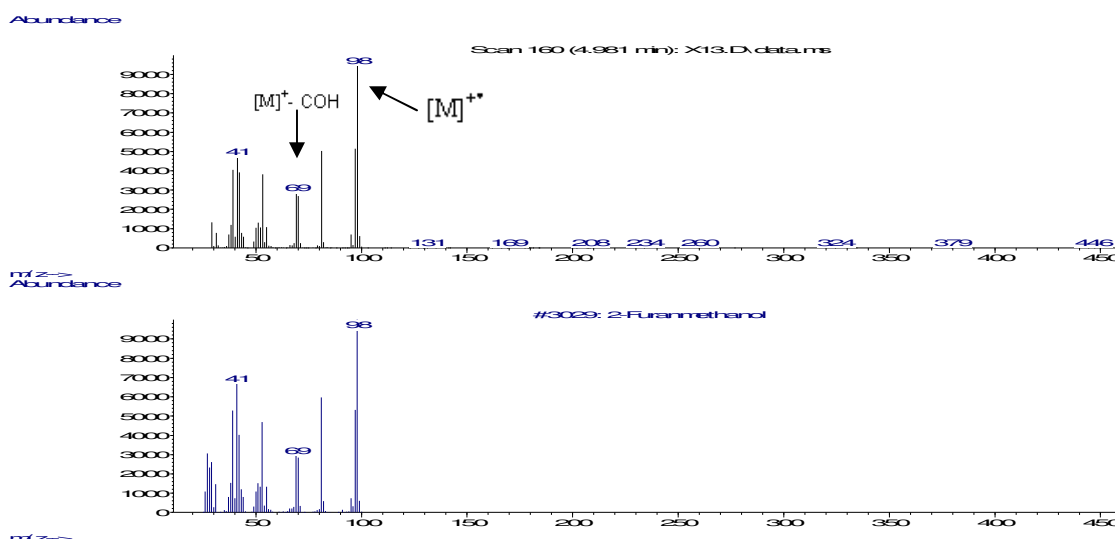
souvisí s přetížením kolony. Odstraněním tohoto problému by se jistě docílilo zmenšením doby dávkovacího pulzu. To by ovšem mělo negativní dopad citlivost stanovení.



Obr. 11: Hmotnostní spektrum furfuralu s porovnáním se spektrem v knihovně přístroje

4.1.3 Hmotnostní spektrum 2-furfurylalkoholu

Produkt 2-FF-OH má relativní molekulovou hmotnost 98 g/mol. V jeho spektru je dominantní molekulární ion 98 m/z (Obr. 12.).



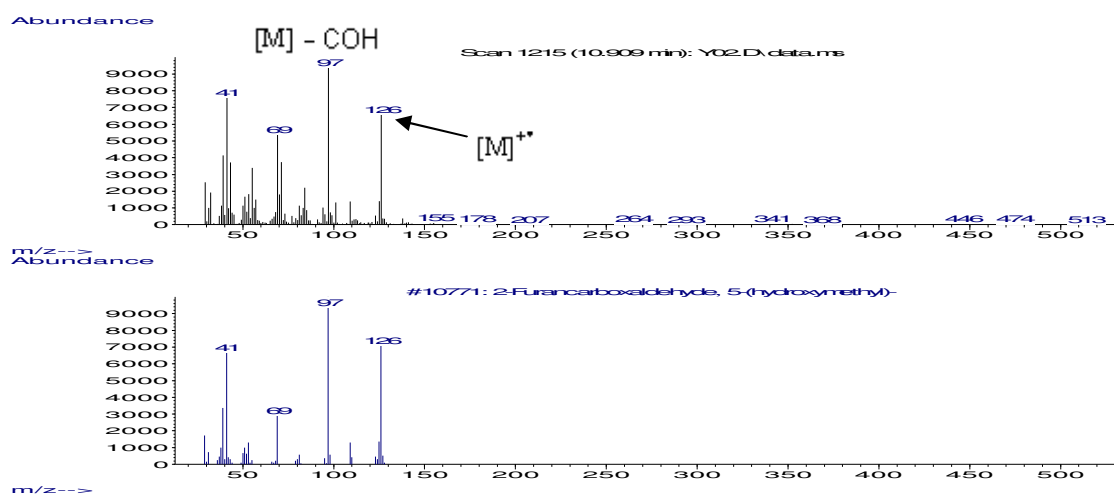
Obr. 12: MS spektrum 2-furfurylalkoholu s porovnáním se spektrem v knihovně přístroje

Vzhledem k jeho velké intenzitě a blízké hodnotě molekulárního iontu 2-FF, byla tato hodnota použita pro kvantifikaci pomocí SIM módu. Ve spektru ještě nacházíme ion m/z 69, jenž vznikl fragmentací molekulového iontu ztrátou $[M]-COH$ podobně jako u 2-FF. Poslední intenzivní ion 41 lze přisoudit ztrátě klasických skupin $-COH$ a $-CO$.

