

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Kamýcká 129

165 21 Praha 6 - Suchdol

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů

**Kvalitativní znaky a autenticita  
moravských vín  
Bakalářská práce**

Vedoucí práce: doc. Ing. Luboš Babička, CSc.

Autor práce: Marie Olšová

2009

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Kvalitativní znaky a autenticita moravských vín“ vypracovala samostatně a použila pouze literárních pramenů, které cituji a uvádím v přehledu literatury.

V Praze dne:

Podpis autora:

## **Autorský referát**

Bakalářskou práci tvoří literární rešerše na téma „Kvalitativní znaky a autenticita moravských vín“, která je věnována výskytu minerálních látek ve víně a jejich analytickému stanovení.

Je zde obsažen přehledný popis analytických metod používaných při hodnocení kvality a autenticity se zaměřením na minerální látky ve víně. Tyto látky se do vína dostávají především z půdy a spolu s dalšími vlivy přispívají k odrazu „terroir“ ve víně určité oblasti. Tento výraz pochází z francouzštiny a přesný překlad je *půda*. V souvislosti s vínem ale znamená součinnost mnoha faktorů, které se podílejí na výsledné kvalitě vína. Tímto výrazem tedy můžeme popsat charakteristickou chuť a vůni vína z konkrétní oblasti.

V současnosti je celosvětový trend koncentrovat výrobu a tím částečně likvidovat malé výrobce. Ale právě ti dokáží udržet rozmanitost a oblastní zvláštnosti vín. Snad každý Čech si pod slovem „víno“ vybaví moravské oblasti a s nimi spjaté vinohradnictví a vinařství. A jelikož každá oblast je ve svých vínech originální a moravská vína se dostávají mezi nejlepší i ve světovém žebříčku, nemusíme se bát, že by se regionální vinaření neuchovalo pro příští generace.

Stanovením minerálních látek ve víně zjistíme nejen kvalitu ale i autenticitu, neboli pravost, určitých vín a můžeme vytvořit profily vín z různých oblastí. Pro takovéto hodnocení se používají metody: HPLC, ICP, NMR, IRMS atd. V této práci je popsáno rozdělení těchto metod podle technik, kterými jsou vzorky zkoumány, a na jakém principu jsou tyto metody koncipovány, popř. které prvky se jimi přednostně stanovují.

Klíčová slova: minerální látky, autenticita, kvalita, terroir, analytické metody

## Summary

The bachelor thesis is a literary review of „Qualitative characteristics and authenticity of Moravian wines“, which is devoted to the occurrence of minerals in the wine and their analytical determination.

Here is included the lucid description of the analytical methods used in assessment of quality and authenticity, with an intent on minerals in wine. These substances infiltrate into a grape-vine first from the soil and together with other factors contribute to the reflection of „terroir“ in the grape-vine of each particular area. This term comes from the French and its accurate translation is *the soil*. But in the context of wine it means the cooperation of a number of factors, which contribute in various proportions to the resulting quality of grape-vine and the final wine itself. Therefore this expression can describe the characteristic taste and smell of wine from a particular area.

At present the global trend is to concentrate production, which partially leads to liquidation of small producers. However it is just the small producers whose wines often maintain the diversity and particularities of a specific region. Perhaps each and every Czech has the word „wine“ tied to the various Moravian areas and to them related viticulture and winemaking. And since each area is entirely unique in its wines, and since Moravian wines rank among the best on the global scale, we don't have to be afraid that the regional winegrowing should die out for future generations.

By determining minerals in the wine we don't only find quality but also the authenticity of definite wines and we can create profiles of wines from different regions. For such a determination, the following methods are commonly used: HPLC, ICP, NMR, IRMS etc. This thesis describes the distribution of these methods according to techniques used to examine wine samples and according to broader principles which into which these methods fall, eventually according to the various elements that are measured by these methods.

Keywords: minerals, authenticity, quality, terroir, analytical methods

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍL</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Vinařství v České republice</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Minerální sloučeniny ve víně</b> .....	<b>3</b>
3.2.1	Mikroprvky - úvod .....	3
3.2.2	Obsah mikroprvků ve víně .....	4
3.2.3	Identifikace mikroprvků .....	5
<b>3.3</b>	<b>Analytické metody používané při stanovení mikroprvků</b> .....	<b>5</b>
3.3.1	Úvod do problematiky .....	5
3.3.2	Základní přehled.....	6
<b>3.4</b>	<b>Hmotnostní spektrometrické techniky</b> .....	<b>7</b>
3.4.1	Hmotnostní spektrometrie (IRMS) – izotopický poměr měřený MS.....	8
3.4.1.1	CF – IRMS a DI – IRMS.....	8
3.4.2	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).....	9
3.4.3	Hmotnostní spektrometrie – přenos protonů (PTR – MS) .....	10
3.4.4	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) .....	11
<b>3.5</b>	<b>Spektroskopické techniky</b> .....	<b>11</b>
3.5.1	Spektroskopie nukleární magnetické resonance .....	11
3.5.1.1	SNIF-NMR .....	12
3.5.2	Infračervená spektroskopie (IR).....	13
3.5.3	Fluorescenční spektroskopie .....	13
3.5.3.1	Rentgenová fluorescenční analýza (XRF).....	14
3.5.3.1.1	PIXE.....	15
3.5.4	Atomová spektroskopie.....	15
3.5.4.1	AAS .....	15
3.5.4.2	AES.....	16
3.5.4.2.1	ICP – AES .....	17
<b>3.6</b>	<b>Separační techniky</b> .....	<b>18</b>
3.6.1	Chromatografie (C) .....	18
3.6.1.1	Kapalinová chromatografie .....	19
3.6.1.1.1	HPLC – vysoko-účinná kapalinová chromatografie .....	19
3.6.1.2	Plynová chromatografie (GC) .....	20
3.6.1.2.1	Statická head-space plynová chromatografie.....	21
3.6.1.3	Kapilární chromatografie.....	21
3.6.1.4	Micelární elektrokinetická chromatografie .....	21
3.6.2	Kapilární elektroforéza (CE).....	22
3.6.2.1	Kapilární zónová elektroforéza (CZE) .....	22
3.6.2.2	Kapilární izotachoforéza (ITP).....	23

<b>3.7</b>	<b>Ostatní metody</b> .....	<b>23</b>
3.7.1	Elektrochemické metody.....	23
3.7.2	Izotopové metody.....	25
3.7.2.1	Neutronová aktivační analýza (NAA).....	25
3.7.3	Spektrofotometrie / kolorimetrie.....	25
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>28</b>

# 1 Úvod

Téma „kvalitativní znaky a autenticita moravských vín“ jsem zvolila proto, že se moravská vína stávají stále více oblíbenými jak mezi českými konzumenty, tak mezi zahraničními. V posledních letech výrazně stoupá i jejich kvalita. Dostalo se jim ocenění na prestižních mezinárodních soutěžích např. v Monte-Carlu aj. Vinaři z Moravy dělají vše proto, aby se výroba vína v těchto oblastech zachovala i pro další generace a aby se moravská vína dostávala stále více do podvědomí konzumentů. Tato vína mají osobitý charakter daný klimatickými a geologickými podmínkami České republiky. A i přes rostoucí vliv celosvětového trhu a především nejvýznamnějších vinařských zemí se jistě vinařství na Moravě i nadále bude řadit k těm, která patří mezi světově uznávaná.

## 2 Cíl

Cílem bakalářské práce je vytvoření profilů vín z různých oblastí pomocí chemických analýz se zaměřením na minerální sloučeniny. Minerální sloučeniny v hroznech a víně pochází z půdy, ve které je réva vinná pěstována a mohou přispět k odrazu „terroir“ v určitém víně.



## **3 Literární rešerše**

### **3.1 Vinařství v České republice**

Pěstování vinné révy na našem území je podle geologických nálezů známo necelé dva tisíce let, k rozšíření vinařství v široké míře však došlo až za vlády Karla IV. V minulosti, opředené řadou bájí, pověstí a pověr, se výroba vína vyvinula v moderní potravinářské odvětví s převládající velkovýrobou, ač nemalý podíl vína stále připadá i na malovýrobu. V naší zemi patří vinařství k méně rozsáhlým průmyslovým odvětvím, ale s moderní technologií a dobrou technickou základnou a výbornými víny vysoké kvality. Pěstování vinné révy je podmíněno vhodnými klimatickými a geologickými podmínkami (Čepička 2002).

Révové víno, ač nepatří mezi základní potraviny, obsahuje i látky nezbytné pro výživu člověka, jako sacharidy, bílkoviny, mastné kyseliny, vitamíny a minerální látky (Čepička 2002).

### **3.2 Minerální sloučeniny ve víně**

#### **3.2.1 Mikroprvky - úvod**

Pojetí autenticity nápojů nebo potravin všeobecně lze definovat jako shodu se standardem. A právě získávání autentických vzorků nápojů a měření jejich parametrů je nedílnou součástí identifikace jejich falšování (Mazáč, Balík a Goliáš 1997). Počet anorganických a organických sloučenin, které mohou být stanoveny ve víně může přesáhnout 1000. Pouze asi 50 z nich jsou anorganické sloučeniny a jejich počet je omezen počtem prvků v periodické tabulce. Koncentrace minerálních látek ve víně je max. 1000 mg/l, množství stopových prvků je okolo 1 mg/l a méně a ultra-mikroelementů je 1 µg/l nebo méně. Je pravidlem, že koncentrace všech minerálních látek nepřesahuje 5 g/l vína. Tyto látky zahrnují 4 kationy a 4 aniony a představují z hlediska hmotnosti nejdůležitější složky. Celkový obsah stopových prvků je nižší než 50 mg/l a ultra-mikroelementů 50 µg/l vína (Linskens and Jackson 1988).

