

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

**Stanovení vybraných kovů ve víně, burčáku a jeho  
frakcích**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Autor:**

**Bc. Pavla Fabiánová**

**Studijní obor:**

**Analytická chemie**

**Vedoucí práce:**

**doc. Ing. David Milde, Ph.D.**

**2024 Olomouc**

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Pavla Fabiánová

Název práce: Stanovení vybraných kovů ve víně, burčáku a jeho frakcích

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2024

Anotace:

Tato práce se zabývá stanovením vybraných kovů (Na, Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd a Pb) ve vzorcích vína a burčáku pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací. Je diskutován význam kovů ve víně a možné interference použitých metod, stejně jako jejich validace. Jsou porovnány obsahy kovů v jednotlivých ročnících čtyřech analyzovaných odrůd vín a také v různých frakcích burčáku. Tyto frakce byly získány rozdělením vzorků na pevnou a kapalnou část, ale také použitím centrifugačních filtrů.

Klíčová slova: ICP-MS, víno, burčák, atomová absorpční spektrometrie, kovy, rozklad s mikrovlnným zářením, frakcionace

Počet stran: 57

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Pavla Fabiánová

Title: Determination of selected metals in wine, partially fermented grape must and its fractions

Type of thesis: master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

The year of submission: 2024

Annotation:

This thesis is focused on determination of selected metals (Na, Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd and Pb) in wine samples and samples of partially fermented grape must by inductively coupled plasma mass spectrometry and flame atomization atomic absorption spectrometry. The importance of metals in wine and the possible interferences of used methods, as well as their validation, are discussed. The metals content in the individual vintages of four analyzed wine varieties and also in different fractions of partially fermented grape must are compared. These fractions were obtained by separating the samples into solid and liquid parts, but also by using centrifugation filters.

Keywords: ICP-MS, wine, partially fermented grape must, atomic absorption spectrometry, metals, microwave-assisted digestion, fractionation

Number of pages: 57

Number of appendices: 0

Language: Czech

**Prohlášení:**

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

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

V Olomouci dne .....

Podpis

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Davidovi Mildemu, Ph.D. za ochotu, vstřícnost, cenné připomínky a čas, který mi při zpracování diplomové práce věnoval. Díky patří rovněž Ing. Radku Sotolářovi, Ph.D. z Mendelovy univerzity v Brně za poskytnutí vzorků vína pro tuto práci. Děkuji také své rodině za pomoc při obstarávání vzorků burčáku a především za podporu během celé doby studia.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>2</b>
2.1	Víno a fáze jeho výroby .....	2
2.2	Kovy ve víně a burčáku .....	4
2.2.1	Výskyt.....	5
2.2.2	Původ .....	5
2.2.3	Účinky .....	6
2.2.3.1	Důsledky přítomnosti kovů ve víně.....	6
2.2.3.2	Role kovů v rostlinách .....	8
2.2.3.3	Působení na člověka .....	9
2.3	Používané analytické metody.....	10
2.3.1	Rozklady vzorku s mikrovlnným zářením.....	10
2.3.2	Atomová absorpční spektrometrie.....	12
2.3.2.1	Základní princip.....	12
2.3.2.2	Instrumentace .....	13
2.3.2.3	Interference.....	14
2.3.3	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem .....	15
2.3.3.1	Princip .....	16
2.3.3.2	Instrumentace .....	16
2.3.3.3	Interference.....	18
2.4	Doposud provedené studie.....	20
2.4.1	Speciační a frakcionační analýza.....	24
<b>3</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>26</b>
3.1	Vzorky.....	26
3.2	Chemikálie .....	27
3.3	Pomůcky a přístroje.....	29
3.4	Příprava vzorků .....	30

3.4.1	Rozklad vzorků .....	31
<b>3.5</b>	<b>Příprava kalibračních standardů .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6</b>	<b>Stanovení pomocí ICP-MS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.7</b>	<b>Stanovení pomocí AAS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.8</b>	<b>Validace .....</b>	<b>35</b>
3.8.1	Určení meze detekce a stanovitelnosti.....	35
3.8.2	Pravdivost .....	35
3.8.3	Další validační parametry .....	36
<b>3.9</b>	<b>Použitý software pro zpracování dat .....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Výsledky validace .....</b>	<b>37</b>
4.1.1	Meze detekce a stanovitelnosti .....	37
4.1.2	Linearita a rozsah kalibrace.....	38
4.1.3	Pravdivost .....	40
4.1.4	Preciznost .....	40
<b>4.2</b>	<b>Výsledky měření reálných vzorků .....</b>	<b>41</b>
4.2.1	Celkový obsah kovů ve vzorcích .....	41
4.2.2	Trendy v jednotlivých odrůdách vína dle ročníků .....	45
4.2.3	Výsledky analýzy frakcí .....	46
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>52</b>

## Seznam použitých zkratk

AAS – atomová absorpční spektrometrie

angl. – anglicky/anglického

cps – počet iontů dopadlých na detektor za sekundu (*z angl. counts per second*)

CRM – certifikovaný referenční materiál

CZE – kapilární zónová elektroforéza

ČNM – český normalizovaný moštoměr

ETA – elektrotermická atomizace

FAAS – plamenová atomová absorpční spektrometrie

GC – plynová chromatografie

ICP – indukčně vázané plazma

ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

IUPAC – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (*z angl. International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LC – kapalinová chromatografie

LC-ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s kapalinovou chromatografií

LOD – mez detekce (*z angl. limit of detection*)

LOQ – mez stanovitelnosti (*z angl. limit of quantification*)

MS – hmotnostní spektrometrie

NMWCO – mezní hodnota nominální molekulové hmotnosti (*z angl. nominal molecular weight cut off*)

OIV – Mezinárodní organizace pro révu vinnou a víno (*z angl. International Organization of Vine and Wine*)

RSD – relativní směrodatná odchylka



SEC-HPLC-ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s vysokoúčinnou vylučovací kapalinovou chromatografií

TOF – analyzátor doby letu (*z angl. time of flight*)

UV – ultrafialová (oblast spektra)

VIS – viditelná (oblast spektra)

VDK – výbojka s dutou katodou

# 1 Úvod

Víno je jedním z nejoblíbenějších alkoholických nápojů na světě. [1; 2] Stalo se součástí mnoha společenských událostí, je zmiňován také jeho možný pozitivní vliv na lidské zdraví při střídmé konzumaci. Vyrábí se téměř na všech kontinentech a rozmanitost jeho chutí i chemického složení pramenní v nesčetném množství odrůd, enologických technik i klimatických faktorů. [2] Není však jediným oblíbeným produktem z vinné révy. Zejména v České republice se těší oblibě částečně zkvašený hroznový mošt neboli burčák.

Stanovení kovů ve víně a podobných produktech má smysl z mnoha různých důvodů. Některé kovy mohou významně ovlivnit sensorické vlastnosti vína, ať už jde o chuť, vůni, barvu či zákal. Jiné zásadně ovlivňují samotný proces jeho výroby. V neposlední řadě jde o bezpečnost a zdraví konzumentů v případě vyššího obsahu toxických kovů. Naopak obsah esenciálních prvků, mezi které patří i některé kovy, může být zajímavý z výživového hlediska. Znalosti celkového obsahu kovů se využívá také pro charakterizaci konkrétního vína a jeho klasifikaci podle zeměpisného původu i pro posouzení pravosti, neboť obsah některých kovů může mít přímý vztah ke složení půdy v oblasti, kde vinná réva rostla. [1; 2] V analýze kovů v potravinách hraje důležitou roli také speciální a frakcionační analýza.

Cílem této práce je stanovení vybraných kovů ve vzorcích vína a burčáku s využitím metod hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a atomové absorpční spektrometrie. Vzorky burčáku byly navíc podrobeny frakcionační analýze, a to jak ve smyslu srovnání obsahu kovů v pevné a kapalné části vzorku, tak také na základě analýzy filtrátu a podílu nepřefiltrovaného přes 3kDa a 10kDa centrifugační filtry. Výsledky analýzy vín byly použity pro porovnání různých ročníků v rámci odrůd.

Teoretická část se zabývá výrobou vína, původem a rolí kovů ve víně i důležitostí kontroly jejich obsahu. Dále také použitými analytickými metodami (jejich základním principem, instrumentací a možnými interferencemi) a v neposlední řadě také souhrnem některých již provedených experimentů z hlediska výskytu kovů v tomto typu vzorků. V experimentální části jsou popsány používané postupy přípravy vzorků a jejich analýzy a také proces validace analytických metod. Výsledky jednotlivých vzorků vín jsou srovnány mezi jednotlivými ročníky a odrůdami, porovnán je také obsah kovů v jednotlivých frakcích burčáku.

Stanovované kovy byly vybrány na základě výsledků semikvantitativního měření.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Víno a fáze jeho výroby

Víno je nápoj vznikající výhradně částečným nebo úplným alkoholovým kvašením čerstvých hroznů (rozdrčených nebo ne) či hroznového moštu. Obsah alkoholu ve víně by neměl být menší než 8,5 %, z určitých důvodů však může být v některých regionech tato hranice snížena legislativou na pouhých 4,5 %. [3; 4] V České republice lze zvýšit celkový obsah alkoholu na 15 % objemových u vína s chráněným označením původu a chráněným zeměpisným označením vyrobeného z hroznů sklizených v ČR. [4]

Dle legislativy EU se víno a podobné produkty (např. částečně zkvašený hroznový mošt) mohou vyrábět jen z hroznů révy vinné (*Vitis vinifera* L.), případně z odrůd vzniklých jejím křížením s jinými druhy rodu *Vitis*. [5] Česká republika má dvě hlavní vinařské oblasti, kde se vinná réva pěstuje – Čechy a Moravu. Ty se dále dělí na celkem šest vinařských podoblastí, tvořených jednotlivými vinařskými obcemi s viničními tratěmi. [6] Období sklizně nastává na přelomu léta a podzimu.