4.1.4 Hmotnostní spektra 5-HMF a 4-COBL

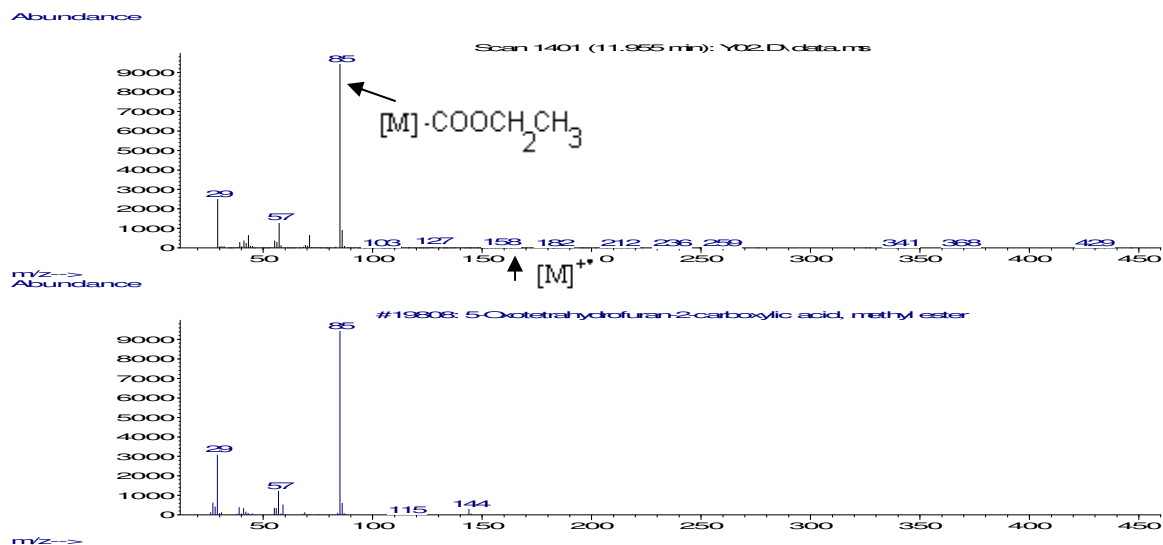
Na zjištění potřebných kvalitativní charakteristik posledních dvou furanů byl využit chromatogram a MS-spektra získaná analýzou reálného vzorku (chromatogram Obr. 15)

Pro 5-HMF, s elučním časem 10,92 min ($M_r = 126,11$ g/mol), byl vybrán pro metodu SIM ion m/z 126, jehož hodnota odpovídá molekulárnímu iontu na Obr. 13. Další ion ve spektru, (97 m/z), vzniklý odštěpením skupiny $[M]-COH$, byl rovněž vybrán ke kvalitativní analýze. Zbylé fragmenty ve spektru se dále štěpí obdobně jako ostatní deriváty furanu.



Obr. 13: MS spektrum 5-HMF s porovnáním se spektrem v knihovně přístroje

Pro 4-COBL ($M_r = 158$ g/mol) s časem eluce 11,97 min byl sledován nejintenzivnější ion ve spektru (Obr. 14) s m/z 85 vzniklý ztrátou 73 odpovídající $[M]-COOCH_2CH_3$. Ion m/z 57 se generuje následného odštěpení $-CO$ skupiny. Molekulární ion zde úplně chybí.



Obr. 14: MS spektrum 4-COBL porovnáním s MS spektrem v knihovně

4.2 Zhodnocení počáteční analýzy derivátu furanů

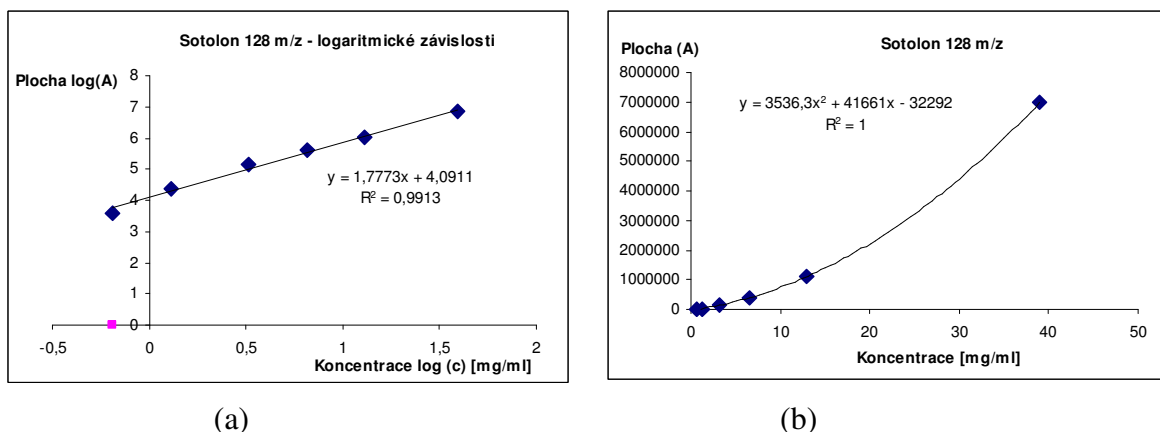
V průběhu analýzy bylo zjištěno, že při extrakci vzorku do DCHM nepřechází sledované analyty v plné míře. Ze čtyřnásobné extrakce standardního vodného 10% ethanolického roztoku sotolonu (koncentrace 0,286 mg/ml) bylo zjištěno, že návratnost procesu se pohybuje kolem 45 až 48%. Z tohoto lze usuzovat velkou závislost výsledku analýzy na složení matrice. Z toho navíc vyplývá, že pro metodu kvantifikace pomocí kalibrační křivky je nutno nejméně dvakrát extrahovat pro získání přibližně 72% množství analytu ze vzorku, případně zavést přepočítávací faktor.

Závislosti koncentrace sotolonu na odezvě detektoru (resp. ploše píku) byla testována na extrakce modelových roztoků vína (Veltlín) s přidavky sotolonu s postupně zvyšující se koncentrací přes dva koncentrační řády. Výsledky měření poskytly informaci o nelineární závislosti koncentrací na odezvě detektoru (Graf I a, b), což může do značné míry ovlivnit použité metody kvantifikace. První navrhnutou metodu stanovení pomocí kalibrační přímky (resp. křivky) lze vhodně použít v lineární závislosti odezvy analytu na koncentraci.

Byl proveden i orientační odhad množství analytů v náhodně zvoleném vzorku, který ukázal na koncentraci 0,03 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro sotolon; 0,1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro 2-FF a 0,05 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro 2-FF-OH ve víně. Postup analýzy navíc ztěžovala přílišná těkavost analytů.