### 3.2.2 Obsah mikroprvků ve víně

Celkový obsah mikro- a ultra-mikroelementů se u komerčně dostupných vín skládá ze součtu primárního a sekundárního obsahu. Zpravidla je víno analyzováno na celkový obsah, protože určení primárního obsahu je velice náročné. Primární je obsah přirozeně se vyskytujících látek v půdě, které se prostřednictvím kořenů převedou do hroznů a odtud do vína. Často se jedná o charakteristickou a největší část z celkového množství a pohybuje se v širokém rozpětí v závislosti na geologické formaci, ve které se vinice nachází. Sekundární obsah mikroelementů je způsoben kontaminací přírodních nebo umělých zdrojů. Přírodní kontaminace je prakticky nevyhnutelná. Je spojena se zeměpisnou polohou vinice. Pokud jsou hrozny pěstovány v bezprostřední blízkosti moře, solných jezer nebo aktivních či neaktivních sopek, pak vína z těchto regionů často vykazují zvýšený sekundární obsah As, B, Cl, I, Fe, Mn, Hg, Na a Zn. To je dáno dodatečným příjmem těchto prvků přímo přes hrozny. Umělá kontaminace je vždy antropogenního původu, s různými příčinami, které lze rozdělit do 3 skupin: průmysl, nedovolené přidávání a „výrobní“ kontaminace. Je téměř vždy možné se jí vyhnout nebo ji alespoň značně omezit. Zvýšený sekundární obsah As, B, Cd, Pb, Hg nebo Tl může být nalezen u vín pocházejících z vinic v okolí továrny, metalurgických závodů, výroby cihel, uhlí a paliva pro elektrárny, důlní činnosti nebo dálnice. „Výrobní“ kontaminace je způsobena kombinací všech faktorů spojených s pěstováním vinné révy (hnojiva, boj proti škůdcům) a výroby vína (vinobraní, zpracování, skladování, přeprava). Tyto aktivity jsou jen zřídka, pokud vůbec, příčinou sekundární kontaminace (Linskens and Jackson 1988).

<b>Anorganické složky (mg/l) vína (typické hodnoty běžných obsahů) (Eschner 1986)</b>					
1000 - 10	10 - 1	1 - 0,1	0,1 - 0,01	0,01 - 0,001	<= 0,001
<b>K</b> 370 - 1120	<b>B</b> 5 - 2	<b>Al</b> 0,9 - 0,5	<b>As</b> 0,02 - 0,003	<b>Co</b> 0,02 - 0,001	<b>Sb</b> 0,006
<b>Mg</b> 60 - 140	<b>Fe</b> 1	<b>F</b> 0,5 - 0,05	<b>Ba</b> 0,3 - 0,04	<b>Mo</b> 0,01 - 0,001	<b>Be</b> 0,00008
<b>Ca</b> 70 - 140	<b>Cu</b> 0,5	<b>I</b> 0,6 - 0,1	<b>Pb</b> 0,1 - 0,03	<b>Ag</b> 0,02 - 0,005	<b>Cd</b> 0,001
<b>Na</b> 7 - 15	<b>Mn</b> 5 - 1,5	<b>Rb</b> 4,2 - 0,2	<b>Br</b> 0,7 - 0,01		<b>Cs</b> 0,0027
<b>C</b> 100 - 120	<b>Si</b> 6 - 1,5	<b>Sr</b> 3,5 - 0,2	<b>Cr</b> 0,06 - 0,03		<b>Au</b> 0,00006
<b>P</b> 130 - 230	<b>Zn</b> 3,5 - 0,5	<b>Ti</b> 0,3 - 0,04	<b>Li</b> 0,2 - 0,01		<b>Hf</b> 0,0007
<b>S</b> 5 - 10			<b>Ni</b> 0,05 - 0,03		<b>Nb</b> 0,001
<b>Cl</b> 20 - 80			<b>V</b> 0,26 - 0,06		<b>Hg</b> 0,00005
			<b>Sn</b> 0,7 - 0,01		<b>Se</b> 0,0006
					<b>Ta</b> 0,0005
					<b>Tl</b> 0,0001

					<b>Bi</b> 0,00015
					<b>W</b> 0,003
					<b>Vzácné zeminy</b>
					<b>Radioaktivní prvky</b>

### 3.2.3 Identifikace mikroprvků

Identifikace stopových prvků ve víně je také důležitá ze 2 hledisek: s ohledem na přísun mikroživin ve vinné révě a obsah základních nutričních látek, na které klade důraz člověk. Pro zdravý růst révy nejsou důležité pouze makroprvky, ale i stopové prvky a ultra-mikroelementy jako B, Mn, Cu, Co, Zn. Některé minerální látky a stopové prvky jsou životně důležité pro lidský organismus a musí být přijímány s denní stravou v dostatečném množství. Víno může přispět nejen minerálními látkami, které zahrnují K, Ca, Mg, ale také řadu podstatných stopových prvků jako je Cr, Co, Fe, F, I, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, Zn (Sn, V, Si) (Linskens and Jackson 1988).

## 3.3 Analytické metody používané při stanovení mikroprvků

### 3.3.1 Úvod do problematiky

Pojetí autenticity nápojů nebo potravin všeobecně lze definovat jako shodu se standardem. A právě získávání autentických vzorků nápojů a měření jejich parametrů je nedílnou součástí identifikace jejich falšování (Mazáč, Balík a Goliáš 1997).

Existuje rostoucí zájem spotřebitelů o vysoce kvalitní potravinářské výrobky s jasným zeměpisným původem. Tyto produkty jsou podporovány a pro kontrolu jakosti jsou nezbytné vhodné analytické techniky [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

Ty se dají rozčlenit do různých skupin. Mezinárodní organizace pro révu vinnou a víno je ve svém Kompendiu O.I.V. člení do čtyř skupin (metody typu I – IV). Metody typu I jsou metodami kritériálními (jedinečnými), metody typu II jsou metodami referenčními a plně validovanými, metody typu III jsou metodami „záložními“ k metodám referenčním a metody typu IV jsou metody běžné, tzv. provozní metody bez validace (Mikeš 2008).

Různými technikami jsou sledovány organické složky, minerální podíl nebo jejich kombinace. Chemometrické analýzy poskytující pomocí analytických přístrojů údaje o více

komponentech najednou, mohou lépe vyjasnit původ potraviny. Pokud mají komponenty dostatečnou popisující sílu, je třeba nastavit jejich koncentrace, které budou představovat charakteristický vzor geografického původu vzorku. Chemometrické metody umožňují detekovat tyto vzory a pomáhají odhalit zeměpisný původ vzorků. Z tohoto pohledu jsou metody členěny podle technik, kterými jsou vzorky zkoumány. Podle tohoto třídění se analytické přístupy dělí rovněž do čtyř skupin – hmotnostní spektrometrické techniky, spektroskopické techniky, separační techniky a jiné techniky [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

### 3.3.2 Základní přehled

Přehled analytických metod, které mohou být použity k určení zeměpisného původu potravin, zkratky v závorce [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

Princip	Hlavní technika	Specifické formy techniky
Hmotnostní spektrometrie	Isotope ratio mass spectrometry (IRMS)	Continuous flow IRMS (CF-IRMS)
	Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)	Dual inlet IRMS (DI-IRMS)
	Proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS)	
	Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)	
Spektroskopie	Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)	Low resolution NMR
		High resolution NMR (e.g., site specific natural isotope fractionation (SNIF))
	Infrared spectroscopy (IR)	Fourier transform IR (FTIR)
		Mid-infrared IR (MIR)
		Near-infrared IR (NIR)

Princip	Hlavní technika	Specifické formy techniky
	Fluorescence spectroscopy	Front-face fluorescence spectroscopy
	Atomic spectroscopy	Atomic absorption spectroscopy (AAS)
		Atomic emission spectroscopy (AES)
Separáčnı́ techniky	High performance liquid chromatography (HPLC)	
	Gas chromatography (GC)	
	Capillary electrophoresis (CE)	
Jiné techniky	Sensor technology	'Electronic nose'
	DNA technology	Polymerase chain reaction (PCR)
	Sensory analysis ...	

### 3.4 Hmotnostnı́ spektrometrické techniky

Hmotnostnı́ spektrometrie (MS) se používá pro objasnění složení vzorku generováním hmotnostnı́ho spektra zastoupených složek [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

Metoda byla vyvinuta počátkem 20. stoletı́ a původně byla využívána zvláště ve fyzice a chemii, mj. byly pomocí této metody objeveny stabilnı́ izotopy prvků. Po dlouhou dobu byla hlavnı́ metodou analýzy ropných produktů a analýzy těkavých organických látek obecně [Tiskové zprávy AV ČR 2006 – online].