První fází výroby vína po sklizni hroznů je odstopkování a drcení. Při něm dochází k odstranění nežádoucích částí, jako jsou listy a stopky a dále k narušení bobulí, což umožní uvolnění šťáv (moštu) – vzniká tzv. rmut. Při drcení nesmí dojít k porušení semen, ze kterých by se uvolnily nežádoucí hořké látky. [7; 8] Další nakládání s moštem má již zásadní vliv na vlastnosti a kvalitu výsledného vína. [8]

Koncentrace řady sloučenin je různá v samotné hroznové šťávě, ve slupkách a ve dřeni hroznů. Kromě organických molekul (taniny, antokyany atd.) se to týká například i draslíku a dalších minerálních látek. [8] Kontakt šťávy se slupkami (macerace) je proto důležitým krokem pro extrakci těchto živin a látek dodávajících chuť a aroma do výsledného produktu. Z popraskaných buněk se uvolňují také enzymy, které proces extrakce dále podporují, podílejí se na syntéze sloučenin důležitých pro chuť a také hydrolyzují makromolekuly na jednodušší formy dále využitelné kvasinkami a bakteriemi. Doba, po jakou jsou slupky s hroznovým moštem v kontaktu, se liší podle druhu vína. Následuje lisování rmutu pro získání dalších podílů moštu a fermentace. [7]

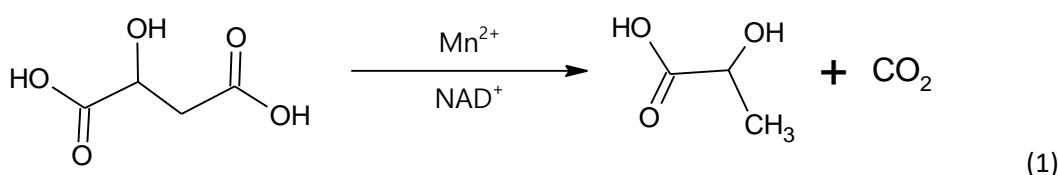
Při výrobě bílého vína jsou slupky brzy odstraněny, aby nedocházelo k přílišné extrakci fenolů a přirozené mikroflóry, která se na nich vyskytuje (macerace většinou netrvá více než několik hodin). [8] Kvašení nastává až po oddělení moštu od pevných součástí (matolin – vylisované slupky) lisováním. [7]

U červených vín trvá macerace déle (týdny) a probíhá současně s kvašením. Vznikající ethanol mimo jiné dále podporuje extrakci antokyanů, taninů (tříslovin) a dalších aromatických látek z pevných součástí. Rozpuštěné fenolické sloučeniny dodávají červenému vínu jeho vzhled, chuť a další vlastnosti, projevující se např. i při jeho zrání. [7]

Růžová vína se vyrábí typicky z modrých hroznů, které jsou před kvašením podrobeny pouze krátké maceraci. Šťáva z narušených hroznů se ponechává v kontaktu s pevnými částmi bobulí při nízkých teplotách, dokud není extrahováno dostatečné množství barviv (obvykle 12–24 hod). Volně odtékající a vylisovaná šťáva (obecně mohou být spojovány v různých poměrech podle typu a stylu požadovaného vína) je následně oddělena a podrobena kvašení podobně jako u bílého vína. Případně je také možné lisovat celé hrozny, což je pomalý proces vedoucí k pouze omezené extrakci barviv. [7]

Během kvašení kvasinky přeměňují cukry na alkohol a CO<sub>2</sub>, uvolňuje se teplo. Teplota je důležitým parametrem, který se při výrobě kontroluje – má vliv na aktivitu kvasinek a vznik různých aromatických látek. Kvašení může začít spontánně vlivem kvasinek přirozeně se vyskytujících na ovoci (hroznových bobulích), případně z přístrojů na drcení. Běžně se však mošt tzv. inokuluje známými kvasinkami (nejčastěji *Saccharomyces cerevisiae*). Ty kromě přeměny cukrů na alkohol také vytvářejí buket a chuť typickou pro dané víno. Kvašení je ukončeno úmrtím kvasinek při dosažení určitého obsahu alkoholu. [7]

Po alkoholovém kvašení ještě někdy, zejména u červených vín a v regionech s chladnějšími klimatickými podmínkami, kde snížení kyselosti zlepšuje chuťové charakteristiky vína, následuje tzv. malolaktické (jablečno-mléčné) kvašení. Během něj dochází ke zjemnění chuti díky přeměně dikarboxylové kyseliny jablečné na monokarboxylovou kyselinu mléčnou, a tedy nárůstu pH (rovnice 1). U bílých vín není tak výhodné, neboť tato vína jsou jemnější a náchylnější k nežádoucím změnám v chuti. Zachování kyselosti a svěží chuti je u nich navíc často žádoucí. Rozvoji jablečno-mléčného kvašení lze zabránit přidávkem SO<sub>2</sub>, včasným čiřením a skladováním při nízkých teplotách. [7]



Další fází výroby je zrání v sudech nebo tancích, které trvá po dobu několika týdnů nebo měsíců. Během skladování uniká přebytečný CO<sub>2</sub>, vytrácí se kvasinkový zápach, suspendovaný materiál se sráží, může docházet ke změně aromatu a vzniku vyžralého buketu. Poté je víno stáčeno – dojde k jeho oddělení od pevných částí (převážně buňky mrtvých kvasinek a bakterií, zbytky buněk hroznů a vysrážené taniny, proteiny a krystaly vinanu draselného) usazených na dně. K jejich usazení došlo buď přirozeně nebo během čiření, tedy srážení s čířidly (např. bentonit, želatina, aktivní uhlí, albumin, kasein a další), kdy na základě adsorpce nebo opačného elektrického náboje vznikají větší agregáty, které rychleji sedimentují. Kdyby nebyly odděleny, mohly by způsobit vznik nežádoucích pachů, zákalu a podpořit mikrobiální kažení. Víno je před lahvováním také často filtrováno. [7]

Mezi povolené úpravy při výrobě vína dále patří například tepelné ošetření, přidavek enzymů, oxidu siřičitého, některých regulátorů kyselosti, provzdušňování kyslíkem, argonem nebo dusíkem, využití kousků dubového dřeva apod. [8; 9]

Celý proces je zakončen lahvováním. Při něm je do vína často přidáváno malé množství SO<sub>2</sub> (0,8-1,5 mg·l<sup>-1</sup>) jako konzervant. Víno dále zraje v lahvích několik měsíců či let, což přispívá k harmonizaci jeho chuti a vymizení pachuti acetaldehydu vzniklého kontaktem s kyslíkem při lahvování. [7]

Důležitým meziproduktem výroby vína je burčák, tedy částečně zkvašený hroznový mošt s obsahem alkoholu vyšším než 1 % objemové a nižším než tři pětiny celkového obsahu alkoholu (součet skutečného obsahu alkoholu a alkoholu, který by mohl vzniknout úplným zkvašením obsažených cukrů). [5] Burčák je oblíbeným nápojem typickým pro Českou republiku, známý je také v některých sousedních státech. Jako burčák smí být označován pouze pokud pochází výlučně z vinných hroznů, které byly sklizeny a zpracovány na území České republiky. Nabízen může být pouze v období mezi začátkem srpna a koncem listopadu roku, ve kterém byly hrozny sklizeny, pokud je ve stavu kvašení. [10]

## **2.2 Kovy ve víně a burčáku**

V hroznech i ve víně je obsaženo mnoho minerálních látek. Většina z nich je pro rostliny, včetně vinné révy, důležitá ve stopovém množství jako mikroživiny (Cu, Fe, Mn, Mo, Zn) a slouží jako kofaktory či aktivátory enzymů a vitamínů. Kromě metabolických procesů v rostlinách významně ovlivňují i fermentační procesy. [1] Nalezneme je také v rostlinných pigmentech. Některé, například Ca a Mg, patří i k makroživinám. [7] Kovy se

mohou vyskytovat ve formě volných iontů, v komplexech s organickými kyselinami i jako specie s velkými molekulami pektických polysacharidů, peptidů, proteinů a polyfenolů. [1]

### 2.2.1 Výskyt

Nejzastoupenějším kovovým iontem v hroznové šťávě a moštu je draselný kation. Asi 30–40 % draslíku v hroznech se nachází ve slupkách, kde reguluje osmotický tlak v buňkách podobně, jako to dělá cukr v dužině. Některé kovy, jako Ca, Mn nebo Zn mají tendenci hromadit se v semenech. [7]

Na extrakci kovů do hroznového moštu má vliv délka macerace, teplota, lisování, kyselost a obsah alkoholu. [1] Těžké kovy se během kvašení často vysráží, a proto je jejich obsah ve víně většinou menší než v hroznových bobulích. Vyšší obsah potom napovídá, že došlo ke kontaminaci až po stádiu kvašení. [7] Výskyt kovů ve víně je však velmi různorodý. [2]

### 2.2.2 Původ

Existují dva hlavní zdroje kovů ve víně – přírodní a antropologický. Přirozeně se ionty kovů dostávají do rostlin vinné révy z půdy. Jejich výsledná koncentrace závisí na jejich příjmu rostlinou, akumulaci v plodech, ale i klimatických vlivech (např. horké klima koreluje většinou s větším obsahem draslíku v hroznech než mírné a chladné klima). [1; 2; 7] Kromě vstřebávání kořeny hraje roli ale i usazování prachu na bobulích. [1; 2] Z přírodních zdrojů se takto navyšuje koncentrace Sr, Mn, Al, Ti, znečištěním z lidské činnosti pak zejména těžkých prvků, Pb, V, Zn, Ni a Cd. [11] Dalším působením člověka – při pěstování (použití hnojiv, pesticidů), výrobě (použití čeridel, přísad, stroje, potrubí, skladovací nádoby, ...), ze znečištěného životního prostředí a případně z podvodných praktik (použití zakázaných chemikálií) se do produktů z vinné révy dostávají další kovy. [2; 11]

Fe, Al, Cr a Zn se mohou dostat do vína z nástrojů použitých při výrobě, obzvláště pokud jsou zkorodované. K tomu může přispívat i oxid siřičitý, hojně využívaný ve vinařství nejen jako konzervant, ale také dezinfekční prostředek k čištění použitého vybavení. Hliník, spolu s prvky vzácných zemin, však pochází zejména z použití bentonitu. [7; 11] I aktivní uhlí a další čeridla mohou být zdrojem kovů – např. Ca, Mg či Cr. [7] V malé míře se hliník vyskytuje ale i v samotné hroznové šťávě (řádově okolo  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , ve finálním víně byl pozorován nárůst na  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). [1]

Hlavním zdrojem Cd jsou potom fosforečná hnojiva. [2] Hnojiva a pesticidy mohou zvyšovat také obsah Cu, As, Mn, Pb či Zn. [2; 11] V úvahu je nutné brát například

i kontaminovaný kompost – zvyšuje koncentrace Zn, Pb, Cd, Cu, někdy až k toxickým hladinám. [7] Pesticidy (síran měďnatý) jsou vedle kontaktu s bronzovými materiály při výrobě největším zdrojem mědi ve víně. Přílišné používání pesticidů na bázi mědi může poškodit jak samotnou vinnou révu, tak i kvalitu vína. Měď je ale také často přidávána záměrně, za účelem odstranění pachů organických sloučenin obsahujících síru. Na druhou stranu obsah mědi se snižuje při kvašení tvorbou nerozpustných sulfidů, které sedimentují a jsou z vína odstraněny spolu s mrtvými kvasinkami. [2]

Síran vápenatý se může přidávat do sodných půd pro zlepšení propustnosti vody,  $\text{CaCO}_3$  se zase používá ke zvýšení pH kyselých půd i k odkyselení samotného vína. Obojí zvyšuje obsah vápníku ve výsledném nápoji. [7; 1] Koncentrace chromu roste se stářím vína, pravděpodobně v důsledku kontaminace při skladování z nerezových nádob či lahví ze skla barveného oxidem chromitým. [12]