Přes všechny zmíněné komplikace byla metoda vnějšího standardu pro určení množství furanů použita s určitými omezeními:

- ❖ Kvůli omezení těkavosti, byla provedena pouze jedna extrakce do DCHM, což vzhledem k vyšší koncentraci derivátů furanů ve vzorků vína bylo možné uskutečnit. Navíc se tím zkrátí doba extrakce, potažmo celé analýzy.
- ❖ Body kalibrační křivky byly voleny v rozmezí jednoho řádu



Graf 1.: Měření odezvy na koncentraci sotolonu v logaritmické (a) a v normální závislosti (b)

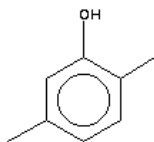
Pro porovnání naměřených výsledků byla přijata druhá metoda – vnitřního standardu. Tímto postupem byly do jisté míry potlačeny matricové efekty a odpadla i starost o objemy během manipulace. Nevýhoda metody však spočívá v přesném určení odezvového faktoru z porovnání závislosti odezvy na koncentraci ve standardní směsi stanovovaných látek, což se i zde potvrdilo. Správnost určení přepočítávacího faktoru ilustruje tabulka IV (str. 34)

Výběr vyhovujícího vnitřního standardu byl založen na principech popsaných v Odstavci 2.4.3. Dle odborných článků bývá často používán oktan-3-ol, thymol, dodekan-4-ol, oktan-2-ol, 2,4-dimethylfenol, 2,3,5-trimethylfenol,.

Nevýhody použití derivátů alifatických uhlovodíků pramení ze jejich přítomnosti v naftě, která se používá jako palivo do zemědělských strojů sloužících k obhospodařování vinných kultur. V případě nekontrolovaného úniku nafty na polích se může přes kořenový systém révy dostat až do bobulí hroznů, kde se akumuluje. Při nadcházející výrobě vína se tímto způsobem může dostat až do konečného podkutu.

Z toho důvodu byl výběr omezen na zbylé deriváty fenolu, které se – jak ukázaly chromatogramy standardních směsí – dobře rozseparovaly. Při přechodu na vinné vzorky se

dva z derivátů eluovaly ve stejnou chvíli jako další molekuly pocházející z matrice. Do detektoru tak vcházely koeluované zóny různých sloučenin. Náš výběr se tím zúžil na 2,5-dimethylfenol (Obr. 14.), který byl v konečné fázi použit jako vnitřní standard (IS). Pro zvýšení citlivosti byl i ze spektra 2,5-DMF ($M_r = 122,17 \text{ g/mol}$) vybrán charakteristický ion s m/z 122 odpovídající hmotě molekulového iontu pro měření v SIM-módu.

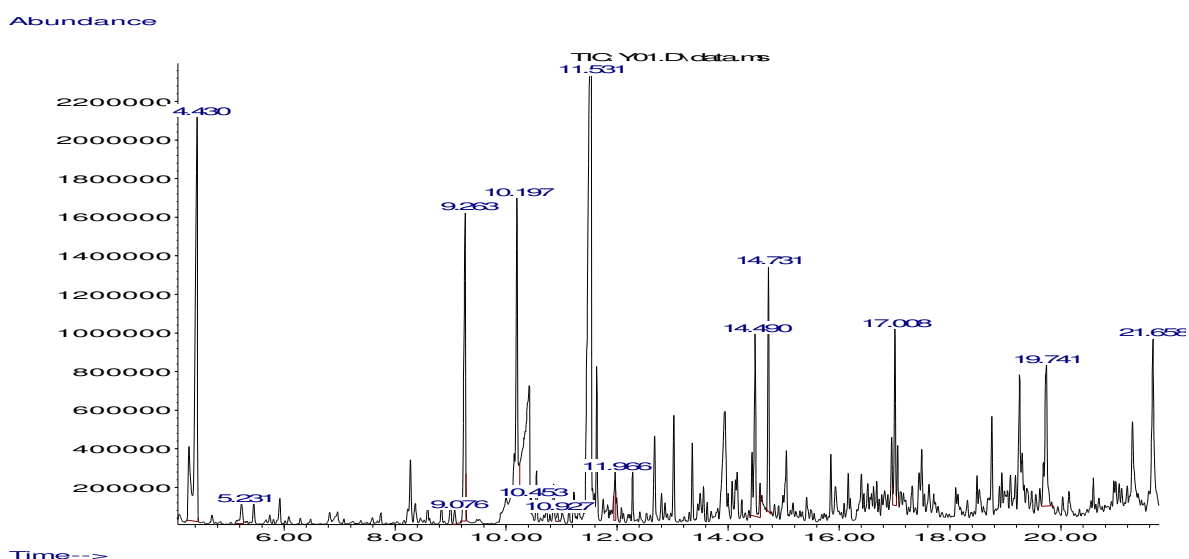


Obr. 14.: Vnitřní standard 2,5-dimethylfenol

Detekční limit (LOD) pro sotolon byl stanoven experimentálně. Vzhledem ke složitosti matrice byly měřeny extrakty roztoků vína s přidávkou sotolonu s postupně se snižující koncentrací. Z experimentů vyplývá hodnota LOD $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ve víně.

4.2.1 Kvalitativní zhodnocení chromatogramu vína

Vzhledem ke složitosti matrice poskytovaly naměřené chromatogramy široký profil rozličných látek obsažených ve víně (Obr. 15). U píků s největší plochou v „TIC“ záznamu byla provedena identifikace látek na základě naměřených hmotnostních spekter a jejich srovnání s knihovnou přístroje. Určení některých sloučenin obsažených uvádí Tabulka III.