Pracuje s dělením podle poměru  $m/z$ , kde  $m$  je hmotnost a  $z$  je náboj fragmentu. Vzorek se nejprve musí ionizovat, což často vede k fragmentaci molekuly a vzniklé ionty se

posléze dělí pomocí elektromagnetického pole. Získáme pak spektrum jednotlivých hmotností dělených nábojem. Dělení probíhá ve vakuu a možnosti dělení jsou v podstatě trojí:

První možností je urychlování elektrickým polem, takže fragmenty s menším poměrem  $m/z$  doletí k detektoru dříve; záznam tedy závisí na času letu iontu a název tohoto typu spektrometru je tedy Time-of-flight (TOF).

Druhá možnost využívá magnetismus, neboť se dráha nabitě částice v magnetickém poli zakřivuje přímo úměrně intenzitě magnetického pole. Nejčastěji dráhu iontu upravuje proměnlivé magnetické pole mezi tzv. kvadrupólem.

Třetí možností hmotnostního analyzátoru je analyzátor typu iontová past [Wikipedia 2009 – online].

### **3.4.1 Hmotnostní spektrometrie (IRMS) – izotopický poměr měřený MS**

Irms je technika, která může odlišit chemicky identické sloučeniny na základě jejich obsahu izotopu (Brenna, Corso, Tobias & Caimi, 1997). Obecně lze říci, že izotopické složení základních složek zemědělských výrobků (bílkoviny, sacharidy, tuky, minerální látky) závisí na různých faktorech. U některých z těchto faktorů lze očekávat, že budou svědčit o zeměpisném původu, jiné jsou více spojené s výrobními faktory. Tyto faktory zahrnují používání hnojiv, sezónní výkyvy a geologické faktory (např. složení půdy, nadmořská výška, apod.). Zejména tyto faktory, které ovlivňují poměr stabilních izotopů, lze použít k přiřazení regionálního původu zemědělských produktů. Irms data jsou obecně shromažďována z několika prvků a vykládány pomocí chemometrických metod [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

Tato metoda měří pouze celkové izotopické poměry, tzn. celkové poměry pro danou látku (Mazáč, Balík a Goliáš 1997).

#### **3.4.1.1 CF – IRMS a DI – IRMS**

Dva nejčastější typy nástrojů Irms jsou kontinuální tok (CF-Irms) a duální přívod (DI-Irms) (Benson, Lennard, Maynard, & Roux, 2006). S DI - Irms, musí být vzorky k analýze připraveny (tj. převedeny do jednoduchých plynů) před stanovením. K tomu se využívá speciálně konstruovaného aparátu složeného z vakuové linky, čerpadla, koncentrátorů,

reakční pece a mikro-destilačního zařízení. Tato technika je časově náročná, obvykle vyžaduje větší množství vzorku a v každém kroku se může objevit kontaminace a frakcionace izotopů. FS - Irms je technika, která se skládá z nosného plynu - helia, který s sebou nese analyt plynu do iontového zdroje Irms. Tato technika se používá pro připojení Irms k řadě automatizovaných zařízení pro přípravu vzorku. Zatímco DI - Irms je obecně nejvíce přesná metoda pro měření stabilních izotopických poměrů, CF – Irms nabízí přípravu vzorku přímo při stanovení, velikost vzorku menší, rychlejší a zjednodušené analýzy, zvýšení efektivity nákladů a možnost propojení s dalšími technikami, včetně elementární analýzy, plynové chromatografie (GC) a kapalinové chromatografie (LC) [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

V praxi to znamená, že Irms samostatně či kombinovaná s jinými technikami (např., elementární analýzou, NMR, GC nebo chemometrickými metodami) již byla použita k určení zeměpisného původu různých potravinářských výrobků [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

### **3.4.2 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)**

ICP-MS neboli hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je ultrastopová analytická metoda sloužící ke stanovení obsahu stopových množství jednotlivých prvků v analyzovaném vzorku. Tato technika umožňuje analyzovat téměř všechny prvky od lithia po uran s citlivostí od jednotek ppt po stovky ppm [Wikipedia 2009 – online].

Princip metody: roztok analytického vzorku je zmlžen a vzniklá mlha je proudem argonu vedena do hořáku, ve kterém je za pomoci střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno argonové plazma o teplotě 6 000 – 10 000 K. Za takových podmínek se rozpouštědlo okamžitě odpaří a zanikají chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin. Jednotlivé volné atomy ve většině případů vytvoří jednou kladně nabitě ionty  $Me^+$ , které jsou dále unášeny do přechodové komory, kde je snížen tlak plynu na přibližně 0,01 Torru. Po průchodu do vstupu k detektoru klesá tlak na řádově  $10^{-5}$  Torru a ionty se systémem elektromagnetických čoček dostávají do kvadrupólového detektoru. Zde jsou analyzované ionty vedeny takovým způsobem, aby na povrch zesilovače dopadly v daném časovém okamžiku pouze ionty se zvolenou hmotností. Dopadem na povrch zesilovače vzniká velmi slabý elektrický proud, který je následně zesílen a je změřena jeho intenzita. Pomocí výpočetního programu jsou naměřené intenzity signálu převedeny na

koncentrační data a výsledkem analýzy jsou údaje o koncentraci měřených prvků v analyzovaném roztoku [Wikipedia 2009 – online].

I když je možné v zásadě stanovit stejné prvky jako atomovými spektroskopickými technikami, ICP-MS má nesporné výhody v multi-prvkové charakteristice, rychlosti analýzy, detekčních limitech a izotopických schopnostech. Vedle tohoto, na rozdíl od atomové emisní spektrometrie, ICP-MS spektrometrie může přijmout pevné i kapalné vzorky [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

V současné době se metodou ICP-MS každodenně provádí desetitisíce analýz nejrůznějších druhů potravin a přípravků sloužících jako složky potravy s cílem kontrolovat obsah vybraných toxických prvků jako olovo, kadmium, arzen, nikl, berylium nebo rtuť [Wikipedia 2009 – online].

ICP-MS je často kombinována s IRMS, ale také atomovou absorpční / emisní spektrometrií pro simultánní elementární analýzy a LC (Gómez-Ariza et al., 2006).

### **3.4.3 Hmotnostní spektrometrie – přenos protonů (PTR – MS)**

PTR-MS umožňuje kvantitativní monitoring těkavých organických látek (VOC) ([Hansel and Mark, 2004] a [Lindinger et al., 1998]). Základní rozdíl mezi klasickou MS a PTR-MS je měkká ionizace, která se používá k ionizaci organických molekul. PTR-MS používá chemickou ionizaci, v níž VOC molekuly (analytu) reagují s nabitými ionty, ve většině případů s oxoniovými kationy ( $H_3O^+$ ) vyrobenými v externím doutnavém výboji iontového zdroje pracujícího v čisté vodní páře.  $H_3O^+$  ionty přenášejí proton výhradně VOC molekul, které mají protonovou afinitu vyšší než voda, tím se získává protonový analyt VOC. V PTR-MS je elektrické pole, které urychluje postup iontů přes reakční komory (Critchley et al., 2004). Přítomnost této oblasti může vést ke srážce - indukovaná disociace iontů. Po skenování celkového rozpětí budou získány „otisky“ těkavých sloučenin [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

Velkou výhodou PTR-MS, hned vedle absolutní koncentrace, je, že fragmentace analytu molekuly je velmi redukována, a tak vyrobená hmotnostní spektra je mnohem jednodušší interpretovat a je jednoduché je vyčíslit ([Hansel and Mark, 2004] a [Lindinger et al., 1998]). Přesto je PTR-MS jedno-dimenzionální technika, která charakterizuje sloučeniny pouze přes jejich hmotnost a která není dostatečná pro pozitivní identifikaci jednotlivých VOC [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].



### 3.4.4 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)

GC (plynová chromatografie) odděluje složky ze směsi a MS (hmotnostní spektrometrie) charakterizuje každou složku jednotlivě. Tímto způsobem lze kvalitativně a kvantitativně analyzovat složité směsi obsahující řadu sloučenin. K tomu, aby sloučenina mohla být analyzována pomocí GC-MS, musí být dostatečně těkavá a tepelně stabilní. V GC-MS jsou ionty potřebné pro hmotnostní analýzu obvykle tvořeny elektronovým vlivem ionizace. Plynové molekuly jsou „bombardovány vysokou – energií“ elektronového paprsku (70 eV). Vzhledem k tomu, že MS detektor je určen pouze pro analýzu čistých materiálů, je třeba brát v úvahu pečlivou přípravu vzorku před použitím v GC-MS. GC-MS je jednou z nejčastěji používaných technik a představuje metodu volby pro analýzu potravin kvůli své vysoké reprodukovatelnosti (Pillonel et al., 2003). Nicméně, tato technika je poměrně drahá a časově náročná [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

## 3.5 Spektroskopické techniky

### 3.5.1 Spektroskopie nukleární magnetické resonance

Nukleární magnetická resonance (NMR) je jednou z nejdůležitějších spektroskopických technik používaných v chemickém, biochemickém, biologickém a medicínském výzkumu [Pinkas, J. a Moravec, Z. 2007 – online].