Vyšší koncentrace Cd a Pb byly v minulosti nalezeny ve vínech z vinic nacházejících se v blízkosti silnic či v průmyslových oblastech. Dříve kontaminace olovem pocházela především z benzínu obsahujícího tetraethylolovo jako antidetonační přísadu, dnes je usazování olova z atmosféry již minimálním zdrojem. Kontaminace olovem nastávala také při použití mosazných součástí ve výrobě (pumpy, ventily, potrubí), dnes jsou naštěstí nahrazovány nerezovou ocelí. Historicky bylo olovo také součástí uzávěrů lahví, které se v současnosti už rovněž nepoužívají. [2] Z hroznů je do šťávy uvolňován navíc jen minoritní podíl olova a také dochází k jeho srážení během fermentace. [7]

### 2.2.3 Účinky

#### 2.2.3.1 Důsledky přítomnosti kovů ve víně

Kovy mají také významný vliv na kvalitu výsledného produktu. Proto je důležité průběžně sledovat jejich koncentrace během celého procesu výroby. Podílejí se na vzniku vína a vývoji redoxních procesů během jeho zrání, mají vliv na výskyt kvasinek v moštu. Nadbytek kovových iontů má však za následek negativní změny organoleptických vlastností. [2]

V malém množství hrají kovy (Fe, Cu, Mg, Zn, ...) významnou roli ve fermentačních a metabolických procesech jako aktivátory či kofaktory enzymů. [1] Malé koncentrace  $\text{Mo}^{2+}$  a  $\text{Co}^{2+}$  stimulují růst kvasinek, ionty draslíku zvyšují jejich odolnost vůči jiným toxickým iontům a také stabilizují optimální pH pro fermentaci. Hořečnaté kationty napomáhají kvasinkám, aby se dokázaly přizpůsobit rychle narůstajícímu obsahu alkoholu během fermentace a také se spolupodílejí na aktivaci příjmu cukrů, který je dále stimulován sodnými kationty. Železnatý i železitý kationt nalezneme v aktivním místě řady

kvasinkových proteinů. [7] Měď, železo a mangan vytvářejí během zrání a skladování vína stabilní komplexy s aminokyselinami a polyfenoly, které mají vliv na průběh zrání a určují výslednou chuť, vůni a barvu vína. [2]

Vzhledem ke schopnosti kovových iontů účastnit se redoxních (oxidačně-redukčních) reakcí však může vlivem jejich přítomnosti docházet ke hnědnutí, vzniku zákalu či trpké chuti. [2] Zákal vzniká i v důsledku tvorby komplexů kovových iontů s některými organickými kyselinami, proteiny či fenolickými sloučeninami. [7] Ke tvorbě zákalu a nežádoucích změn barvy, vůně a chuti přispívají například Al, Cu, Fe, Mn, Ni či Zn. [2] Konkrétně železnaté a měďnaté ionty katalyzují například oxidaci kyseliny vinné na kyselinu glyoxalovou, jejíž další reakce (polymerace fenolů bez nutnosti jejich přímé oxidace, kondenzace s antokyaniny, příp. jejich degradačními produkty za vzniku oranžovožlutých pigmentů aj.) vedou ke hnědnutí. Ionty železa mohou také katalyzovat Maillardovy reakce a pozdější tvorbu barevných komplexů, nebo polymerizaci fenolů s acetaldehydem, jehož syntéza je zase katalyzována ionty manganu. [7] Vzniklé polymery se sráží, čímž se obsah fenolických sloučenin a taninů ve výsledném víně významně snižuje. [2] Měď a v menší míře i železo katalyzují také řadu oxidačních reakcí bez přítomnosti kyslíku, např. přeměnu kyseliny askorbové na dehydroaskorbovou, která se dále rozpadá na kyselinu šťavelovou a threonovou. [7] Při koncentraci měďnatých iontů větší než  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a železitých iontů větší než  $7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  dostává víno nepříjemnou svíravou kovovou pachutí, a zejména při vysokém obsahu taninů či vysokém pH se vyskytuje i zákal. Hliník tvoří zákal při koncentracích větších než  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  [2] Jelikož měď, spolu s dalšími zmíněnými kovy, urychluje oxidační procesy vedoucí ke kažení vína, doporučuje se udržovat její koncentraci v rozmezí  $0,3\text{--}0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . To je možné např. s použitím iontové výměnných pryskyřic, přináší to s sebou však nevýhody v podobě snížení obsahu polyfenolů a aromatických sloučenin. [1]

Dalším příspěvkem ke kažení vína je srážení hydrogenvinanu draselného a vinanu vápenatého, při vysokých koncentracích draslíku a vápníku. [13; 1] V lahvích může docházet rovněž k vysrážení šťavelanu vápenatého. V dřívějších stádiích výroby vína je kyselina šťavelová, pocházející především z moštu a v malé míře také ze železem indukované přeměny kyseliny vinné, stabilizovaná redoxním potenciálem mladého vína v komplexech se železem. Nárůst redoxního potenciálu během zrání však vede k nestabilním železitým formám, které disociují a kyselina šťavelová se tak může vázat do krystalů s vápníkem. Odstranění kyseliny šťavelové je možné čištěním brzy po začátku zrání, preferovaný způsob řešení však spočívá spíše v kontrole a udržení rozumného obsahu vápníku. [7]



### 2.2.3.2 Role kovů v rostlinách

Také v samotných rostlinách vinné révy hrají ionty kovů nepostradatelnou roli. V buňkách přispívají k regulaci metabolismu, zachování správného pH cytoplazmy a iontové rovnováhy. [7]

Draslík a vápník jsou přirozenou součástí hroznů a jejich koncentrace odráží stav vinné révy v posledních stádiích zrání hroznů. [1] Kromě osmotické a iontové rovnováhy je draslík nezbytný také pro elektrochemické procesy, neutralizaci organických kyselin, syntézu proteinů, aktivaci některých enzymů. Rostliny (vinná réva) ho získávají ve formě  $K^+$  z půdního roztoku. Nedostatek draslíku v půdě, například v důsledku nerovnoměrného rozložení úrodné půdy vlivem eroze, v písčitých půdách a půdách s vysokým obsahem Ca, Mg či fosforečnanů, má neblahý vliv na rostlinu. Dochází ke ztrátě zeleného zbarvení, hnědnutí okrajů listů, vinná réva s malým obsahem draslíku je také méně odolná vůči suchu a mrazu. Draslík zvyšuje kvalitu hroznů – zvýrazňuje jejich zbarvení a zajišťuje dostatečnou kyselost. Naopak jeho nadbytek však vede k přílišnému nárůstu pH hroznové šťávy a také k potlačení příjmu hořčičku kořenovým systémem. V takových případech je často nutná úprava pH moštu či vína přidávkem kyseliny vinné. [7]

Vápenaté ionty jsou aktivně vychytávány buňkami během jejich růstu, aby mohly být začleněny do proteinů buněčných stěn a zpevňovat je. To se uplatní jak při růstu vinné révy, tak při růstu kvasinek během fermentace. Vápník také reguluje propustnost buněčných membrán, transport iontů a hormonů, funkci enzymů. [7]

Hořčík je známý jako kofaktor chlorofylu nezbytný pro fotosyntézu, je ale také součástí několika klíčových enzymů katalyzujících glykolýzu, aktivuje fermentační enzymy, enzymy přenášející fosfát a také stabilizuje membrány i strukturu nukleových kyselin. Hořčík se poměrně snadno vymývá z půdy, proto může docházet k jeho nedostatku například v oblastech, kde hodně prší. [7]

Mangan slouží jako aktivátor a kofaktor enzymů (je např. složkou fotosystému II v chloroplastech), účastní se syntézy mastných kyselin, neutralizace toxických kyslíkových radikálů či redukce dusičnanů na amoniak.  $Mn^{2+}$  stimuluje syntézu proteinů a reguluje účinky zinečnatých iontů. Jako většina dvojmocných kationtů je deficientní v alkalických písčitých půdách, což má za následek zasychání výhonků, vznik žlutých skvrn v žilnatině listů, zejména na spodních listech a listech vystavených slunci, a další příznaky často zaměnitelné se známkami nedostatku zinku. Extrémní nedostatek manganu vede k menší úrodě. Naopak v málo provzdušněných kyselých půdách může mangan působit toxicky. [7]

Zinek je, stejně jako hořčík, esenciální pro glykolýzu a syntézu některých vitamínů. Je kofaktorem enzymu karboanhydrázy a účastní se syntézy kyseliny indolyloctové. Jeho příjem je omezen v alkalických půdách v důsledku malé rozpustnosti. Toxicita je méně častá, ale může vést k zastavení růstu kořenů. [7]

Železo je nezbytné pro syntézu chlorofylu a vývoj chloroplastů. Jako kofaktor se účastní také redoxních reakcí při přenosu elektronů, nalezneme jej v enzymech kataláze a peroxidáze. Rostlina jej přijímá v rozpustnější železnaté formě a následně reoxiduje na formu železitou, která je chelatována zejména s citrátem a transportována do výhonků. V listech je zásobní formou železa proteinový komplex fytoferritin. Nedostatek železa vede ke zmenšení úrody i velikosti samotných hroznových bobulí. Dochází také ke žloutnutí listů, zelená zůstává pouze žilnatina. [7]

Měď je důležitá jakožto kofaktor působící v oxidačních reakcích zahrnutých v dýchání, syntéze proteinů, cukrů či chlorofylu. Molybden redukuje dusičnany, rovněž se účastní syntézy chlorofylu a proteinů. Zřídka kdy je ho v půdách vinic nedostatek. [7]

#### 2.2.3.3 Působení na člověka

Kromě vlivu na kvalitu vína a vstupních surovin, mohou mít kovy také dopad na lidské zdraví. [2] Konzumace vína může přispět k dennímu příjmu některých esenciálních prvků, jako je železo, naproti tomu As, Al, Cd či Pb nemají žádnou výživovou hodnotu a jsou potenciálně toxické. Proto je důležité, aby ve víně nebyly překročeny přípustné koncentrace těchto prvků. Některé prvky jako Cu a Zn jsou pro lidské tělo esenciální v malých koncentracích, ve větším množství však mohou působit toxicky. [1; 2]

Biologická dostupnost a toxické účinky kovů ale také významně závisí na tom, v jaké chemické formě se vyskytují. Mohou se vyskytovat volné nebo tvořit komplexy s biologickými ligandy. Proto hraje v analýze potravin klíčovou roli také speciální analýza kovů. [1]

Konkrétně ve víně mohou být kovy vázány například v komplexech s fenolickými sloučeninami, avšak při nízkém pH v žaludku během trávení dochází k uvolňování volných iontů, které mohou být absorbovány a způsobovat toxické účinky. Například způsobují oxidační stres a interferují s jinými, esenciálními kovy, čímž mohou také inhibovat funkci některých enzymů. Nadměrný příjem mědi může způsobit trávicí obtíže, nevolnost, zvracení, bolesti břicha a svalů. Při dlouhodobé konzumaci může docházet k bioakumulaci a poškození jater či ledvin. Kovy jsou spojovány také s některými onemocněními, jako je cukrovka (As), kardiovaskulární onemocnění (As, Pb),

Alzheimerova či Parkinsonova choroba (Al). K nejzávažnějším účinkům kovů potom patří karcinogenita a teratogenita (As, Cd). [2]