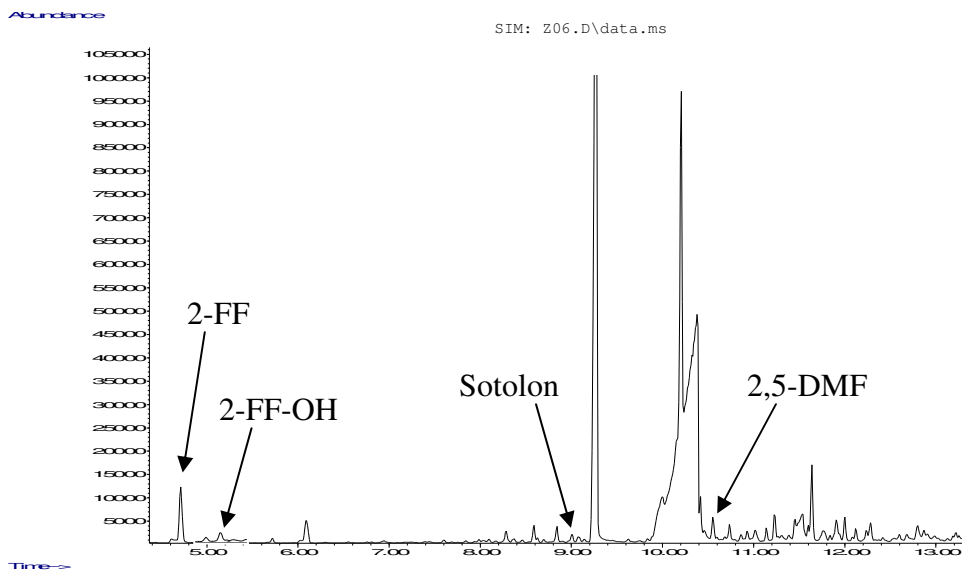


Obr. 15: Detail „TIC“ - chromatogramu po jedné extrakci vína (vzorek č. 6)

Analýzu extraktu z vína v módu TIC poskytuje chromatogramy s nepříliš dobrým rozlišením ani citlivostí. Pro zvýšení citlivosti furanů a IS byla použita metoda v módu Single Ion Monitoring (SIM) s vybranými charakteristickými ionty (Obr. 16). Koncentrace 5-HMF a 4-COBL byly určeny v TIC modu z kalibrační závislosti pro 2-FF jako standardní látku.

Retenční čas t [s]	Sloučenina
4.4300	2-FF
5.2310	2-FF-OH
9.0760	Sotolon
9.2630	Fenylalkohol
10.197	ethylester kyseliny fumarové
10.435	2,5-DMF (IS)
10.927	5-HMF
11.531	diethylester kyseliny 2-hydroxyfumarové
11,966	4-COBL
14.471	octakosan
17.007	heneikosan
21.658	Kyselina olejová

Tabulka III: Kvantitativní určení významných eluovaných sloučenin (Obr 15.)



Obr. 16: Detail „SIM“ - chromatogramu po jedné extrakci vína (vzorek č. 6)

Při opakovaných měřeních se prokázaly typické změny retenčních časů u všech vzorků v porovnání s analýzou standardního roztoku. Vzhledem ke složitosti extrahované

kapaliny, jsou budou retenční charakteristiky ovlivněny matricovými efekty. Níže uvedená Tabulka IV shrnuje nejdůležitější retenční charakteristiky sledovaných furanů.

Derivát furanu	t_R [min]	Charakteristický ion [m/z]
2-FF	4,7	96
2-FF-OH	5,2	98
Sotolon	9,1	128
5-HMF	10,9	126
4-COBL	11,9	85
2,5-DMF (IS)	10,4	122

Tabulka IV.: Retenční charakteristiky sledovaných látek

4.3 Analýza vzorků vín

Použitím výše popsaného postupu byla provedena kvantitativní analýza devíti vzorků fortifikovaných vín. Vzorky 1-6 (druh Mistelle de Muscat) byly stejného ročníku (2004) od jednoho soukromého moravského výrobce. Vína byla skladována při různých skladovacích podmínkách. Další vzorky byla zahraniční vína, zakoupena v síti českých supermarketů. Dle etikety vín u vzorku 7 (červené) a 8 (bílé) se jednalo o „bohatě sladká“ vína značky Old Porter, pocházející ze Španělska a vyrobených klasickou metodou solera (odst. 2.2.3.2.). Poslední vzorek (9) byl portské červené víno Armilar Tawny Port.

4.3.1 Kvantitativní metoda kalibrační křivky

Jako matrice všech kalibračních roztoků bylo zvolné víno Veltlínské zelené. Získané koncentrace sledovaných furanů ve víně demonstruje Tabulka V. Grafy jednotlivých kalibračních přímk furanů jsou zaneseny v Příloze II.

Metoda kalibrační přímky					
Vzorek	Sotolon [μg.l ⁻¹]	2-FF [μg.l ⁻¹]	2-FF-OH [μg.l ⁻¹]	5-HMF [μg.l ⁻¹]	4-COBL [μg.l ⁻¹]
1	4,59	50,78	3,17	14,91	276,10
2	6,42	62,23	2,90	57,64	323,53
3	5,36	49,86	2,18	106,81	268,35
4	6,65	52,98	2,18	137,37	411,61
5	5,72	72,05	2,26	82,10	548,19
6	5,94	53,43	2,66	18,52	225,43
7	9,01	55,61	9,82	14,41	212,60
8	9,31	23,58	14,46	91,38	252,10
9	18,63	40,24	1,08	31,83	760,42

Tabulka V.: Koncentrace sledovaných furanů ve víně

Prvních 6 vzorků pocházelo ze stejného vína (Mistelle de Muscat), ale skladovaného při různých podmínkách. Rozdíly ve výsledcích furanů jasně demonstrují závislost jejich koncentrace na zvolených podmínkách během celé výrobní technologie (odst. 2.2.1).

4.3.2 Kvantitativní metoda pomocí vnitřního standardu

Druhým postupem učení množství analytu ve vínech byla metoda vnitřního standardu, využívající srovnání odezev analytů s odezvou standardní látky (2,5-dimethylfenolu). V případě kvantifikace v SIM modu může být jistou nevýhodou potřeba experimentálního určení odezvových faktorů. Odezvové faktory pro Sotolon, 2-FF a 2-FF-OH jsou uvedeny v tabulce VI.