Je to fyzikálně-chemická metoda využívající interakce atomových jader (s nenulovým jaderným spinem, např.  $^{13}\text{C}$ ) s magnetickým polem. Zkoumá rozdělení energií jaderného spinu v magnetickém poli a přechody mezi jednotlivými spinovými stavy vyvolané působením radiofrekvenčního záření [Wikipedia 2008 – online].

Podle chování v magnetickém poli lze jádra všech prvků rozdělit do dvou skupin:

- 1) jádra s magnetickým momentem
- 2) jádra bez magnetického momentu

Nukleární magnetickou rezonanci lze vyvolat jen u jader s magnetickým momentem. Mezi ně patří jádra, která mají lichý počet protonů nebo nukleonů. Z praktického hlediska se jeví jako nejvýznamnější NMR jader o kvantovém čísle  $\frac{1}{2}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ). Hovoříme potom o  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -HNMR,  $^{15}\text{N}$ -NMR, ... spektroskopii. Jádra s větším kvantovým

číslem ( $^2\text{H}$ ,  $^{10}\text{B}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ) dávají příliš složitá NMR spektra a jsou tedy méně vhodná pro praktickou aplikaci. Mezi jádra bez magnetického momentu patří třeba  $^{12}\text{C}$  a  $^{16}\text{O}$ , proto je, i když se často vyskytují v organických molekulách, nemůžeme měřit [Řezanka, P. 206 – online].

Nejčastěji kapalným vzorek je při NMR spektroskopii umístěn mezi póly silného elektromagnetu. Působením tohoto magnetického pole dochází k energetickému odlišení mezi oběma spinovými stavy. Při měření je vzorek ozařován vysokofrekvenčními pulsy (předávání energie vzorku, excitace), jejichž důsledkem je přechod z jednoho spinového stavu do druhého. Při relaxaci do původního stavu dochází k uvolnění energie, která je registrována (závislost energie na čase) a Furierovou transformací převedena na spektrum (závislost intenzity signálu na frekvenci) [Řezanka, P. 2006 – online].

V analýze potravin se používají dva typy NMR - nízké rozlišení NMR (LR-NMR) a NMR s vysokým rozlišením (HR-NMR) (Ibañez & Cifuentes, 2001). Dnes jsou LR-NMR nástroje (využívající frekvenci 10-40 MHz) malé, snadno ovladatelné a poměrně levné. Proto jsou vhodné k provádění rychlých a reprodukovatelných měření. Nicméně LR-NMR vyžaduje referenční metody k provádění kvantitativních analýz a v mnoha případech je přesnost metody limitujícím faktorem. HR-NMR (používající frekvenci nad 100 MHz) byla použita ve více studiích pravosti potravin než LR-NMR (Reid, O'Donnell & Downey, 2006). Výhodou HR-NMR nad LR-NMR je, že je možné získat mnohem podrobnější informace o molekulární struktuře potravinářského vzorku. Mezi hlavní nevýhody patří, že je jednou z nejvíce nákladných analytických technik (Ibañez & Cifuentes, 2001).

### 3.5.1.1 SNIF-NMR

Jednou z hlavních současných aplikací HR-NMR je SNIF-NMR (Ibañez & Cifuentes, 2001). Touto metodou lze měřit poměr izotopů D/H v jednotlivých částech molekuly. Metoda je založena na kvantitativním měření obsahu deuteria. Měření místně specifických poměrů pomocí metody SNIF-NMR přináší novou informaci o botanickém či syntetickém původu molekuly, o geoklimatickém prostředí při biosyntéze molekuly nebo o technologických podmínkách výroby produktu. Tyto informace nelze získat jinými metodami (Mazáč, Balík a Goliáš 1997).

SNIF-NMR je často kombinována s IRMS a chemometrickými metodami. Hlavní nevýhodou SNIF-NMR je, že vyžaduje pracnou přípravu vzorku, na níž se podílí řada čištění a koncentrací (Ibañez & Cifuentes, 2001).

### 3.5.2 Infračervená spektroskopie (IR)

Infračervená spektroskopie je fyzikálně chemická analytická metoda. Studuje interakce elektromagnetického záření v infračerveném oboru spektra (800 nm až 1000 nm) s analyzovaným materiálem. Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (A), na vlnové délce dopadajícího záření. Důležitým faktorem pro úspěšnost analýzy je existence velkého souboru infračervených spekter standardů a reálných vzorků, tzv. knihovny spekter. Výsledek analýzy je potom získán jako korelace mezi spektrem analyzovaného vzorku a standardu z knihovny spekter [Novotná, M. a Machovič, V. 2008 – online].

S rozvojem výpočetní techniky v 80. letech 20. století dochází k praktickému rozšíření infračervených spektrometrů s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry). Jedná se o přístroje pracující na principu interference spektra, které na rozdíl od disperzních přístrojů měří interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. K získání klasického spektrálního záznamu je nutno použít matematickou metodu Fourierovy transformace. FTIR spektrometry vykazují celou řadu výhod. Při měření dopadá na detektor vždy celý svazek záření. Takové uspořádání umožňuje i experimenty, při nichž dochází k velkým energetickým ztrátám, tj. měření silně absorbujících vzorků nebo měření s nastavci pro analýzu pevných či kapalných vzorků v odraženém světle – reflexní infračervená spektroskopie [Novotná, M. a Machovič, V. 2008 – online].

### 3.5.3 Fluorescenční spektroskopie

Molekulová fluorescence je optické záření z molekul, které byly vybuzené do vyšší energetické hladiny absorpcí elektromagnetického záření. Typický fluorimetr obsahuje

excitační zdroj, vzorek buňky a fluorescenční detektor. „Široký pruh“ excitačního světla ze zdroje projde monochromátorem, kterým projdou jen vybrané vlnové délky. Fluorescence je rozptýlena jiným monochromátorem a zjištěna pomocí fotonásobičové trubice. Skenování excitačního monochromátoru dává excitační spektra a snímání fluorescenčního monochromátoru dává fluorescenční spektra. Fluorescenční spektroskopie může být použita k identifikaci a analýze fluorescentních sloučenin s velmi nízkou koncentrací (řádově v miliardtinách částic) a zároveň poskytuje informace o struktuře, složení a stabilitě. Lze analyzovat jak tuhé, tak tekuté vzorky. Hlavní výhodou fluorescenční detekce ve srovnání s absorpčním měřením (např. IČ) je dosažení vyšší citlivosti (100-1000krát), protože fluorescenční signál je v podstatě nulový (Froehlich, 1989). Kromě toho je fluorescenční spektroskopie jednoduchá neinvazivní a nedestruktivní technika, je relativně levná a umožňuje rychlou analýzu [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

S klasickou fluorescenční spektroskopií se provádí měření ve zředěných roztocích, kde je absorpance pod 0,1. Při vyšší absorbanci, což představuje snížení intenzity fluorescence a narušení emisních spekter, jsou pozorovány pomocí vnitřních filtrů. Emitované fotony jsou shromážděny v úhlu  $56^\circ$  k povrchu vzorku, s cílem minimalizovat artefakty, které vznikají při buzení fotonů odražených od vzorku. Tato technika umožňuje kvantitativní zkoumání v prášcích, stejně jako v koncentrovaných nebo i neprůhledných vzorcích [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

### **3.5.3.1 Rentgenová fluorescenční analýza (XRF)**

Tato metoda nedestruktivního zjišťování složení látek je založena na měření charakteristického rentgenového záření vzbuzeného ozařováním zkoumaného vzorku. Měřený vzorek ozařujeme buď X-zářením z rentgenové lampy, nebo zářením gama z vhodného radionuklidu. Interakcí tohoto fotonového záření s atomy zkoumaného vzorku dochází k fotoefektu většinou na slupce K, načež při přeskočení elektronů z vyšší slupky (L) na uvolněné místo dochází k emisi charakteristického X-záření, jehož energie je jednoznačně určena protonovým číslem  $Z$  atomu. Spektrometrickou analýzou energie (vlnové délky) takto vzniklého fluorescenčního záření lze zjistit, které prvky jsou přítomné ve zkoumaném vzorku a podle intenzity jednotlivých píků fluorescenčního záření lze určit množství (koncentraci) těchto prvků ve vzorku [Ullmann, V. – online].

#### 3.5.3.1.1 PIXE

Particle-Induced X-ray Emission nebo Proton Induced X-ray Emission (PIXE) je technika používaná při stanovení elementárního charakteru materiálu či vzorku. V případě, že je materiál vystaven iontovému paprsku, nastanou atomové interakce a dojde k vypouštění EM záření o vlnových délkách rentgenové části elektromagnetického spektra, které jsou specifické pro jeden prvek. Tato technika byla poprvé navržena v roce 1970 Svenem Johanssonem z Lund University ve Švédsku a během příštích několika let dovyvinuta spolu s jeho kolegy Rolandem Akselssonem a Thomasem Johanssonem. Nedávné rozšíření PIXE pomocí těsně zaměřených paprsků dává další schopnosti mikroskopické analýze. Tato technika, nazývaná microPIXE, může být použita k určení rozdělení stopových prvků v širokém spektru vzorků. A související techniky, particle-induced gamma-ray emission (PIGE), mohou být použity k detekci některých lehkých prvků [en.Wikipedia 2008 – online].