Běžné koncentrace toxických kovů ve víně jsou natolik nízké, že by neměly způsobit akutní otravu. Přispívají však k celkovému příjmu kovů potravou a při dlouhodobější konzumaci může být organismus vystaven jejich nadměrnému množství. [2] Nejvyšší povolené limity pro koncentrace ve víně platí pro olovo, kdy nařízení EU 2023/915 zavádí hranici  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  pro vína vyprodukovaná ze sklizní v letech 2001–2015,  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  v letech 2016–2021 a  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ze sklizní od roku 2022. [14] Svá doporučení vydává také Mezinárodní organizace pro révu vinnou a víno (OIV). Například  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  pro zinek,  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  pro měď,  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  v případě kadmia nebo  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  u olova. Naproti tomu obsah manganu či chromu ve víně není upravován. [1; 2] Některé státy mají limity upraveny také ve své vlastní legislativě. [2]

### 2.3 Používané analytické metody

Metody oficiálně doporučené Mezinárodní organizací pro révu vinnou a víno pro stanovení kovů ve víně jsou založené zejména na atomové absorpční spektrometrii, jakožto selektivní a citlivé metodě. AAS (s plamenovou či elektrotermickou atomizací), ICP-MS a ICP-OES patří k nejčastěji používaným technikám stanovení kovových iontů. Pro stanovení měďnatých, olovnatých, kademnatých či zinečnatých iontů byly použity také elektrochemické metody, zejména potenciometrická rozpouštěcí analýza, umožňující přímě měření i speciační analýzu a také anodická rozpouštěcí voltametrie, která však vyžaduje rozklad vzorku před analýzou. [1; 2]

Vzorky vína je technikami atomové spektrometrie někdy možné měřit přímo po pouhém naředění či okyselení, nejčastěji se ale využívá rozkladu vzorku před analýzou. Ten je obecně možno provádět několika způsoby, například spalováním, oxidačním tavením, hydrolýzou, redukcí apod. Nejpoužívanější je však rozklad na mokré cestě s využitím mikrovlnného záření. [1; 2]

#### 2.3.1 Rozklady vzorku s mikrovlnným zářením

Rozklad vzorku je důležitým a často nezbytným krokem předcházejícím samotné analýze. Pevné vzorky vyžadují rozklad či rozpuštění, aby byly převedeny do kapalné formy vhodné pro analýzu. Rozkládat má smysl i kapalné vzorky, kvůli odstranění organické matrice zejména u biologických a jiných vzorků. Složky matrice by mohly způsobovat matricové interference a ovlivňovat intenzitu signálu během měření. [1; 15] Rozklad je nezbytný obzvláště v případě, kdy je obsah kovů blízký mezi detekce metody. [1; 2]

Pro vzorky vína je nejpoužívanějším způsobem rozkladu rozklad na mokré cestě v uzavřeném systému s použitím směsi kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Zejména pro analýzu pomocí ICP-MS je použití  $\text{HNO}_3$  výhodné, neboť tato kyselina tvoří nejméně polyatomických interferencí, na rozdíl třeba od  $\text{HClO}_4$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , jejichž použití může vést ke vzniku částic  $\text{ClO}^+$ ,  $\text{SO}^+$  nebo  $\text{SO}_2^+$ . Rozklad v uzavřeném systému je vhodnější především pro těkavé prvky, brání také kontaminaci zvenčí a snižuje spotřebu činidel. [15] K urychlení rozkladu se využívá mikrovlnného záření či UV fotolýzy. [1] Je také možné přidat katalyzátory jako  $\text{V}_2\text{O}_5$  či jiné sloučeniny vanadu, případně molybdenu. [2; 15]

Při rozkladu dochází k oxidaci organické matrice (přesněji k jejímu narušení kyselou hydrolyzou a následné oxidaci vzniklých meziproductů) a uvolnění analytu. [1; 15] K výhodám patří také dosažení vhodnější konzistence, získaný vzorek je méně viskózní a více homogenní. [15]

Mezi nejčastější činidla používaná pro rozklad na mokré cestě patří kyseliny jako  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HF}$ , příp. jejich směsi a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Jejich teplota varu limituje teplotu při rozkladu, proto je obecně dosahováno nižších teplot než při rozkladech na suché cestě (spalování). [15; 16] Protože teplota určuje rychlost reakce, využívá se mikrovlnného ohřevu. Mikrovlnné záření, generované magnetronem o frekvenci 2450 MHz, vyvolává pohyb iontů a rotaci dipólů, čímž narůstá teplota. Nedochází však ke změně struktury molekul. Ohřev vzorku a rozkladné směsi kyselin je mnohem rychlejší a účinnější než u přímého ohřevu, neboť nastává přímo v materiálu a stěny nádobek se nezahřívají. To je umožněno volbou vhodného materiálu, který mikrovlnné záření převážně propouští – teflon, tavený křemen, sklo. [15] Mikrovlnné mineralizátory lze rozdělit podle typu konstrukce na mineralizátory s fokusovaným či rozptýleným polem a tzv. Single Reaction Chamber. [16]

Mezi hlavní výhody rozkladů s mikrovlnným zářením patří kromě urychlení reakce také menší spotřeba reagensů. Tyto rozklady umožňují rozložit velké množství vzorku pro dosažení nízkých mezí detekce a také zvýšit kapacitu laboratoře díky úspoře času, energií i činidel. [15; 16] Výsledné mineralizáty mají nízký obsah uhlíku a rozpuštěných pevných látek a jsou vhodné pro použití různých detekčních technik i pro víceprvkovou analýzu. Rozklady využívající mikrovlnné záření splňují požadavky zelené chemie a snadno se používají. Podle typu mikrovlnného systému může být dosahováno vysokých hodnot teploty a tlaku (18 MPa, 300 °C), což umožní rozklad i vzorků velmi těžko rozložitelných za běžných podmínek. [16]

Rozklad vzorku však nelze použít pro speciální analýzu, neboť během něj dochází k uvolnění analytu z různých vazeb a forem a často také k jeho oxidaci. [15] I pouhé okyselení vzorků  $\text{HNO}_3$  může vést k uvolnění kovových iontů z vazeb s ligandy. [2]

### 2.3.2 Atomová absorpční spektrometrie

AAS je s oblibou používaná metoda stanovení kovů nejen ve víně. Patří k metodám s relativně nízkými pořizovacími a provozními náklady, dobrými mezemi detekce a snadnou obsluhou. Umožňuje stanovení více než 60 prvků, vzhledem k jejich koncentracím ve víně se však pro tento typ vzorků používá zejména pro stanovení alkalických kovů, kovů alkalických zemin, mědi, železa, manganu a zinku. Při použití elektrotermické atomizace je možné stanovovat také olovo, kadmium, chrom či arsen. [2] Obvykle stanovované koncentrace se pohybují od jednotek  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  až po desetiny  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . [15]

#### 2.3.2.1 Základní princip

Absorpcí fotonu z UV či VIS oblasti spektra dojde k excitaci valenčního elektronu, který zůstává na vyšší energetické hladině po dobu asi  $10^{-8}$  s. Měří se úbytek toku záření vlivem takovéto absorpce. V AAS jsou nejvyužívanější tzv. rezonanční přechody, tedy přechody ze základního stavu. Pro citlivé měření je tedy podstatné, aby byl energeticky nižší základní stav obsazený více než stav excitovaný. Poměr četnosti obsazení těchto hladin v závislosti na teplotě udává Boltzmannovo rozdělení:

$$\frac{N_i}{N_0} = \frac{g_i}{g_0} \cdot \exp\left[\frac{E_0 - E_i}{kT}\right] \quad (2)$$

kde  $N_i$  je počet atomů v excitovaném stavu,  $N_0$  počet atomů v základním stavu,  $g_i$  statistická váha a  $E_i$  energie excitovaného stavu,  $g_0$  statistická váha a  $E_0$  energie základního stavu,  $k$  Boltzmannova konstanta ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$ ) a  $T$  absolutní teplota.

Při teplotách v běžných atomizátorech je většina vzniklých atomů v základním stavu a počet excitovaných atomů je oproti nim zanedbatelný. K obsazování vyšších hladin dochází až při mnohem vyšších teplotách (nad 3000 K), např. v plazmatech. [15]

Spektrum každého prvku má charakteristický počet specifických čar. Přirozená šířka spektrální čáry je asi  $10^{-5}$  nm. Dochází však k Dopplerovu rozšíření vlivem neuspořádaného pohybu atomů a srážkovému – Lorentzovu rozšíření. [15] Kvantitativní stanovení vychází ze srovnání naměřené absorbance s absorbancí kalibračních standardů o známé koncentraci a z Lambertova-Beerova zákona:

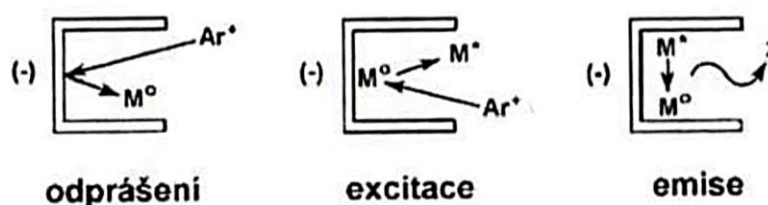
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3)$$

kde  $A$  je absorbance,  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient,  $c$  koncentrace a  $d$  šířka kyvety.

### 2.3.2.2 Instrumentace

Atomový absorpční spektrometr se skládá ze zdroje záření, atomizátoru, monochromátoru a detektoru. [17]

Jako zdroj záření se používá výbojka s dutou katodou. Jedná se o čárový zdroj emitující spektrum stanovovaného prvku. Pro každý prvek je tedy potřeba samostatná výbojka. Existují i výbojky víceprvkové, jejichž katoda je tvořena slitinou více prvků, avšak intenzita jednotlivých čar je u tohoto typu výbojek nižší a také roste riziko spektrálních interferencí. Princip fungování výbojky s dutou katodou je naznačen na obrázku 1. Výbojka naplněná inertním plynem při nízkém tlaku obsahuje dutou katodu ze stanovovaného prvku, případně jeho slitiny. Vložené vysoké napětí způsobí doutnavý výboj a dochází k vyražení atomů z povrchu katody ionty vzácného plynu. Ty spolu s elektrony dalšími srážkami excitují vyražené atomy na vyšší energetickou hladinu a při návratu do základního stavu dochází k emisi charakteristického záření. [15]