Koncentrací furanů (x) a I.S. (y) v [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	Název furanu a odezvové faktory		
	Sotolon	2-FF	2-FF-OH
100:10	49,8	5,6	12,6
100:10	59,4	6,9	17,6
100:10	67,2	5,3	14,2
100:10	63,9	6,6	16,8
Průměr se SMOCH	60,1 $\pm$ 6,5	6,1 $\pm$ 0,7	15,3 $\pm$ 2,0

Tabulka VI: Experimentální zjištění odezvových faktorů furanů ze std. směsi

Vypočtené koncentrace jednotlivých furanů jsou uvedeny v tabulce VII.

Metoda vnitřního standardu			
Vzorek	Sotolon [$\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	2-FF [$\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	2-FF-OH [$\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]
1	8,8	118,0	9,0
2	13,0	132,6	15,5
3	9,1	90,6	9,8
4	11,3	95,9	9,8
5	11,3	150,1	11,8
6	9,0	86,1	10,6
7	20,6	172,8	12,8
8	20,1	69,2	17,9
9	39,4	130,8	11,7

Tabulka VII.: Koncentrace sledovaných furanů ve víně s IS

Při přímém srovnání minulých výsledků lze vyzorovat tendenci dvojnásobku hodnot minulých. Tento fakt může být důsledkem nepřesného určení odezového faktoru. Je důležitá brát v úvahu i skutečnost, že odezvy furanů nejsou přímo úměrné zvyšující se

koncentraci, což u IS je standardní odezva stejného množství látky zaručena. Dále je nutné brát v potaz i rozdíl v návratnosti IS a furanů (extrakce do 47%).

5. ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce byl vývin metody analýzy těkavých derivátů furanu ve vínech, které jsou úzce spjaty s produkty Maillardovy reakce, a jejichž přítomnost značně ovlivňuje některé senzorické charakteristiky vína. Zvolenou metodou (GC/MS) byl stanoven obsah sotolonu, 2-furfuralu, 2-furfurylalkoholu, 5-(hydroxymetyl)furfuralu a 4-Karbethoxybutyrolaktonu ve všech vzorcích.

Koncentrace jednotlivých derivátů byly vyhodnoceny metodou kalibrační závislosti. Množství bylo stanoveno v rozmezí od jednotek do stovek $\mu\text{g.l}^{-1}$. Výsledky získané metodou vnějšího standardu byly porovnány s metodou vnitřního standardu. Nepřesnost v určení příslušných odezvových faktorů v SIM modu může být jedním ze zdrojů chyb stanovení.

Z analýzy vyplývá, že zvýšená koncentrace furanů se projevila zejména u posledních tří vzorků, které se od prvních šesti lišily výrobcem, způsobem zpracování i zrání. V analýze byla použita pouze sladká fortifikovaná vína, kde použitá technologie cíleně přispívá k rozvoji typických aromatických vlastností (produkty Maillardovy reakce).

Ve vinařském průmyslu se ovšem setkáváme i s dalšími faktory, které mohou dopomáhat k vzniku obdobných látek. Jedná se zejména o konečné průmyslové metody pasterizace či vysokoteplotního láhvovávní.

6. CITACE

- [1] Hajšlová H., Velíšek J.: *Chemie potravin*. OSSIS, Tábor 2009.
- [2] Reineccius G.: *Flavor Chemistry and Technology, Second Edition (Hardcover)*. Taylor & Francis Group, LLC, USA 2006.
- [3] Yu F., Utsumi, R.: *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 3043 (2009).
- [4] Kawamura S.: *Seventy years of Maillard reaction*. p.3. In: ACS Symposium The Maillard Reaction in Foods and Nutrition. Series 215. Ed. Waller G. R.; Feather M.S. – American Chemical Society, Washington (1983).
- [5] Hodge J. E.: *J. Agric. Food Chem.*, **1**, 928. (1953).
- [6] Nursten H.E.: *Maillard Reaction – Chemistry, Biochemistry and Implications*. The Royal Society of Chemistry, UK 2005.
- [7] Rivero-Pérez., Pérez-Magariño S., González-San J.: *Anal. Chim. Acta*, **458**, 169 (2002).
- [8] Ikan, R.: *The Maillard Reaction: Consequences for the Chemical and Life Sciences*. John Willey & Sons, Israel 1996.
- [9] Ashoor, S.H.; Zent J.B.: *J. Food Sci*, **49**, 1206 (1984).
- [10] Eichner K., Reutter M., Wittmann R.: *Detection of Amadori compounds in heated foods, in Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave, and Extrusion Process*. p. 42. In: ACS Symposium Series 543 Ed. Parliment T. H., Morello M. J., McGorin R. J. – American Chemical Society, Washington, DC (1994).
- [11] Ledl F., Schleicher E.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 565 (2003).
- [12] Velíšek J.: *Chemie potravin I*. 1 vydání 4. kap., OSSIS, Tábor 1999.
- [13] Moon J-K., Shibamoto T.: *J. Agric. Food Chem.* **57**, 5823 (2009).
- [14] Vaccarini, G.: *Manuál sommeliéra : Jak poznat, ocenit a ohodnotit víno a jak vést vinný sklep, český překlad*. Sun, Praha 2008.
- [15] Clarke R. J., Akker J.: *Wine Flavour Chemistry*. Blackwell Publishing, Oxford (UK) 2004.
- [16] Stevenson T.: *The Sotheby's Wine Encyclopedia*, 4. vydání, kap. 1. Dorling Kindersley, UK 2005.
- [17] Zákon o vinohradnictví a vinařství č. 321/2004 Sb. a Zákon 311/2008 Sb. měnící některé související zákony v plném znění.