### 3.5.4 Atomová spektroskopie

Atomovou spektroskopií lze použít k analýze plyných atomů kovů a nekovů v různých vzorcích [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

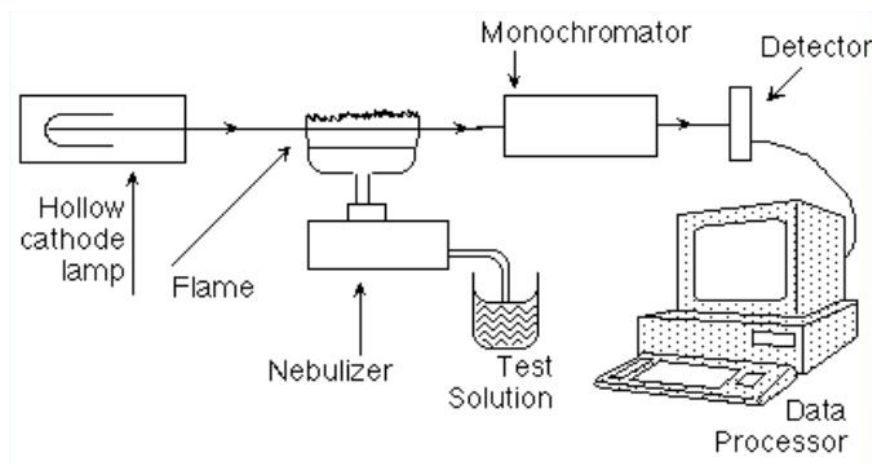
#### 3.5.4.1 AAS

Atomová absorpční spektroskopie (AAS) je optická metoda, která využívá měření absorpce elektromagnetického záření volnými atomy prvků. Atomy stanovovaného prvku jsou z kapalného stavu převedeny do plynného atomárního stavu, přičemž volné atomy jsou v základním energetickém stavu. Atomizace se provádí v plameni (2000-3000 K) (F – AAS) nebo elektrotermicky v grafitové kyvetě (GF – AAS) [Vávra, V. a Losos, Z. 2008 – online].

Princip analýzy je založen na emisi primárního záření (zdroj výbojky nebo laser), které má definované emisní čáry stanovovaného prvku. Toto záření prochází absorpčním prostředím, kde volné atomy prvku absorbují určité vlnové délky. Monochromátor pak izoluje vybranou rezonanční čáru a detekční systém zaznamená zeslabení toku původního záření v jednotkách absorpce. Zeslabení primárního svazku je úměrné koncentraci stanovovaného

prvku v roztoku. Před měřením neznámého vzorku je třeba provést kalibrační měření vzorků se známým obsahem sledovaného prvku a sestavit kalibrační křivku. Citlivost měření může být pro některé prvky až v ppm (g/t) [Vávra, V. a Losos, Z. 2008 – online].

Schéma spektrometru [Slunečková, B. 2005 – online]



GF-AAS má několik výhod oproti F-AAS. Například F-AAS lze analyzovat pouze roztoky, zatímco GF-AAS můžeme analyzovat roztoky, suspenze a pevné vzorky. Na druhé straně matrice vzorku má mnohem větší vliv na výsledky získané v GF-AAS než v jakékoliv jiné atomové spektroskopické technice [Luykx, D.M.A.M. and Van Ruth, S.M. 2007 - online].

Neurčitá absorpce způsobená maticí komponent může být upravena elektronicky porovnáním pozadí absorpce deuteria nebo vodíkové lampy. Tento problém může vyřešit Zeemann-AAS (Linskens and Jackson 1988).

### 3.5.4.2 AES

Atomová emisní spektroskopie (AES) je analytická metoda založená na vybuzení, detekci a vyhodnocení emisního spektra vzorku. Prvním krokem této techniky je “rozbití” vzorku na atomy, jejich současné ionizace a excitace. Toho se dosahuje působením vysokých teplot (stovky až tisíce °C) na vzorek, například v plameni speciálního hořáku, v elektrickém oblouku, v silnoproudém výboji nebo pomocí laserového paprsku. Výsledkem je tzv. plazma, horká “směs” ionizovaných a excitovaných atomů. Celý děj probíhá v ochranném prostředí (nejčastěji v plynném argonu), aby se zabránilo reakcím mezi ionty a složkami atmosféry.

Excitace atomů spočívá v energetických přeskočích elektronů v atomových obalech.

V důsledku dodání velkého množství tepelné energie elektronu v atomovém obalu dojde k jeho přeskoku na vyšší energetickou hladinu. Vzniklá “díra”, vakance, je okamžitě obsazena jiným elektronem, který “seskočí” z vyšší energetické hladiny. Přitom se v důsledku zákona zachování energie uvolní energie ve formě fotonu (záření) o určité vlnové délce. Tento jev se nazývá emise a jeho výsledkem je emisní spektrum atomu. Emisní spektrum je pro každý prvek charakteristické. Z rozložení čar v emisním spektru je možno určit druh atomů (kvalitativní složení vzorku), z relativní intenzity čar množství atomů jednotlivých prvků ve vzorku (kvantitativní složení vzorku). Metodami AES s jiskrovými spektrometry lze měřit obsah většiny prvků s mezí stanovitelnosti X0 – X00 ppm. Současně je možno stanovit velké množství prvků. Analýzy mají poměrně nízkou správnost a přesnost, proto jsou metody AES vhodné spíše pro kvalitativní a semikvantitativní analýzu. K analýze postačuje poměrně malé množství vzorku, který je ale během analýzy zničen, takže analýzu nelze opakovat [Hrstka, T., Chvátal, M., Kühn, J., Matějka, S., Malý, K., Martaus, S., Sláma, J., Zimák, J. 2002 – online].

#### 3.5.4.2.1 ICP – AES

Atomová emisní spektroskopie s induktivně vázanou plazmou je dalším používaným zdrojem ionizovaných částic. Používá se argonová plazma o teplotě cca 1000° C. Plazmový iontový zdroj je v současnosti nejpoužívanější a je použit ve všech přístrojích označených ICP - AES. Konstrukce přístroje je v podstatě stejná, pouze k detekci spektrálních čar se nepoužívají fotodesky, ale fotonásobiče nebo v nejmodernějších přístrojích polovodičové detektory. Meze stanovitelnosti prvků závisejí na analyzovaném materiálu a u různých prvků jsou rozdílné (většinou 0,000X – X00 ppm). Jedná se o velmi rychlou, přesnou, spolehlivou a relativně levnou metodu. Nevýhodou je nutnost převedení vzorku do roztoku [Hrstka, T., Chvátal, M., Kühn, J., Matějka, S., Malý, K., Martaus, S., Sláma, J., Zimák, J. 2002 – online].

Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP – OES) se rovněž používá při stanovení stopového množství minerálních látek. Použitím ICP – OES v axiálním uspořádání s polovodičovým nábojovým detektorem (CID) umožňuje stanovit souběžně kolem 70 prvků v rozsahu vlnových délek 170 – 900 nm a získané kompletní obrazy spekter je možné od sebe navzájem odečítat (Fišera a Goliáš 1997).

## 3.6 Separační techniky

### 3.6.1 Chromatografie (C)

Chromatografie je velká skupina separačních metod, založených na rozdílné afinitě dělených látek ke stacionární (nepohyblivé) a mobilní fázi. Chromatografické metody patří k nejdůležitějším metodám, které umožňují analyzovat složité směsi biologických molekul (analytické provedení pokusů) nebo vybrané složky směsi izolovat (preparativní provedení). Lze je rozdělit podle několika kritérií:

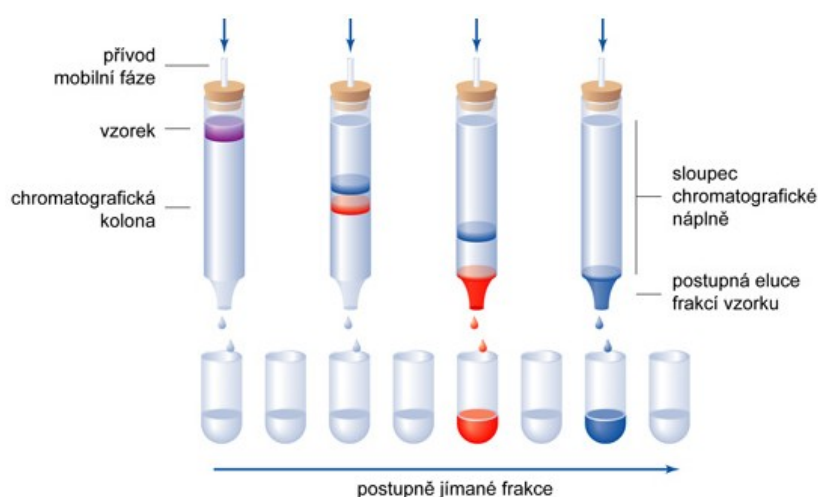
1) podle skupenství mobilní fáze: **a)** plynová, angl. **gas chromatography**, GC, **b)** kapalinová, angl. **liquid chromatography**, LC (zejména ve zkratce HPLC);

2) podle uspořádání systému: **a)** na sloupci (stacionární fáze je ve tvaru sloupce, který se běžně nazývá kolona, odtud též chromatografie na koloně), **b)** v plošném uspořádání (nosičem je papír nebo tenká vrstva stacionární fáze rozprostřená na inertní podložce – odtud též chromatografie na tenké vrstvě, angl. **thin-layer chromatography**, TLC); **c)** vsádková, angl. **batch chromatography**, kdy se na stacionární fázi nejdříve z roztoku (např. v kádince) naadsorbují dělené látky, stacionární fázi se pak naplní kolona a nakonec se látky z kolony postupně vymyjí vhodnou mobilní fází;