**Obr. 1** – Schéma procesů probíhajících ve výbojce s dutou katodou [15]

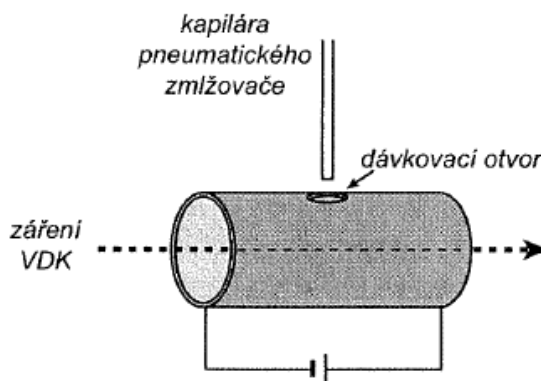
V případě použití tzv. superlampy je vnitřní prostor katody bombardován elektrony z přidavného emitoru a je dosahováno asi o řád vyšší intenzity záření, díky potlačení samoabsorpce atomy ve zdroji. Dalším možným zdrojem záření pro AAS je bezelektroodová výbojka, která generuje ještě intenzivnější záření a úzké profily čar, proto se využívá pro prvky, jejichž hlavní rezonanční čáry leží v oblasti pod 220 nm (As, Se, Pb), kde již dochází ke ztrátám záření absorpcí vzduchem. Při použití vysokorozlišovacího monochromátoru a plošného polovodičového detektoru je možné využít také kontinuální zdroje záření. [15; 17]

Atomizátor slouží k převedení analytů na volné atomy v základním stavu a zároveň jako měrná cela. Rozlišujeme plamenovou atomizaci v ustáleném stavu, kdy je počet vzniklých atomů pouze funkcí koncentrace analytu ve vzorku a elektrotermickou atomizaci nadávkovaného množství vzorku, kdy množství vzniklých atomů závisí na čase a hmotnosti analytu v daném alikvotu vzorku. [17]

Při plamenové technice dochází ke kontinuálnímu nasávání a zmlžování roztoku vzorku, jehož vzniklý aerosol (se směsí plynů paliva a oxidovadla) je zaváděn do

štěrbinového hořáku. [15; 17] V plameni nastává odpaření, rozklad a atomizace složitými termodisociačními a termochemickými procesy. Složení plamene je nejčastěji acetylen-vzduch, případně pro termostabilní sloučeniny acetylen-oxid dusný. Optická osa přístroje prochází zónou plamene, v níž je nejvyšší hustota volných atomů analytu. To se může lišit v závislosti na mechanismu atomizace. [15]

Elektrotermická atomizace slouží pro atomizaci jednorázové dávky vzorku a umožňuje dosažení nižších mezí detekce než FAAS. Grafitová kyveta, umístěná v optické ose spektrometru a chráněná před spálením atmosférou argonu, je elektricky vyhřívána podle teplotního programu. Ten se skládá z několika fází – sušení, pyrolýzy, atomizace a čištění atomizátoru. Během kroku atomizace je odečítán absorpční signál a proud inertního plynu je snížen na minimum. Vyhodnocení probíhá integrací plochy získaného píku. Elektrotermická atomizace umožňuje analýzu kapalných (dávkuje se jednotky až desítky  $\mu\text{l}$ ), ale i pevných vzorků a suspenzí. [15; 17]



**Obr. 2** – Grafitová kyveta v ETA [17]

Neabsorbovaný podíl záření prochází skrz monochromátor do detektoru. Tím je nejčastěji fotonásobič. [15; 17] Důležitá je modulace záření, která dovoluje rozlišit záření ze zdroje od záření vytvářeného atomizátorem. Realizuje se nejčastěji mechanickým přerušovačem rotujícím s frekvencí 50 Hz. [17]

### 2.3.2.3 Interference

Při atomizaci v plameni může docházet k několika typům interferencí. Transportní interference ovlivňují množství vzorku, které ve formě aerosolu dosáhne plamene, např. v závislosti na viskozitě a povrchovém napětí roztoku. Lze je eliminovat zachováním stejného složení vzorků a kalibračních standardů. Může také docházet ke vzniku méně či více těkavých sloučenin analytu, čímž se snižuje či zvyšuje signál. Proto je někdy vhodné přidat tzv. vytěšňovací nebo uvolňovací činidlo (např. lanthanité soli při stanovení kovů alkalických zemin eliminují nežádoucí vliv fosforečnanu na Ca). Pro zamezení nežádoucí

ionizace vlivem příliš vysoké teploty plamene lze přidat ionizační pufr (Cs, K), který se ionizuje přednostně namísto analytů. [15]

Během elektrotermické atomizace se mohou také projevat spektrální či nespektrální interference. Nespektrální rušivé vlivy mohou nastávat v plynné nebo kondenzované fázi. Řadu z nich lze řešit použitím modifikátorů. Ty většinou váží analyt do termostabilní sloučeniny a umožňují tak zvýšení teploty a tím i účinnosti pyrolýzy a odstranění těkavějších rušivých složek matrice. [15; 17] Mohou ale také reagovat s interferentem za účelem zvýšení jeho těkavosti a usnadnění jeho odstranění během pyrolýzy nebo ovlivnit fyzikální vlastnosti vzorku tak, aby byl zajištěn reprodukovatelný průběh sušení či dávkování. [15] Příkladem modifikátoru používaného při analýze vzorků vína je  $Mg(NO_3)_2$  pro stanovení Cr nebo sloučeniny Pd a Ni pro stanovení As.  $NH_4H_2PO_4$ , používaný např. pro Cd a Pb, naopak pro tento typ vzorku není vhodný, protože zvyšuje nespecifickou absorpci pozadí. [2]

Absorpce pozadí patří ke spektrálním interferencím ovlivňujícím signál v AAS. Častěji se projevuje v elektrotermických atomizátorech, zejména při analýze vzorků s komplexní matricí. [2; 15] Je důsledkem nedokonalé atomizace a absorpce či rozptylu záření molekulami a jemnými částicemi aerosolu, což falešně zvyšuje měřený signál. Nespecifická absorpce je kompenzována pomocným spojitým zdrojem záření (wolframová žárovka, pro UV oblast deuteriová výbojka), který střídavě s čárovým zdrojem ozařuje měrnou celu a jehož záření je zeslabováno pouze absorpcí pozadí. Absorpce analytu totiž probíhá pouze v úzkém, zanedbatelném intervalu vlnových délek. Tok záření z pomocného zdroje tedy odpovídá hodnotě nespecifického zeslabení a je tak možné určit specifický signál absorpce analytu jako rozdíl celkového signálu a signálu nespecifické absorpce. Jinými způsoby korekce je využití tzv. Zeemanova jevu (štěpení absorpčních linií analytu v magnetickém poli) nebo rozšíření a samozvrat analytické čáry primárního zdroje dle Smith-Hieftje. [15; 17]

Pro některé prvky je možné měření v emisním módu, kdy se detekuje záření emitované při deexcitaci atomů excitovaných tepelnou energií (kolizí s jinými částicemi v plameni). [15]

### 2.3.3 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-MS je technika víceprvkové analýzy široce využívaná v analytické chemii, včetně analýz prvkového složení vína. [2] Umožňuje také stanovení izotopů a jejich poměrů. [2; 15] Předčí jiné metody svým širokým lineárním měřicím rozsahem (až



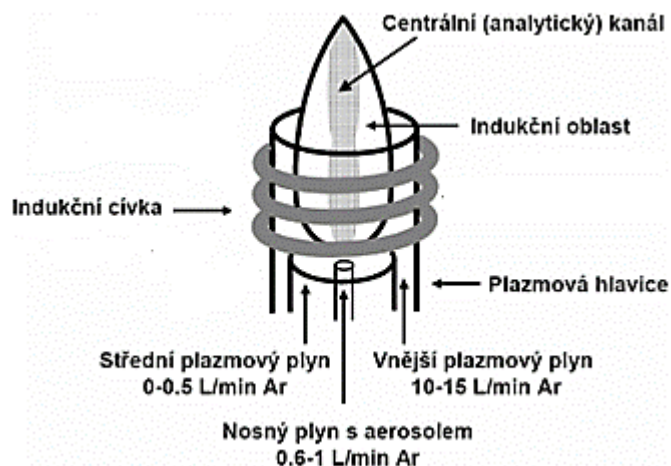
9 řádů) a díky nízkému pozadí dosahuje až o 3 řády nižších teoretických mezí detekce než ICP-OES. K jejím nevýhodám patří vysoké náklady na pořízení a provoz. [15]

### 2.3.3.1 Princip

Převážně jednonásobně nabitě ionty vytvořené v iontovém zdroji (indukčně vázaném plazmatu) jsou separovány hmotnostním spektrometrem dle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) a je zaznamenávána jejich četnost. [15]

Indukčně vázané plazma je schopno ionizovat polovinu prvků periodické soustavy z více než 90 %. Díky ionizační energii argonu (15,76 eV) se jedná o téměř univerzální ionizační zdroj. Vyšší ionizační energii mají jen F, He a Ne, které proto nelze touto metodou stanovovat. Stupeň ionizace závisí na teplotě, na kterou má vliv výkon, průtok nosného plynu a množství vzorku. [15]

Indukčně vázaný plazmový výboj se skládá z indukční zóny a analytického kanálu. Indukční zóna je vnější kruhově soustředný prstenec proudícího argonu, kde teploty dosahují nejvyšších hodnot (až  $10^4$  K) a odkud je energie přenášena do středního analytického kanálu. Tím proudí vysokou rychlostí chladnější nosný plyn (rovněž argon), který vnáší vzorek. Dochází k odpaření vzorku, disociaci jednotlivých sloučenin, atomizaci a ionizaci. Z ústí plazmové hlavice tak vystupuje směs atomů a iontů s fragmenty molekul, neodpařených částic vzorku, Ar a elektrony, která pokračuje přes interface do hmotnostního spektrometru. [15]



**Obr. 3** – Indukčně vázaný plazmový výboj [15], *upraveno*

### 2.3.3.2 Instrumentace

Vzorek je do výboje transportován v podobě vlhkého nebo suchého aerosolu. Kapalně vzorky jsou tedy předem zmlžovány některým z mnoha typů zmlžovačů, pevné vzorky jsou předem převedeny do roztoku mineralizací nebo analyzovány přímo

s použitím laserové ablace. Plynné vzorky lze absorbovat v kapalinách nebo zachytit adsorpcí na pevných sorbentech a po mineralizaci opět zavádět ve formě kapalného vzorku. [15]

Po zmlžení ve zmlžovači a oddělení příliš velkých kapek mlžnou komorou vstupuje jemný aerosol vzorku do plazmové hlavice. Ta se skládá ze tří koncentrických trubic a je orientována téměř vždy horizontálně. [15]

Interface (rozhraní mezi ICP a MS) je nejnamáhanější součástí spektrometru. Bývá vyroben z vysoce vodivých a odolných materiálů a je chlazený vodou. Skládá se ze dvou kónusů – sampler je v přímém kontaktu s plazmovým výbojem a slouží ke vstupu iontů z plazmatu do prostoru rozhraní. Otvor prvního kónusu má velikost 0,5–1,2 mm, druhého (tzv. skimmer) 0,4–0,9 mm. Kónusy umožňují dvoustupňovou změnu tlaku a mezi nimi se nachází tzv. expanzní komora, kde je rotační vakuovou vývěvou udržován tlak stovek Pa a kde dochází k adiabatické expanzi. Tok plynu je urychlován až na rychlost překračující rychlost zvuku za současného prudkého poklesu teploty (z 5000–7500 K na 200–300 K na dráze asi 10 mm během zhruba 5  $\mu$ s). Tím je eliminována většina reakcí atomů a iontů. Za vstupním kónusem se vytváří tzv. Machovo diskontinuum, kde rychlost opět klesá pod rychlost zvuku a může dojít k nežádoucímu ředění. Tomu lze zabránit vhodným umístěním druhého kónusu ve vzdálenosti asi 6–7 mm. Za tímto kónusem se již proud iontů, atomů a fotonů nachází v oblasti s tlakem okolo  $10^{-6}$  Pa a opět je dosahováno nadzvukové rychlosti. Vakuum limituje množství srážek atomů a iontů. Analyzované ionty jsou následně vychýleny elektromagnetickým polem (iontovou optikou) a vedeny dále do hmotnostního analyzátoru. Tím jsou odděleny od neutrálních částic, které by zvyšovaly pozadí. [15]