- [18] Stávek J.: *Portské a ostatní fortifikovaná vína*. Radix, spol. s.r.o., Praha 2005.
- [19] <http://harshalshah.wordpress.com/2008/11/26/fortified-wines-another-opportunity-in-india> (staženo 3.2.2010).
- [20] Stávek J.: Vinařský obzor **99**, 279 (2006).
- [21] Câmara, J. S., Herbert, P., Marques, J. C., Alves, M. A.: Anal. Chim. Acta **513**, 203 (2004).
- [22] Stávek J., Barták P., Bednář P.: Vinařský obzor **99**, 486 (2006).
- [23] Câmara J. S., Marques C. J., Alves M. A., Silava Ferreira A. C.: J. Agric. Food Chem. **52**, 6765 (2004).
- [24] Vyhláška č. 334/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů v plném znění.
- [25] Červinka O., Dědek V., Ferles M.: *Organická chemie*. 2. vydání, kap. 12. SNTL Praha 1980.
- [26] Häring, D. , Boss, B. , Herderich, M. , Schreier, P.: *Rationalizing the Origin of Solerone (5-Oxo-4-hexanolide)*, p. 116. In: ACS Symposium Series, Vol. 714 Chemistry of Wine Flavor 28, Ed. Waterhouse A. L. Ebeler E. S. – American Chemical Society USA 1998.
- [27] Blanck, I., Sen, A., Grosch, W.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **195**, 239 (2002).
- [28] Blank, I., Lin, J., Fumeaux, R., Welte, D. H., Fay, L. B.: J. Agric. Food Chem. **44**, 1851 (1996).
- [29] Pham, T.T., Guichard, E., Schlich, P., Charpentier, C.: J. Agric. Food Chem. **43**, 2616 (1995).
- [30] Moreno J.A., Zea L., Moyano L., Medina, M.: Food Control, **16**, 333 (2004).
- [31] Dubois, P., Rigaud, J., Dekimpe, J.: Lebensm. -Wiss. Technol. **9**, 366 (1976).
- [32] Masuda, M., Okawa, E., Nishimura, K., Yunome, H.: Agric. Biol. Chem. **48**, 2707 (1984).
- [33] Guichard, E., Etievant, P. X., Henry, R., Mosandl, A.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **195**, 540 (1992).
- [34] Martin B., Etievant P. X.: J. High Resolut. Chromatogr. **14**, 133 (1991).
- [35] Ferreira A. C. S., Barbe J. C., Bertrand A.: J. Agric. Food Chem. **51** 4356 (2003).
- [36] Martin B, Etievant p. X., Luc. Le Quere J., Schlich P.: J. Agric. Food Chem. **40**, 475 (1992).

- [37] Schneider R., Baumes R., Bayonove C., Razungles, A.: J. Agric. Food Chem. **46**, 3230 (1998).
- [38] Pham T.T., Elizabeth G., Pascal S., Claudie C.: J. Agric. Food Chem. **43**, 2616 (1995).
- [39] Blank I., Lin J., Fumeaux R., Welti D. H., Fay L. B.: J. Agric. Food Chem. **44**, 1851 (1996).
- [40] Chavezservin J., Castellote A., Lopezsabater M.: J. Chromatogr. A **1076**, 133 (2005).
- [41] Díaz-Plaza E.: Anal. Chim. Acta. **458**, 139 (2002).
- [42] <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/furfural.html> (staženo 13.3.2010).
- [43] Teixidó E., Santos F. J., Puignou L., Galceran M. T.: J. Chromatogr. A **1135**, 85 (2006).
- [44] <http://www.legaltext.ee/text/en/U61130.htm> (staženo 6.3.2010).
- [45] Theobald A., Miller A, Anklam E.: J. Agric. Food Chem. **46**, 1850 (1998).
- [46] www.furan.com/_resources/downloads/10497en_rev6.pdf (staženo 21.4.2010).
- [47] <http://www.wineofczechrepublic.cz/> (staženo 45.1.2010).
- [48] Farkaš, J.: *Technologie a biochemie vína*. SNLT Praha 1980.
- [49] www.winearomawheel.com/ (12.3.2010).
- [50] Chen J., Penhune V., Zatorre R., Hanslmayr S., Pastötter B., Bäuml K., Gruber S., Wimber M., Klimesch W., Bueti D., others: J. Cogn. Neurosci **20**, 226 (2008).
- [51] Ferreira V., Jarauta I., López R., Cacho J.: J. Chromatogr. A **1010**, 95 (2003).
- [52] Schaller E., Bosset J.O., Escher F.: Lebensm.-Wiss. Technol. **31**, 305 (1998).
- [53] Holbecher Z., Churáček J. a spol.: *Analytická chemie*. SNTL, Praha 1987.
- [54] Churáček J. a spol. *Analytická separace látek*. SNTL, Praha 1990.
- [55] Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D.: *Handbook of enology, vol. 2, The Chemistry of wine stabilization and treatments*. John Willey & Sons, UK 2006.
- [56] Marsili R.: *Flavor, Fragrance & Odor Analysis*. Marcel Dekker, Inc USA 2002.
- [57] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [58] Worsfold P., Townshend A., Poole C., ed.: *Encyclopedia of Analytical Science* Elsevier, Amsterdam 2005.
- [59] Evans T., Butzke C., Ebeler S.: J. Chromatogr. A **786**, 293 (1997).