3) podle složení mobilní fáze: **a)** isokratické dělení (mobilní fáze má po celou dobu dělení konstantní složení), **b)** dělení s proměnlivým složením mobilní fáze (v tomto případě se obvykle některé složky dělené směsi nejdříve pevně zachytí na stacionární fázi, ostatní složky se mobilní fází vymyjí, poté se náhle nebo postupně mění složení mobilní fáze a zachycené látky se postupně z kolony vymývají);

4) podle separačního principu: chromatografie **a)** adsorpční (látky se na stacionární fázi adsorbují), **b)** rozdělovací (stacionární fázi je kapalina, zachycená na pevný nosič, dochází tak k rozdělení mezi dvě nemísitelné kapaliny, např. viz chromatografie papírová), **c)** iontoměničová (stacionární fázi je ionex, s nímž dělené látky, především ionty, interagují elektrostaticky), **d)** s hydrofobní interakcí (stacionární fáze má nepolární charakter a dělené látky s ní interagují prostřednictvím hydrofobních interakcí), **e)** gelová permeační (stacionární fázi tvoří gel s póry o určitém průměru, látky se dělí podle velikosti a tvaru molekul); **f)** bioafinitní (využívá se specifické interakce molekul). Často se uplatňuje více těchto principů při jednom chromatografickém uspořádání [Kodíček, M. 2007 – online].

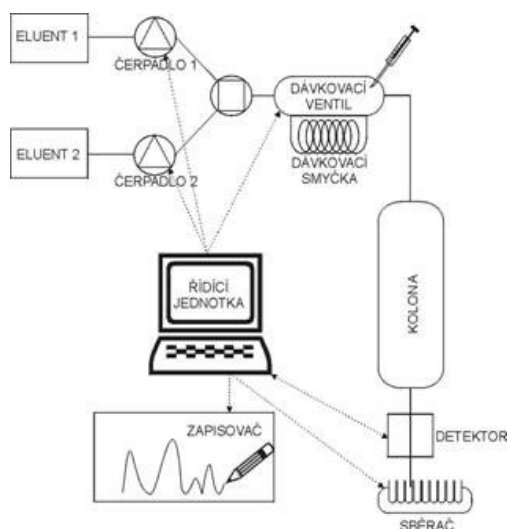




### 3.6.1.1 Kapalinová chromatografie

#### 3.6.1.1.1 HPLC – vysoko-účinná kapalinová chromatografie

Při kapalinové chromatografii se látky dělí ve dvoufázovém dělicím systému na základě adsorpce, výměny iontů, fyzikální distribuce látek mezi kapalnou mobilní a s ní nemísitelnou kapalnou stacionární fází, nebo na principu pronikání molekul z mobilní fáze do pórů tuhých částic, které mají funkci molekulového síta. Celý děj se odehrává ve speciálně konstruovaných trubcích, nazývaných kolony. V tomto uspořádání se dosahuje vynikajícího rozlišení jednotlivých složek směsí. HPLC pracuje s úzkými ocelovými, skleněnými nebo křemennými kolonami, které obsahují nosné částice (<math><10 \mu\text{m}</math>) se stacionární fází. Průtok mobilní fáze neprobíhá účinkem gravitace jako u klasické kapalinové chromatografie, ale obvykle pod určitým tlakem. Někdy postačuje 1 MPa, skleněné kolony vydrží až 30 MPa, ale čerpadla mohou vyvinout tlak kolem 100 MPa. Častěji se používá nízkotlaká HPLC (několik MPa) než vysokotlaká HPLC (desítky MPa) [Štern, P. – online].



Připojené schéma ukazuje nejdůležitější části zařízení pro HPLC; za zmínku stojí okolnost, že v tomto sloupcovém uspořádání může kolona pracovat na jakémkoliv separačním principu (iontoměnič, reversní fáze, gelová permeační chromatografie, adsorpční chromatografie atd.) [Kodíček, M. 2007 – online].

### 3.6.1.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie (GC) je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze: mobilní fází je nosný plyn, pohybující se skrz nebo podél stacionární fáze, která je umístěna v koloně. Je použitelná na látky nebo jejich deriváty, které lze převést do plynné fáze za použitých teplot. Plynová chromatografie je založena na mechanismu adsorpce, rozdělování nebo vylučování [Český lékopis 2001 – online].

Základem chromatografie je nepřetržité ustalování rovnováhy dělené látky mezi pohyblivou a stacionární fází. Každá molekula dělené látky přechází nepřetržitě z pohybující se plynné fáze (nosného plynu) na povrch adsorbentu nebo do filmu kapaliny a zase zpět do plynné fáze. Každý nepřetržitý proces lze lépe popsat rozdělením na elementární procesy - úseky, kde předpokládáme dosažení úplné rovnováhy mezi fázemi. Každý takový úsek se nazývá teoretické patro. Délka kolony, na které se dosáhne takového rozdělení jako na teoretickém patru, se nazývá výškový ekvivalent teoretického patra [Ústav konzervace potravin a technologie masa – online].

Existují různé GC detektory s různými typy selektivity (zhruba v pořadí od nejčastějších k méně častým): plamenový ionizační detektor (FID), tepelně vodivostní detektor, detektor s elektronovým „záchytem“, foto-ionizační detektor, plamenový

fotometrický detektor, termionický detektor, atomový emisní detektor a ozono- nebo fluoro-indukční chemi-luminiscenční detektor (Grob, 2004).

#### 3.6.1.2.1 Statická head-space plynová chromatografie

Head-space plynová chromatografie je metoda zvláště vhodná pro dělení a stanovení těkavých látek přítomných v pevných nebo kapalných vzorcích. Tato metoda je založena na analýze plynné fáze, která je v rovnováze s pevnou nebo kapalnou fází [Český lékopis 2001 – online].

#### 3.6.1.3 Kapilární chromatografie

Kapilární chromatografie používá kapiláry naplněné stacionární fází jako kapalinová chromatografie, avšak pro pohon mobilní fáze v koloně využívá elektroosmózu jako pumpu. Díky pístovému profilu elektroosmotického toku dosahuje ve velké většině případů lepší účinnosti separace než klasická kapalinová chromatografie (Gaš in Vesmír 2001).

#### 3.6.1.4 Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie kombinuje prvky chromatografie a elektroforézy. Do základního elektrolytu se přidá látka, která je schopna vytvářet micely – kulovité vícemolekulární útvary s určitou strukturou. Mezi takové látky patří třeba mýdla nebo tenzidy. Micely jsou nabitě a putují v kapiláře v elektrickém poli jako kterékoli nabitě částice. Jestliže se do kapiláry nadávkuje neutrální vzorek, nemůže sám putovat v elektrickém poli, ale může interagovat s micelami, které putují kolem něj, přičemž jednotlivé složky vzorku mohou interagovat různě. Tím, že jsou unášeny micelami, získají vlastní pohyb, který umožní jejich separaci (Gaš in Vesmír 2001).

### **3.6.2 Kapilární elektroforéza (CE)**

Tímto termínem se označuje separační metoda využívající pohyb nabitých částic, ať už malých iontů či makromolekul (proteinů, fragmentů DNA) v elektrickém poli, a to buď přímo ve volném roztoku elektrolytu, nebo v nějakém nosném médiu, například gelu. Je-li elektrolytem nebo médiem naplněna kapilára, říká se metodě kapilární elektroforéza. Podle způsobu separace se dělí na kapilární zónovou elektroforézu, kapilární izotachoforézu a další (Gaš in Vesmír 2001).

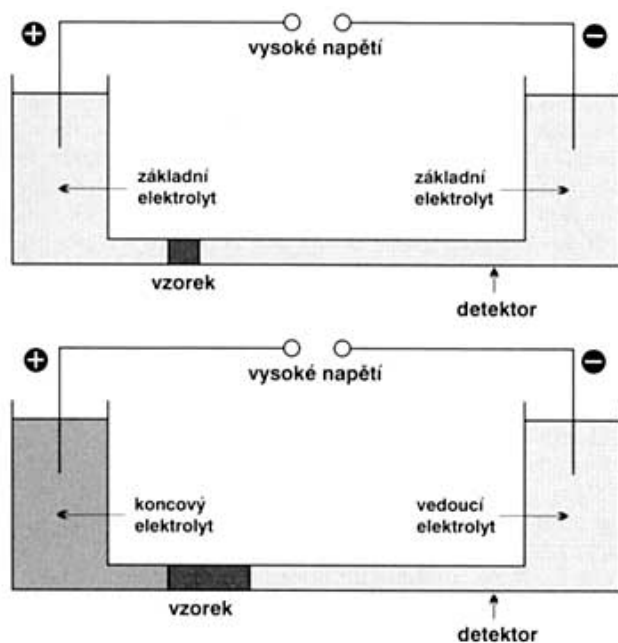
CE je možné použít k analýze a charakterizaci širokého spektra analytů od jednoduchých anorganických iontů, malých organických molekul, peptidů, bílkovin, nukleových kyselin virů, mikrobů, a dalších částic (Kvasnička, 2005).