Analyzátor (např. kvadrupól) propouští ionty o vybraném  $m/z$  na detektor po dobu 10–100 ms, proměření spektra se 100–1000x opakuje. Je zamezeno zahlcení detektoru příliš zastoupenými ionty a zkracuje se doba analýzy. Pro lepší rozlišení je možné také použití analyzátoru doby letu (TOF) nebo sektorového analyzátoru. [15]

Jako detektor se používá elektronový násobič s diskrétními dynodami, který zesiluje elektrický signál úměrný počtu iontů dopadlých na jednotku plochy detektoru. Je schopen detekovat nepatrné proudy iontů nebo dokonce jednotlivé ionty. [18] Pro detekci při přesných měřeních izotopických poměrů ve spektrometrech s dvojí fokusací slouží multikolektor. [15]

ICP-MS může, např. pro účely speciální analýzy, být spojováno se separačními metodami (LC, GC, CZE) a sloužit jako prvkově specifický detektor. [15]

### 2.3.3.3 Interference

Výhodou ICP-MS je nízké pozadí, které je tvořeno pouze instrumentálním příspěvkem (šumem detektoru) a případnými spektrálními interferencemi, které však většinou lze eliminovat. Nevýhodou spektrálních interferencí u této metody je, že je často nemůžeme řešit prostou volbou jiného izotopu téhož prvku, neboť řada analyzovaných prvků patří mezi prvky monoizotopické (Mn, As, P, Sc, ...). [15]

Spektrální interference mohou být způsobeny vícenásobně nabitými ionty, ionty isobarů, molekulovými ionty či intenzivními sousedními signály. Atomové – isobarické interference jsou způsobeny překryvem signálu analytu a signálu izotopu jiného prvku se stejnou nominální hmotností (např. interference  $^{48}\text{Ti}^+$  vápníkem  $^{48}\text{Ca}^+$ ). Tyto interference lze předpokládat a eliminovat volbou jiného izotopu či matematickou korekcí vycházející ze známého zastoupení izotopů rušícího prvku (např. ve výše uvedeném případě lze matematicky korigovat pomocí izotopu  $^{44}\text{Ca}^+$ ). [15]

Dvojnásobně nabitě ionty ruší signál kovů s poloviční hmotností, a tedy stejným  $m/z$  – např.  $^{88}\text{Sr}^{2+}$  ruší  $^{44}\text{Ca}^+$ . Díky hodnotě ionizační energie argonu (15,76 eV) tvoří dvojnásobně nabitě ionty v plazmovém výboji víceméně jen Sr, Ba, Pb, Ca, V, Zr, Y a lanthanoidy, jejichž ionizační energie do druhého stupně je menší než 16 eV. Vliv na vznik těchto iontů má také složení matrice a podmínky ionizace. [15]

Polyatomické interference (molekulové ionty) vznikají reakcemi s atomy rozpouštědla či argonu, které se oproti analytům vyskytují ve velkém nadbytku, nebo také s prvky majoritně zastoupenými ve složité matrici vzorku. [2; 15] Často se jedná o ionty stabilních oxidů. Rozdíl v přesné hmotnosti interferentu a analytu je v tomto případě dostatečně velký, aby je přístroje s rozlišovací schopností 2000-10000 dokázaly odlišit. Výjimkou jsou pouze speciální případy jako interference  $\text{ArTi}^+$  na  $^{86}\text{Kr}^+$ . I poměrně častá interference  $^{40}\text{Ar}^+$  na  $^{40}\text{Ca}^+$  však vyžaduje rozlišovací schopnost okolo 200000. [15] Tento typ interferencí může vznikat také v návaznosti na obsah zbytkového uhlíku při nedokonalém rozkladu vzorku. Příkladem je interference molekulového iontu  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$  na  $^{52}\text{Cr}^+$  nebo  $^{12}\text{C}^{12}\text{C}^+$  a  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$  na  $^{24}\text{Mg}$  a  $^{26}\text{Mg}$ . [15; 16] Kyseliny, např. kyselina chlorovodíková či chloristá mohou způsobovat interference při stanovení vanadu a arsenu. Naproti tomu kyselina dusičná je z hlediska rušivých vlivů neškodná, protože může vést ke vzniku částice  $\text{ArN}^+$  interferující jen s  $\text{Fe}^+$  a  $\text{Cr}^+$  při  $m/z = 54$ , což neovlivní nejzastoupenější izotopy těchto prvků běžně využívané při stanovení. [16]

K interferencím může docházet také díky chvostování signálů. To se snižuje s rostoucí délkou kvadrupólu, frekvencí radiofrekvenčního pole a s pomalejším průletem iontu kvadrupólem. [15]

Možnosti řešení spektrálních interferencí a nevýhody jednotlivých přístupů shrnuje tabulka I.

**Tab. I** Nevýhody jednotlivých přístupů pro eliminaci spektrálních interferencí v ICP-MS (převzato z [15], upraveno)

Obecný typ řešení	Konkrétní strategie	Nevýhody
teoretické přístupy	matematická korekce na základě zastoupení izotopů	měření několika izotopů, statistická nejistota jejich zastoupení, instrumentální diskriminace iontů podle hmotnosti
	výpočty maximální entropie	složitý postup, nelze použít pro rušící signál intenzivnější než signál analytu
modifikace způsobu zavádění vzorku	zmlžovač s kryogenní desolvací	pouze částečné odstranění interferencí vyvolaných rozpouštědlem, nereprodukovatelnost při změně matrice
	zmlžovač s membránovou desolvací	nereprodukovatelné, vhodné jen pro některé prvky, nestabilní desolvatace vlivem ucpávání membrán
snížení interferencí vyvolaných ionty vzniklými reakcemi s Ar/sekundárním výbojem	použití podmínek chladného plazmatu/stínění či uzemnění plazmové hlavice	pokles energie – ne vhodné pro všechny prvky, efekty závislé na složení matrice, zvýšení interferencí MO <sup>+</sup> přímou ionizací neutrálních oxidů, menší ionizace analytů
využití kolizní/reakční cely	-	nereprodukovatelnost při změně matrice
matricová kalibrace, metoda přídavku standardu	-	časová a materiálová náročnost, větší spotřeba vzorku, komplikace s přípravou matrice
odstranění matrice způsobující interference	off-line/on-line chromatografie	časově i finančně náročné, možný zdroj další kontaminace, často potřeba vývoje nové separační metody
analyzátor s vysokou rozlišovací schopností	-	nákladná instrumentace, ztráta citlivosti

Nespektrální interference neboli matricové efekty spočívají v rozdílné citlivosti měření pro analyt v čistém rozpouštědle a v roztoku obsahujícím matici vzorku. Interference transportu vzorku do plazmatu souvisí, podobně jako v AAS, s rozdíly ve viskozitě a povrchovém napětí. Důsledkem je odlišné rozdělení velikosti částic aerosolu a tím i odlišná hmotnost vzorku vneseného do plazmatu. Pokles signálu lze korigovat použitím vnitřního standardu, matricovou kalibrací nebo metodou přídatku standardu. Může nastávat také krystalizace solí v ústí některých typů zmlžovačů a následný drift signálu. Řešením je ředění vzorků, použití jiného typu zmlžovače nebo zvlhčování nosného plynu. [15]

Ionizace analytu může být potlačena v důsledku přednostní ionizace alkalických kovů z matrice, zejména za podmínek tzv. chladného plazmatu. To vede rovněž ke snížení citlivosti oproti čistému roztoku bez matrice. Při analýze zasolených vzorků může být tok iontů snížen také kvůli ucpávání kónusů. Tolerance ICP-MS je pouhých 0,1–0,3 % (m/m) solí, proto je nutná úprava vzorků před měřením. Kromě driftu signálu a zkracování životnosti kónusů korozí kontaminují příliš zasolené vzorky také detektor. [15]

Pro minimalizaci interferencí je také důležité použití optimalizovaných podmínek, například správné nastavení hloubky vzorkování. Ta určuje, jak hluboko do centrálního kanálu výboje je zanořen vstupní kónus. Ideálně by to mělo být v místě tzv. normální analytické zóny, kde je dosaženo maximálního stupně ionizace a minimálních nespektrálních i polyatomických spektrálních interferencí (dochází k maximální disociaci molekulárních specií). [15]

## **2.4 Doposud provedené studie**

Analýze kovů ve víně se již věnovala velká řada publikací, proto tato kapitola shrnuje pouze některé příklady dosud provedených studií. Ty se zabývaly stanovením kovů například v souvislosti s odhalením jejich původu ve víně, změnami během různých fází výrobního procesu, stářím vína, rozlišením jejich geografického původu a odhalením falšování, speciální či frakcionační analýzou. Naproti tomu stanovení kovů v burčáku nebyla na základě dostupných informací doposud věnována větší pozornost.

Obsah kovů ve 44 vzorcích bílého a červeného vína z polských vinic byl měřen J. Płotka-Wasyłkou a kol. Některé kovy nebyly v několika vzorcích vůbec detekovány, zatímco vysoké koncentrace byly nalezeny u draslíku, hořčíku, vápníku, železa a dalších prvků. Například koncentrace draslíku dosahovaly 97–3250 mg·l<sup>-1</sup>, manganu 0,329–9,219 mg·l<sup>-1</sup>. Zanedbatelné byly koncentrace rtuti, stříbra, kadmia, titanu či kobaltu.