- [60] www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/11.pdf (staženo 9.3.2010).
- [61] Castro R., Natera R., Durán E., García-Barroso C.: *Eur. Food Res. Technol.* **228**, 1 (2008).
- [62] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 1997.
- [63] http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry (staženo 18.12.2010).
- [64] Grosch W., Belitz H.-D: *Food Chemistry*, Springer-Verlag, Deutschland 2009.
- [65] Berger, R. G.: *Flavours and Fragrances - Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer-Verlag, Deutschland 2007.
- [66] Tao, Y.; Li, H.; Wang, H.; Zhang, L.: *J. Food. Compos .Anal.* **21**, 689 (2008).
- [67] Schneider R., Baumes R., Bayonove C., Razungles A.: *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3230 (1998).
- [68] Gaspar E. M., Lopes J. F.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 2762 (2009).
- [69] Teixidó E., Santos F. J., Puignou L., Galceran M. T. J.: *Chromatogr. A* **1135**, 85 (2006).
- [70] Serkan S.: *J. Food Qual.* **30**, 330 (2007).
- [71] Simón de F. B., Cadahía E., Kalicha J.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7671 (2003).
- [72] Lavigne V., Pons P., Darriet P., Dubourdieu D.: *J. Agric. Food Chem.* **56**, 2688 (2008).
- [73] Ferreira V., at all: *J.Chromtogr. A* **806**, 349 (1998).
- [74] Guichard E., Pham, T., Etievant P.: *Chromatographia.* **37**, 539 (1993).
- [75] Rufián-Henares J.A., Garcia-Villanova B., Guerra-Hernández E., J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. **24**, 3049 (2001).
- [76] LoCoco F., Valentini C., Novelli V., Ceccon L.: *J. Chromatogr. A* **749**, 95 (1996).
- [77] <http://wisewinebuys.com/freeresources/> (staženo 21.4.2010).

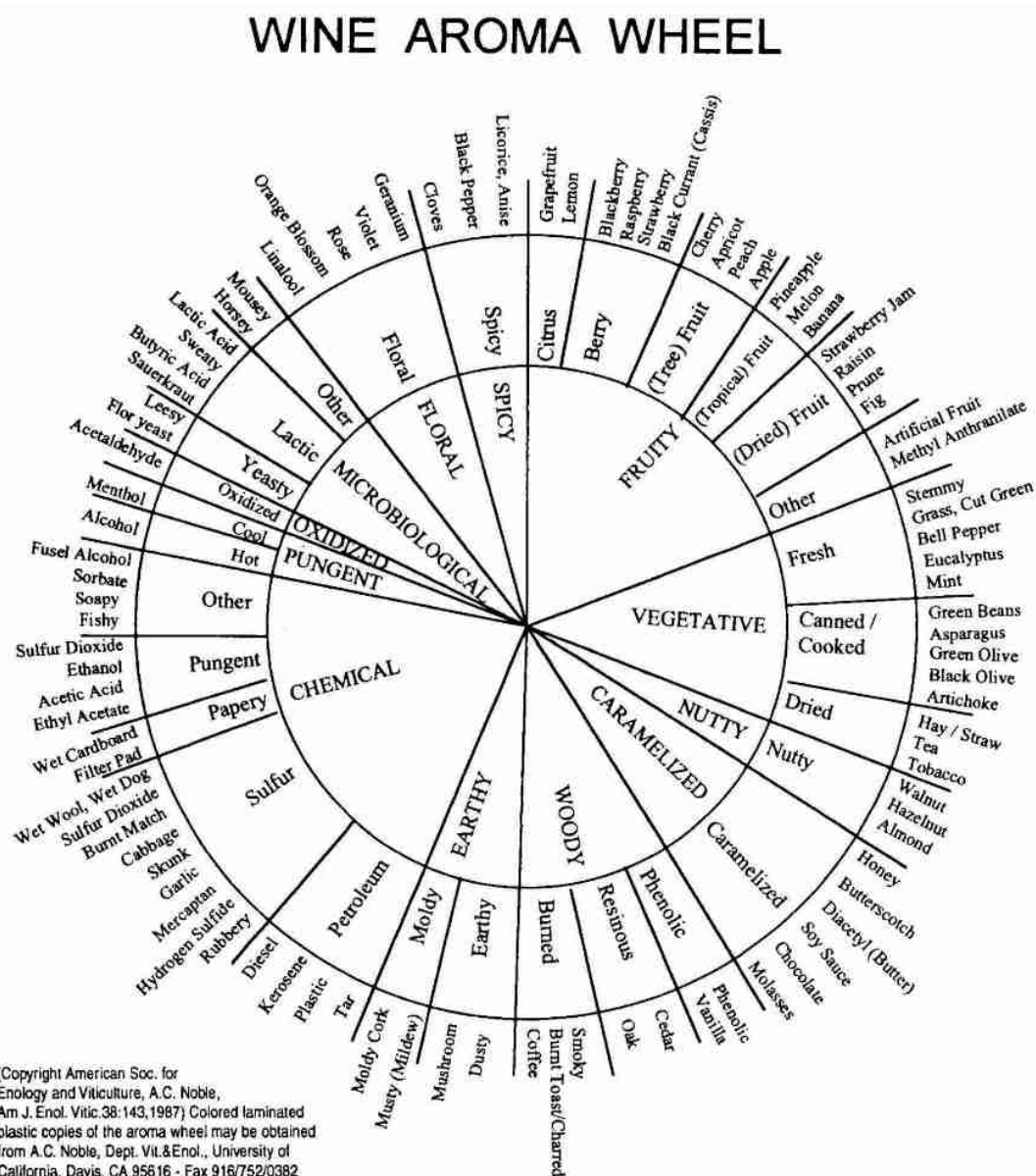
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,5-DMF	2,5-dimethylfenol
2-FF	2-furfural
2-FF-OH	2-furfurylalkohol
4-COBL	4-carbethoxybutyrolacton
5-HMF	5-(hydroxymetyl)furfural
A _{píku}	plocha píku
AMS	aminosloučeniny
AMK	aminokyselina(y)
BSTFA	N,O-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamid
CAR	karboxen (součást vlákna pro SPME)
CI	chemická ionizace
C _{látko}	hmotnostní koncentrace látky
DAD	detektor s diodovým polem
DCHM	dichlormethan
DI-SPME	extrakce tuhou fází se vzorkováním přímo v kontaktu se vzorkem
DVB	divinylbenzen (součást vlákna pro SPME)
EI	ionizace elektronem
ESI	ionizace elektrosprejem
FID	plamenově-ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GC-O	plynová chromatografie v kombinaci s olfaktometrickým detektorem
GLC	gas – liquid chromatography
GSC	gas–solid chromatography
HP	Hewlett-Packard
HP ZB-5MS	typ stacionární fáze v GC – poly(5%-difenyl-95%-dimethylsiloxan)
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV/VIS	vysoce HPLC se spektrofotometrickou detekcí
HS	Headspace-separace
HS-SMPE	extrakce tuhou fází se vzorkováním headspace
IS	vnitřní standard (internal standard)