#### **3.6.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)**

Transport analyzovaných iontů (analytů) a jejich separace probíhá v kapiláře, která propojuje dvě nádoby. Kapilára je většinou z taveného křemene, má vnitřní průměr řádově desítky či stovky mikrometrů a délku mezi 10 centimetry až 1 m. Do roztoku základního elektrolytu jsou vnořeny elektrody, jimiž se přivádí elektrické napětí obstarávající pohyb iontů. Základní elektrolyt se plní do kapiláry přetlakem nad hladinou kapaliny v jedné nádobce. Potom se jeden konec kapiláry ponoří do nádoby s analyzovaným vzorkem a malý sloupeček vzorku vnikne na její začátek. Kapilára se vrátí do nádoby se základním elektrolytem a zapne se hnací napětí. V elektrickém poli se některé analyzované látky pohybují rychleji, jiné pomaleji, což způsobuje jejich separaci. Na druhém konci kapiláry je detektor zaznamenávající průchod jednotlivých rozdělených látek. Jako detekční metodu lze využít třeba absorpci tenkého svazku monochromatického světla, který prochází napříč kapilárou. Signál z detektoru v okamžicích průchodu analyzovaných iontů změní svou hodnotu a na časovém záznamu se ukáže špička – pík neboli zóna (čím je vyšší a užší, tím větší je účinnost separace) (Gaš in Vesmír 2001).

### 3.6.2.2 Kapilární izotachoforéza (ITP)

Od zónové elektroforézy se liší tím, že používá dva elektrolyty: vedoucí a koncový. Vedoucím elektrolytem je naplněna jedna nádobka a kapilára, koncový elektrolyt je v druhé nádobce. Analyzovaný vzorek se dávkuje na počátek kapiláry (tj. na rozhraní mezi vedoucím a koncovým elektrolytem). Ion vedoucího elektrolytu se volí co nejrychlejší (rychlejší než kterýkoli ion dělené směsi), ion koncového elektrolytu co nejpomalejší. Při pohybu v elektrickém poli se pak analyzované ionty sice separují, ale nevzdalují se od sebe a zůstávají jeden za druhým ve sloupečcích. Po separaci se všechny sloupce pohybují stejnou rychlostí. Díky samozaostřujícímu efektu izotachoforézy odolávají rozhraní mezi sloupci difúzi a zůstávají ostrá. Časový záznam signálu při průchodu zón přes detektor pak místo píků poskytuje pravoúhlé schody, jejichž délka je přesně přímo úměrná množství analytu – kvantitě (Gaš in Vesmír 2001).



Uspořádání dvou základních elektroforetických metod, nahoře kapilární zónová elektroforéza, dole kapilární izotachoforéza (Gaš in Vesmír 2001).

## 3.7 Ostatní metody

### 3.7.1 Elektrochemické metody

Nejen spektroskopické metody a aktivační analýzy, ale také voltametrické metody jsou dnes mocné nástroje pro stopovou analýzu (Geissler 1980; Henze and Neeb 1986).

Předpokladem je, že musí být vzorek v roztoku. Polarografické a voltametrické metody jsou lepší než všechny ostatní metody, díky jejich příznivému poměru co se ceny a výkonu týče. Některé prvky mohou být často určeny současně. Všechny současné moderní voltametrické metody jsou založeny na stejnosměrné polarografii, která byla vyvinuta J. Heyrovským v roce 1923 (Linskens and Jackson 1988).

Princip spočívá ve vyhodnocování závislosti elektrického proudu na napětí na dvojici elektrod, které jsou ponořené do roztoku, v němž probíhá elektrolyza. Závislosti mají tvar vln, jejichž poloha charakterizuje jednotlivé druhy látek. Z velikosti nárůstu proudu lze určit koncentraci příslušné látky. Jako katoda slouží rtuťová kapková elektroda. Na povrchu kapky rtuti se vytvoří elektrická dvojrůstka. Při zvyšování potenciálu mezi anodou a katodou dojde k vyloučení příslušných iontů na katodě a tím k nárůstu proudu. Proud je omezen množstvím iontů v roztoku. Jakmile se množství vylučujících se iontů rovná počtu přicházejících iontů z roztoku, proud přestane růst. Hodnota středu nárůstu polarizační křivky je charakteristická pro danou látku. Do roztoku se přidává základní (indiferentní) elektrolyt, např. kyselina, aby se vodivost roztoku zvýšila. Dále se přidává povrchově aktivní látka - typicky želatina, jejímž úkolem je zabránit vzniku maxima na začátku polarografické vlny. Důležité je i probublávání vzorku v polarografické nádobce inertním plynem kvůli odstranění kyslíku, který vytváří na polarogramu protáhlé vlny a znehodnocuje záznam [wikipedia 2009 - online].

Vývoj pulzní techniky, kterou vynalezl Barker v roce 1953, výrazně zlepšil možnosti voltametrických metod. V těchto technikách, je pravoúhlý potenciální impuls aplikován na dc-potenciál elektrody a proud je měřen na konci pulsu, kdy se nabíjecí proud, narozdíl od difúzního proudu, prakticky nerovná nule. Z různých metod založených na tomto principu je dnes široce používána v oblasti stopové analýzy zejména diferenční pulsní polarografie (DPP). Touto metodou mohou být stanoveny koncentrace v rozmezí  $10^{-7} - 10^{-8}$  mol/l. Tyto metody jsou zvláště důležité pro stanovení těžkých kovů (Linskens and Jackson 1988).

K dalšímu zvýšení citlivosti je používána stripping voltametrie (Neeb 1969; Wang 1985). V nejjednodušším případě se provádí obohacování elektrochemicky vložením kovů do stacionárních Hg – elektrod. Kovy jsou pak znovu rozpuštěny z amalgámu pulsní anodickou stripping voltametrií (DPASV). Touto metodou byly stanoveny např. Cu, Sb, Bi, Tl, Sn, Pb, Cd (Linskens and Jackson 1988).

## 3.7.2 Izotopové metody

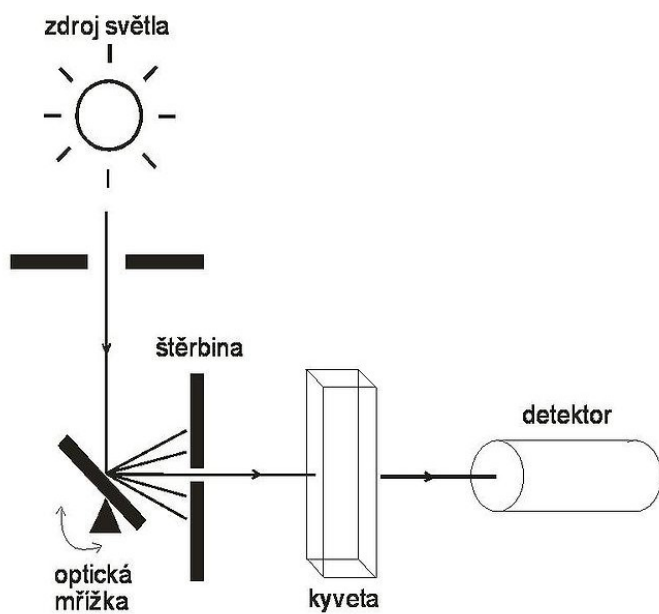
### 3.7.2.1 Neutronová aktivační analýza (NAA)

Neutronová aktivační analýza je vysoce citlivá metoda analýzy chemického složení látek, založená na záchytu neutronů v jádrech zkoumané látky, čímž vznikají radioaktivní jádra. Ozářením zkoumaného vzorku neutrony tak dochází ke vzniku radionuklidů (k "aktivaci" vzorku), načež spektrometrickou analýzou energií a intenzit emitovaného záření (především  $\gamma$ ) aktivovaného vzorku lze stanovit příslušný radionuklid a zpětně "dohledat" i jemu odpovídající (neaktivní) výchozí nuklid obsažený ve vzorku; s použitím vhodné kalibrace též jeho obsah (koncentraci) ve zkoumaném materiálu [Ullmann, V. – online].

### 3.7.3 Spektrofotometrie / kolorimetrie

Přes růst významu instrumentálních metod v posledních desetiletích (Crosby 1977), se stále častěji používají spektrofotometrické metody pro stanovení relativně vysoké koncentrace stopových prvků ve víně (Stoppler and Nurnberg 1984). Jsou to stále atraktivní metody analýzy, neboť jsou snadno proveditelné, vyžadují poměrně jednoduché nástroje a jsou dostatečně citlivé pro mnoho prvků (Marczenko 1981). Po chemické reakci jsou prvky určeny měřením selektivní absorpce světla reakčními produkty. Měření se provádí s filtrem fotometrů nebo v současné době nejčastěji s spektrofotometrem. Kvantitativní stanovení je založeno na Beerově zákonu. Chemické reakce jsou prováděny s oxidačně redukčními činidly nebo komplexními činidly, zejména těmi organickými. Takto vzniklé sloučeniny mohou být často extrahovány v organických rozpouštědlech, což je postup, kterým se zvyšuje citlivost a selektivita. Selektivitu lze také optimalizovat úpravou pH nebo přidáním komplexních činidel k zamaskování rušivých prvků. Zpravidla musí být při spektrofotometrických metodách vzorek nejprve mineralizován například tím, že jej zoxidujeme kyselinami nebo ho zpopelníme. Některé prvky mohou být stanoveny přímo ve víně extrakční spektrofotometrií. Tyto přímé kolorimetrické metody však mohou přinést výsledky, které jsou příliš nízké (pokud jsou používána komplexní činidla slabší než látky, které se přirozeně ve víně vyskytují) (Ivanov a kol. 1972). Pouze absorbance na  $1 \times 10^{-2}$  lze měřit s běžnými spektrofotometry. Nicméně lze detekční limity zlepšit pomocí sofistikovaných přístrojů (Linskens and Jackson 1988).