Červené víno obsahovalo více Ba, Fe, K a Mn než bílé, kde zase převažovalo Ag, Al, As, Bi, Cu, Sb, Se, Sn, Zr a Zn. [19]

Vína z východního Chorvatska byla podrobena analýze pomocí ICP-MS s vysokým rozlišením. Pomocí statistické analýzy naměřených dat autoři rozlišili prvky přírodního (As a Pb) a antropogenního původu (Cd, Ni, Zn, Fe, Cr) a také navrhli Al, Li, Be a Ti pro rozlišení regionů, odkud víno pochází. [20]

Atomovou absorpční spektrometrii využili S. Santos a kol. [21] pro stanovení kovů ve vzorcích portugalských červených vín a také tým brazilských vědců [22] pro vzorky vín i hroznových šťáv. Olovo a kadmium v portugalských vínech překročily limity OIV. [21] Měď byla nalezena pouze v jednom vzorku hroznové šťávy, koncentrace železa a manganu byly napříč vzorky různorodé. [22] V Africe byla pomocí FAAS analyzována také nealkoholická vína (červená, bílá i růžová). Olovo nebylo detekováno v žádném ze čtrnácti vzorků (mez detekce  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), nejvíce mědi bylo nalezeno v jednom z růžových nealkoholických vín ( $1,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). [23]

S. Catarino s kolegy srovnával kvantitativní a semikvantitativní přístup ke kalibraci ICP-MS a studoval také polyatomické interference chloru a vápníku pro nastavení vhodných matematických korekcí. Metodu validovali proměřením některých prvků, jako Fe a Zn, také pomocí AAS. [24] Pomocí ICP-MS se ve víně studuje také poměr izotopů stroncia nebo olova. [25; 16] Otázkou přípravy vzorku se zabírali A. González a kol., kteří po srovnání třech různých způsobů (rozklad s využitím mikrovlnného záření, tepelný rozklad v otevřeném systému a desetinasobné naředění s použitím matricové kalibrace) dospěli k závěru, že nejvhodnější je rozklad s mikrovlnným zářením v uzavřeném systému. [27]

Stanovení kovů ve vzorcích vína se využívá i k určení jejich geografického původu či odhalení falšování. Využívá se toho, že obsah kovů má přímý vztah ke složení půdy, na které vinná réva roste. [1; 7] Rozlišení vín podle regionu by bylo možné například u polských vín analyzovaných J. Płotka-Wasyłkou, kde chemometrická analýza dat ukázala, že hlavním zdrojem kovů je právě půda. [19] Je však důležité brát v úvahu také fakt, že výskyt kovů může být ovlivněn dalšími faktory, jako je výroba, transport či skladování, což analýzu často dále komplikuje. [1]

Analýzou českých vín se zabývali vědci z Karlovy Univerzity v Praze, kteří studovali obsah kovů ve 31 vzorcích vína ze šesti vinařských obcí v Čechách (Praha, Karlštejn, Mělník, Roudnice, Žernoseky a Most) a také v odpovídajících vzorcích půdy z příslušných vinic. Statistické zpracování naměřených výsledků (analýza shluků, analýza hlavních komponent aj.) ukázalo výraznou souvislost mezi obsahem kovu v půdě a víně

na ní pěstovaném pouze u hořčičku, avšak autoři předpokládají, že prvky tvořící horninotvorné nerosty se do vína dostávají převážně rovněž z vinic. Vliv však hraje také selektivní vychytávání iontů z půdy a různorodá distribuce v částech rostliny. Transport z kořenů do plodů se vyskytuje v menší míře než do listů. Korelace mezi některými prvky vedly ke vzniku dvojic a skupin, která pravděpodobně pocházejí ze stejného zdroje nebo mají podobnou schopnost dostávat se do hroznů. Např. Cu a As pocházejí pravděpodobně z anorganických pesticidů, Be a Al mají podobné chemické vlastnosti. Byl také pozorován antagonismus mezi K a Pb a pozitivní korelace mezi pH a obsahem K a Mg. Navíc bylo zjištěno, že obsah kovů ve vínech vykazuje větší rozptyl než obsah kovů v půdě, kde vinná réva rostla, ačkoli se jednalo o různé typy půd. [11]

S. M. Rodrigues a kol. našli vztah mezi koncentrací kovů a typem vína (bílé vs. červené) a také jeho označením původu. [28] Při analýze 44 prvků v 90 vzorcích vína ze 6 oblastí Řecka (ze dvou po sobě následujících sklizní) výsledky rovněž naznačovaly možnost rozlišení vín podle regionu a odrůdy, bylo by však potřeba zanalyzovat ještě více vzorků. [29] Extrémně homogenní koncentrace Sr a Rb ve 39 vzorcích šampaňského pozoroval R. Cellier se svými spolupracovníky. Navrhl proto tyto dva prvky pro odhalení případného falšování. [30]

Y. Vystavna se se svým týmem věnovala analýze Zn, Cu a Pb v ukrajinských vínech odrůdy Chardonnay a také jejich přenosu do vinných produktů během pěstování a výroby vína. Přesun těchto prvků mezi půdou, hrozny, matolinami, hroznovou šťávou, moštem a finálním vínem závisí na jejich původu, distribuci v částech rostliny vinné révy, biologické dostupnosti, speciaci a výskytu v komplexech. Zatímco přenos Cu a Zn do vína je snadný, příjem olova je komplikovaný, a proto se Pb akumuluje spíše v matolinách. Na rozdíl od dalších dvou analyzovaných kovů byly však u olova pozorovány další zdroje kontaminace během výroby. Hlavním zdrojem zinku je půda, kvůli jeho tendenci hromadit se v semenech ale také může být odstraněn během výroby spolu s matolinami. [31]

Rozdíly mezi koncentrací kovů ve víně a v původním moštu se zabývala skupina S. Catarina z Portugalska. Ačkoli rozdíly závisely na druhu vína, prvku a jeho koncentraci, obecným trendem bylo snížení obsahu kovů ve víně oproti moštu. To si autoři vysvětlují zejména jejich srážením ve formě sulfidů během fermentace. Úbytek Cu dosáhl až 99% původní hodnoty. Koncentrace některých kovů se však zpracováním moštu na víno nezměnily (např. Li v bílých vínech). [32] Změny koncentrace Fe, Cu a Mn během kvašení pozoroval také tým pod vedením A. Bimpalase. Obsah Ni, Pb, Cr, Cd, Ba, Zn a Al zůstává na základě jeho měření konstantní. [33] Nejvyšší koncentrace Cu, Mn, Zn, Cd, Cr a Pb

nalezli Kristl a kol. v matolinách, usazeném kalu a usazeninách bílého moštu. S výjimkou mědi byl v tomto případě obsah kovů vyšší ve víně než v moštu. [34]

E. C. Rossano, Z. Szilágyi, A. Malorni a G. Pocsfalv studovali vliv výrobních postupů na koncentraci prvků vzácných zemin v bílých vínech. Na základě analýzy pomocí ICP-MS dospěli k závěru, že, čiření, filtrace i skladování mohou mít na obsah těchto kovů významný vliv. Skladování ve skleněných nádobách mělo větší efekt než použití dřeva a nerez, došlo k nárůstu koncentrací při použití bentonitů. [35] Z. Temerdashev s kolegy rovněž ukázali, že použití různých druhů bentonitů má vliv na výsledné prvkové složení vína. [36] Ve vínech z jižního Španělska byly pozorovány rozdíly v obsahu Mg, K, Sr, Zn a Mn mezi mladým a starším vínem. [37]

H. Hopfer se svými spolupracovníky ukázala vliv skladování, balení a geografického původu na složení vína z hlediska stopových prvků. Teplota, při které je víno skladováno, může po 6 měsících ovlivnit prvkové složení červeného vína. [38] Že na obsah kovových iontů má vliv i to, jak moc je víno během výroby vystaveno kyslíku, dokázali v Australském vinařském výzkumném institutu. Například lisování za přístupu kyslíku vedlo k nižšímu obsahu Cr a Cu, zatímco obsah železa byl v tomto případě vyšší než za použití inertních podmínek. Také vychytávání Cu a Zn vinnými kaly bylo efektivnější při přístupu kyslíku. [39]

Srovnáváním různých fází výroby vína se zabírali také další skupiny autorů. Někteří simulovali proces výroby vína v laboratorních podmínkách. Takové mikrovýroby ve skleněných nádobách využili např. němečtí vědci pro porovnání přísadků bentonitu před a po fermentaci. Na základě semikvantitativního stanovení 63 prvků navrhli několik prvků vhodných pro studium původu německých bílých vín (Li, B, Mg, Ca, Rb, Cs, Pb), jejichž koncentrace se během výrobního procesu významně neměnila. [40] Amatérský způsob výroby zvolili také A. Bica a R. Sánchez s J. L. Todolím. Nejzastoupenější z 38 analyzovaných prvků byly K, Na, Mg, Ca, P, Cu, Ni a Ti, přítomné zejména v pevných částech a matolinách, s výjimkou mědi a některých dalších kovů. V hroznech byla nejvyšší koncentrace kovů ve slupkách. Bylo také potvrzeno vychytávání některých kovů (Cu, Hg, ...) kvasinkami a uvolňování Ni, Al, Zn, Cd, Pb či Cr z výrobních zařízení. Rozlišení geografického původu umožnily makroprvky Mg, P, K, stopové prvky Pb, Ni, Ba, Rb a prvky vzácných zemin Er, Pr, Gd, Sm, Eu, Hf a Nd. [41]

Tradiční a moderní způsob výroby srovnávali C. M. R. Almeida a M. T. S. D. Vasconcelos. Kontaminace olovem byla u novějšího způsobu produkce menší než při použití tradičních postupů. Koncentrace olova v listech vinné révy a hroznech byly srovnatelné pro obě vinice, ze kterých vzorky pocházely. [42] Kvašení



v tancích při výrobě perlivého vína mělo za následek vyšší obsah chromu, niklu a stroncia než tradiční kvašení v lahvích. Naopak koncentrace boru byly nižší. Růžová vína obsahovala průměrně méně mědi a více draslíku než jiná. [43]

#### 2.4.1 Speciační a frakcionační analýza

Speciační analýza je analytická činnost za účelem identifikace a/nebo kvantifikace jedné nebo více chemických specií ve vzorku. Specie je specifická forma prvku definovaná jeho izotopovým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem a/nebo strukturou komplexu či molekuly (definice IUPAC). Specií prvku potom rozumíme jeho distribuci mezi jednotlivé specie v systému. Frakcionace je proces klasifikace analytu nebo skupiny analytů z daného vzorku podle fyzikálních (velikost, rozpustnost) nebo chemických (reaktivita) vlastností. [16]

Ve víně se kovy vyskytují jako volné ionty, ale také jsou vázány v řadě komplexů s organickými ligandy. Může se jednat například o komplexy s polyfenoly, ale také cheláty železa s kyselinou citrónovou či šťavelovou. [1] Pro speciační analýzu je nezbytné začlenění separačního kroku. Tím bývá nejčastěji iontově výměnná nebo gelová permeační chromatografie. Aniontově výměnná chromatografie byla použita pro speciační analýzu arsenu. [44; 45] Speciační analýza selenu po ošetření vinné révy selenanem sodným ukázala nárůst obsahu anorganického selenu oproti neošetřeným vínům a zachování formy  $\text{Se}^{\text{VI}}$ . Víno však obsahuje také organické specie selenu. [46; 47] Novou metodu pro speciační analýzu hliníku ve víně pomocí LC-ICP-MS vyvinuli K. Karaš a její kolegové. [48]

Dimer pektického polysacharidu rhamnogalakturonanu II (dRG-II) o molekulové hmotnosti asi 10 kDa byl identifikován pomocí SEC-HPLC-ICP-MS jako ligand primárně zodpovědný za komplexaci olova ve víně. Další minoritní specie o hmotnosti 500–3000 Da nebyly v dané studii identifikovány. [49] Obsah monobutylcínu ve víně může být až  $5,9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , dibutylcínu dokonce  $33,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Suchá vína obsahují více dibutylcínu než sladká, během skladování se však dibutylcín rozkládá. [50]