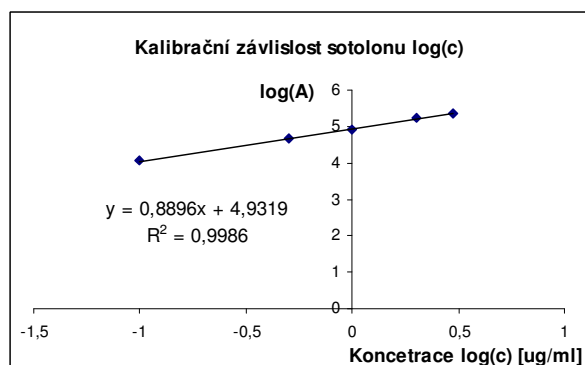
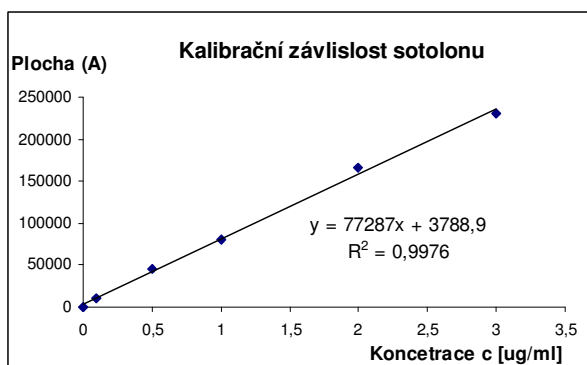
LC	kapalinová chromatografie
LD ₅₀	množství substance, které je po podání určité látky smrtelnou dávkou pro daného živočicha v 50 % případů
LOD	limit detekce
MR	Maillardova reakce
Mr	molekulová hmotnost
MS(D)	hmotnostní spektrometrie (detektor)
PDMS	polydimethylsiloxan (součást vlákna pro SPME)
PE	polyethylen
p.o.	per os (podáváno ústy)
SAL	senzoricky aktivní látky
SIM	selektivní monitorování iontu (z angl. „Selective Ion Monitoring“)
SMOCH	směrodatná odchylka
SOTOLON	3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on
SPME	extrakce tuhou fází
SPE	extrakce pevnou fází
TCD	tepelně vodivostní detektor
TIC	celkový iontový proud (z angl. „Total Ion Current“)
TOF	MS analyzátor založeným na době letu nabitých iontů
t _R	retenční čas v minutách
STD	standard
UK	Velká Británie
USA	Spojené státy americké
UV/VIS	spektroskopický detektor měřící v UV-oblasti

8. PŘÍLOHY

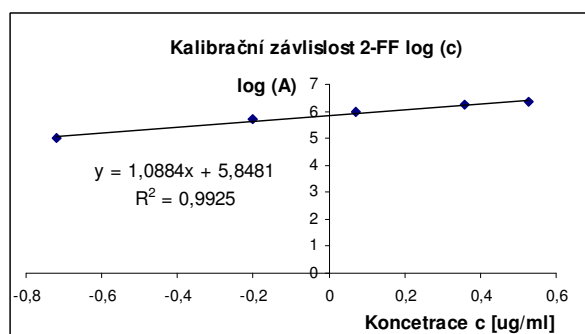
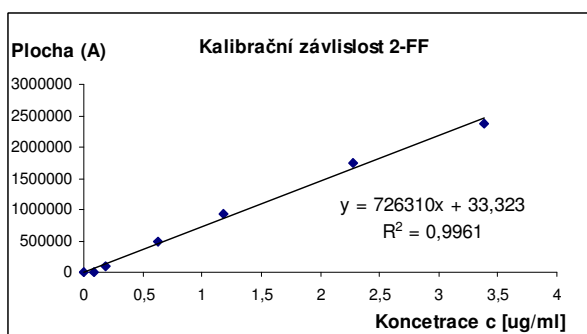
Příloha I.: Aromatický kruh vína (dle anglického originálu) [78]



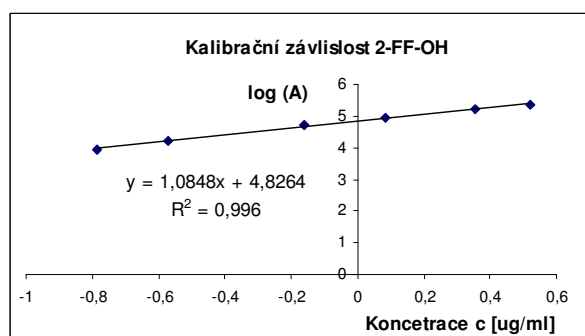
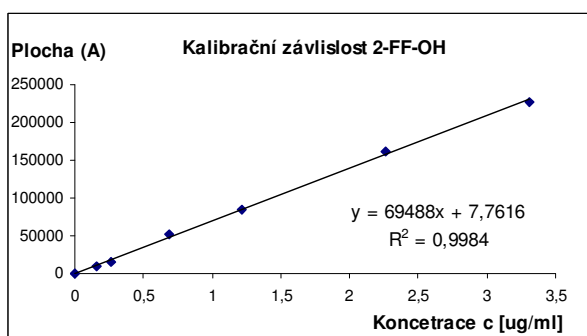
Příloha II.: Kalibrační závislosti



Graf 1. : Kalibrační závislost sotlonu



Graf 2. : Kalibrační závislost 2-FF



Graf 3. : Kalibrační závislost 2-FF-OH