Uspořádání spektrofotometru [Vejražka,M. 2008 – online]





## 4 Závěr

Pro stanovení kvality výrobku se používají další metody, jako sensorové technologie, DNA analýzy nebo sensorická analýza, ty však nezahrnují stanovení minerálních sloučenin. Nicméně jsou důležité při rozpoznávání geografického původu.

Tato práce se zabývá především minerálními sloučeninami obsaženými ve víně a chemickými metodami, které se mohou použít a také používají při stanovení těchto a jiných látek ve vzorcích. Při aplikaci těchto metod na konkrétní vzorky vín dostaneme profily vín z různých oblastí.

## 5 Přehled literatury

- ČEPIČKA, J. 2002. Vinařství, in Kadlec, P. a kol. (eds.), Technologie potravin II. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, s. 182.
- ČESKÝ LÉKOPIS, 1997, zrušen vyhláškou 258/2003 Sb. Nahrazen vyhláškou č. 180/2002 Sb. [online]. Dostupné z <[http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_28.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_28.htm)>
- FIŠERA, M., GOLIÁŠ, J. 1997. Hladiny kovových iontů v moravských vínech, in Sborník vědecké konference – II. kontrola autentičnosti a kvality vín, pálenek a dalších nápojů. Lednice na Moravě, s. 21.
- GAŠ, B. 2001. Kapilární elektroforéza. Vesmír, 80, 7, 370-373
- GEISLER 1980; Henze and Neeb 1986 in Linskens, H.F., Jackson, J.F. 1988. Modern Methods of Plant Analysis – Wine Analysis. Heidelberg, Berlin, 381s.
- GÓMEZ-ARIZA ET AL., 2006 in Luykx, D.M.A.M., Van Ruth, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products [online]. Web of Science, 15. března 2008 [cit. 2008-09-15]. p.9. Dostupné z <[http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1)>
- GROB, 2004 in Luykx, D.M.A.M., Van Ruth, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products [online]. Web of Science, 15. března 2008 [cit. 2008-09-15]. p.13-14. Dostupné z <[http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1)>
- HRSTKA, T., CHVÁTAL, M., KÜHN, J., MATĚJKA, S., MALÝ, K., MARTAUS, S., SLÁMA, J., ZIMÁK, J. Úvod do mineralogie [online]. Skripta Dictor 2002 [cit. 2009-01-18]. Dostupné z <[http://skripta.dictor.net/obecna\\_min/o\\_66.php](http://skripta.dictor.net/obecna_min/o_66.php)>
- IBAÑEZ & CIFUENTES, 2001 in Luykx, D.M.A.M., Van Ruth, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products [online]. Web of Science, 15. března 2008 [cit. 2008-09-15].p.13-14. Dostupné z <[http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1)>
- KODÍČEK, M. Chromatografie, from Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-01-09]. Dostupné z <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=chromatografie](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=chromatografie)>

KODÍČEK, M. Chromatografie kapalinová vysoce-účinná. From Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-01-09]. Dostupné z <[http://gvm.vm.cz/vyuka/bio\\_pojmy/ebook.html?p=chromatografie\\_kapalinova\\_vysoceucinn a](http://gvm.vm.cz/vyuka/bio_pojmy/ebook.html?p=chromatografie_kapalinova_vysoceucinn a)>

KVASNIČKA, 2005 in Luykx, D.M.A.M., Van Ruth, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products [online]. 15. března 2008 [cit. 2008-09-15]. p.13-14. Dostupné z <[http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1)>

LINSKENS, H.F., JACKSON, J.F. 1988. Micro-Element Analysis in Wine and Grapes, in Modern Methods of Plant Analysis – Wine Analysis. Heidelberg, Berlin, p. 67-86.

LUYKX, D.M.A.M., VAN RUTH, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products [online]. Web of Science 2007, 15. března 2008 [cit. 2008-09-15]. Dostupné z

<[http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=P2nO8EIFOKFPPg@4JDa&page=1&doc=1)>

MAZÁČ, J., BALÍK, J., GOLIÁŠ, J. 1997. Kvalita moravských vín a jejich rozlišení izotopovou analýzou, in Sborník vědecké konference – II. kontrola autentičnosti a kvality vín, pálenek a dalších nápojů. Lednice na Moravě, s. 3-4.

MEZINÁRODNÍ KONFERENCE O HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII [online]. Tiskové zprávy AV ČR, 25.srpna 2006 [cit. 2009-01-28]. Dostupné z <<http://www.veda.cz/article.do;jsessionid=5C821738A163C181C12A957E3A404C1B?articleId=13256>>

MIKEŠ, O. 2008. Aktuální informace o mezinárodních analytických metodách O.I.V, in Národní konference s mezinárodní účastí – Kvalita moravských a českých vín a jejich budoucnost. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, s.9.

NOVOTNÁ, M., MACHOVIČ, V. Možnosti infračervené mikrospektrologie při analýze historických materiálů [online]. Centrální laboratoře VŠCHT v Praze [cit. 2008-11-06]. Dostupné z <<http://www.technologiaartis.org/4iden-moz.html>>

PINKAS, J., MORAVEC, Z. Řešené úlohy ze spektroskopie nukleární magnetické rezonance [online]. Masarykova univerzita, Brno 2007 [cit. 2008-10-25]. Dostupné z <<http://nmr.sci.muni.cz/index.html>>

PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE. Hmotnostní spektrometrie [online]. Wikipedie: Otevřená encyklopedie, 27. ledna 2009 [cit. 2009-01-28]. Dostupné z <[http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Hmotnostn%C3%AD\\_spektrometrie&oldid=3551899](http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Hmotnostn%C3%AD_spektrometrie&oldid=3551899)>

PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE. ICP-MS [online]. Wikipedie: Otevřená encyklopedie, 15. ledna 2009 [cit. 2009-01-28]. Dostupné z <<http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=ICP-MS&oldid=3507011>>

PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE. NMR spektroskopie [online]. Wikipedie: Otevřená encyklopedie, 8. listopadu 2008 [cit. 2008-10-25]. Dostupné z <[http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=NMR\\_spektroskopie&oldid=3256006](http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=NMR_spektroskopie&oldid=3256006)>

PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE. Polarografie [online]. Wikipedie: Otevřená encyklopedie 9. března 2009 [cit. 2009-03-10]. Dostupné z <<http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Polarografie&oldid=3706339>>

ŘEZANKA, P. Nukleární magnetická rezonance (NMR) [online]. ChemWeb by Luky, 11. července 2006 [cit. 2008-10-25]. Dostupné z <[http://www.chemweb.estranky.cz/clanky/ksicht---serial/nuklearni-magneticka-rezonance-\\_nmr\\_>](http://www.chemweb.estranky.cz/clanky/ksicht---serial/nuklearni-magneticka-rezonance-_nmr_>)

SLUNEČKOVÁ, B. Atomová absorpční spektroskopie [online]. Fyzika na GBN 2005 [cit. 2009-02-03]. Dostupné z <<http://fyzika.gbn.cz/phprs/image/fyzika/prace/bara/index4.htm>>

ŠTERN, P. Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii [online]. Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha [cit. 2009-01-09]. Dostupné z <<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>>

ULLMANN, V. Aplikace ionizujícího záření – jaderné a radiační metody [online]. Astronuklfyzika [cit. 2009-01-18]. Dostupné z <<http://astronuklfyzika.cz/JadRadMetody.htm>>

ÚSTAV KONZERVACE POTRAVIN A TECHNOLOGIE MASA. Plynová chromatografie [online]. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. Dostupné z <[http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/navody/oborI/GC.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/GC.pdf)>

VÁVRA, V., LOSOS Z. Metody výzkumu chemického složení minerálů [online]. Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzity v Brně, 14. října 2008 [cit. 2008-11-28]. Dostupné z <[http://www.sci.muni.cz/mineralogie/kap\\_5\\_1\\_metody\\_chem/kap\\_5\\_1\\_metody\\_chem.htm#5](http://www.sci.muni.cz/mineralogie/kap_5_1_metody_chem/kap_5_1_metody_chem.htm#5)>

VEJRAŽKA, M. Spectrophotometer [online]. Wikimédie Commons 10. dubna 2008 [cit. 2009-02-10]. Dostupné z <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Spektrofotometr.jpg>>

WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. Particle-Induced X-ray Emission [online]. Wikipedia: The Free Encyclopedia, 29. November 2008 [cit. 2009-01-18]. Dostupné z <[http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Particle-Induced\\_X-ray\\_Emission&oldid=254782042](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Particle-Induced_X-ray_Emission&oldid=254782042)>