Tým okolo V. Vacchiny se pokusil využít specie arsenu i pro rozlišení geografického původu červených vín. Vzorky z Číny, Bordeaux a Kalifornie se nepodařilo rozlišit úplně, avšak autoři konstatují, že analýza specií (suma  $\text{As}^{\text{III}}$  a  $\text{As}^{\text{V}}$ , tvořící 76 % celkového obsahu As, mono- a dimethylarsenitá kyselina) je pro tento účel lepší než celkový obsah arsenu. [51] Byly také zkoumány změny speciace arsenu během výrobního procesu, konkrétně při kvašení. [44]

Z praktických důvodů se často přistupuje k frakcionaci, která rovněž dovede poskytnout mnoho užitečných informací. Frakcionace je možná například dle velikosti částic, jejich náboje, přítomnosti labilních či inertních komplexů s biologickými ligandy. [1]

Frakcionaci železa, mědi a zinku se věnovala Karadjova s kolegy. Pomocí iontoměničů byly rozděleny frakce podle náboje na kationtové, aniontové a na komplexy polyfenolů s proteiny a polysacharidy. Proteinová a polysacharidová frakce byly postupně vysráženy. Labilní specie  $\text{Fe}^{2+}$  byly odděleny sorpcí komplexu s 1,10-fenantrolinem. V neošetřených vínech bylo téměř 30 % železa vázáno v komplexech s polyfenoly a proteiny (ve výsledných lahvovaných vínech to bylo 20 %). Polysacharidová frakce obsahovala méně než 5 % železa a mědi. Asi polovina mědi byla přítomna ve formě labilních specií. Vázaná byla především s polyfenoly a proteiny. Naproti tomu zinek se vyskytoval z 60 % volný a s polyfenoly se vázalo jen 15 % jeho celkového obsahu. [52] Vázané a volné železo ve víně lze odlišit také s využitím micel – extrakcí vázaného železa do malé, na surfaktanty bohaté fáze a stanovením volného Fe ve zbylé vodní fázi. [53]

McKinnon a Scollary využili ultrafiltraci v míchané cele pro fyzikální frakcionaci Pb, Cu, Fe, Al, Ca, K a Na v bílých a červených vínech. Studovali distribuci kovů ve frakcích o různé velikosti částic. Pozorovali odlišné chování olova oproti jiným prvkům – v červeném víně došlo k náhlému poklesu koncentrace mezi 100 000 a 30 000 NMWCO (mezí hodnota nominální molekulové hmotnosti, definovaná jako minimální molekulová hmotnost rozpuštěné látky, která je z 90 % zadržena membránou [54]), v bílém víně od 100 000 NMWCO. U železa v červeném víně byl pokles 30-50 % mezi 100 000 a 1000 NMWCO, další prvky nevykazovaly frakcionaci, pravděpodobně z důvodu jejich výskytu jakožto aquakomplexy (Na, K), vinanové komplexy (Al, Cu, Ca) a vinan či fosforečnan železa v bílém víně. Zejména u Cu a Ca ultrafiltrace pravděpodobně narušovala kineticky snadno probíhající procesy – uvolňovala je ze slabě asociovaných komplexů. Ultrafiltrace také ovlivnila barvu červeného vína, proto ji nelze využít pro odstranění olova z kontaminovaných vín. [13]

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Vzorky

Seznam všech analyzovaných reálných vzorků je uveden v tabulkách II a III. Vzorky burčáku byly zakoupeny v místních vinotékách, u prodejců nápojů a na podzimních Olomouckých vinných slavnostech 2023. Vzorky vína byly poskytnuty Zahradnickou fakultou Mendelovy univerzity v Brně sídlící v Lednici.

Pro validaci metod byly použity 2 zakoupené vzorky vína – bílé víno odrůdy Muškát moravský (Vino z Kobylí, GALLERY, moravské zemské víno, polosuché; v. oblast Morava, č.š. 03/21; 12 % obj. alkoholu, obsahuje SO<sub>2</sub>) a růžové víno Mucha Sekt Rosé Sec (Schloss Wachenhei, AG, Německo; jakostní šumivé víno; 11 % obj. alkoholu, obsahuje siřičitany), a také vzorek červeného burčáku č. 4 (Modrý Portugal, Vinařství Pavel Mikulica, Vrbice, viz Tab. II).

**Tab. II** – Seznam analyzovaných vzorků burčáku

Číslo vzorku	Odrůda	Vinařství (výrobce)	Barva	Další informace o vzorku
1	Veltlínské červené rané	Vinařství Pavel Halm, Velké Pavlovice	růžová	vinařská oblast Morava, v. obec Velké Pavlovice, v. trať Išperky; cukernatost při sběru 15 ČNM; č.š. 2301
2	Svatovavřínecké	Vinařství Pavel Halm, Velké Pavlovice	červená	11% alkoholu
3	Zweigeltrebe	–	růžová	–
4	Modrý Portugal	Vinařství Pavel Mikulica, Vrbice	červená	č.š. B5/2023, 11% alkoholu, obsahuje siřičitan
5	Müller Thurgau	Vino Ritter s. r. o., Novosedly	bílá	č.š. 2709/1; 1-9% alkoholu, obsahuje SO <sub>2</sub>
6	Muškát moravský	Vinařství Pavel Halm, Velké Pavlovice	bílá	–
7	Veltlínské zelené	–	bílá	–
8	Frankovka	–	červená	–
9	Svatovavřínecké	Vinařství Petr Marada, Mikulčice	červená	vinařská obec Mikulčice, v. trať Kněžské, typ půdy: hlinitopísčítá
10	Muškát Ottonel	Vinařství U Švárů, Bohutice	bílá	–

**Tab. III – Seznam analyzovaných vzorků vína**

Označení vzorku	Odrůda	Ročník	Barva
HIB16	Hibernal	2016	bílá
HIB18		2018	
HIB19		2019	
HIB20		2020	
HIB22		2022	
D19	Dornfelder	2019	červená
D20		2020	
D21		2021	
D23		2023	
PER19	Peron	2019	bílá
PER21		2021	
PER22		2022	
PER23		2023	
CM19	Cabernet Moravia	2019	červená
CM20		2020	
CM23		2023	

### 3.2 Chemikálie

- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Na o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Mg o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Al o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – K o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Ca o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – V o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Cr o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Mn o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Fe o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika

- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Ni o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Cu o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Zn o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – As o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Rb o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Sr o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Mo o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Cd o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL – Pb o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM vodný kalibrační roztok ASTASOL MIX 015 – Al, Be, Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sr, V, W, Zn o koncentraci  $0,100 \pm 0,0002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (každý) v 5%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- $\text{HNO}_3$  (ANALPURE) 67–69%, Analytika, spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- $\text{H}_2\text{O}_2$  (AnalaR NORMAPUR) 30%, VWR Chemicals BDH, Francie
- demineralizovaná voda o rezistivitě  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$
- 1-oktanol – čistota >99,5% (GC), Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- uvolňovací činidlo pro FAAS –  $\text{LaCl}_3$  o koncentraci  $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HCl}$ , Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- CRM-TMDW-500 – stopové prvky v pitné vodě (v 2%  $\text{HNO}_3$ /stopové množství HF; čistota 99,0-99,9999%), High-Purity Standards, USA
- roztok vnitřního standardu ASTASOL – Bi, In, Sc, Tb, Y o koncentraci  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  v 5%  $\text{HNO}_3$  (v/v), Analytika spol. s. r. o., Praha, Česká republika
- ladící roztoky pro ICP-MS:
  - Tuning Solution – Ce, Co, Li, Tl, Y o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (m/m), Agilent Technologies, USA

- 7500 Series PA Tuning 1, Agilent Technologies, USA
- 7500 Series PA Tuning 2, Agilent Technologies, USA
- stlačené plyny:
  - acetylen – čistota 2.6, SIAD, Česká republika
  - argon – čistota min. 4.6, SIAD, Česká republika
  - helium – čistota 5.5, SIAD, Česká republika
- stlačený vzduch (z rozvodu v budově fakulty)

### 3.3 Pomůcky a přístroje

Pomůcky:

- pipety FINNPIPETTE F2 100–1000 µl a 0,5–5 ml, Thermo Scientific, USA
- polypropylenové pipetovací špičky FINNTIP a Labtip Blue, Thermo Scientific, Finsko
- plastové odměrné baňky 25 ml, Kartell S.p.A. – LABWARE Division, Itálie
- plastové odměrné baňky 10 a 100 ml, VITLAB GmbH, Německo
- plastové zkumavky s víčky, centrifugační zkumavky s víčky, mikrozukavky eppendorf, kelímky, plastová hodinová sklíčka, stojánek na zkumavky, lahvička se širokým hrdlem a šroubovacím uzávěrem, stříčka, nálevka
- laboratorní sklo – odměrné baňky třídy A 25 ml, 10 ml, SIMAX, Česká republika; nálevka
- teflonové kelímky pro rozklad s využitím mikrovlnného záření
- Amicon Ultra – 0,5ml 3K a 10K centrifugační filtry a 1,5ml mikrozukavky, Millipore, Irsko
- lihový fix na popisování zkumavek

Přístroje:

- ICP-MS 7700x Series, Agilent Technologies, Japonsko  
s automatickým dávkovačem vzorků ASX-500 Series ICP-MS Autosampler, Agilent Technologies, Japonsko
- AAS SavantAA, GBC Scientific Equipment, Austrálie
  - sodíková výbojka s dutou katodu, Photron Pty. Ltd., Austrálie
  - draslíková výbojka s dutou katodou, SpectrAA Lamp, Varian, Austrálie
  - vápníková výbojka s dutou katodu, Photron Pty. Ltd., Austrálie
  - hořčíková výbojka s dutou katodou, SpectrAA Lamp, Varian, Austrálie
  - železná výbojka s dutou katodou, Photron Pty. Ltd., Austrálie

- zinková výbojka s dutou katodou, Photron Pty. Ltd., Austrálie
- přístroje pro přípravu demineralizované vody Milli-Q Reference (pro měření na ICP-MS) a Direct-Q 3 UV (pro měření na AAS), Merck Millipore, Francie
- mikrovlnný mineralizátor MLS 1200 Mega, Milestone, Itálie
- centrifuga Eppendorf 5702, Eppendorf, Německo
- centrifuga Mikro 120, Hettich, Německo
- vortex IKA Yellowline TTS2, IKA-Werke GmbH & Co. KG
- analytické váhy XSE205, Mettler Toledo, USA

### 3.4 Příprava vzorků

Vzhledem k obsahu organické složky musely být vzorky podrobeny rozkladu. Zvolen byl rozklad na mokré cestě v uzavřeném systému s využitím mikrovlnného záření (viz dále – kapitola 3.4.1).

Vzorky burčáky byly podrobeny také frakcionaci. Kromě celkového obsahu ve vzorku byla stanovována i koncentrace kovů v kapalném a pevném podílu burčáku. Před další manipulací se vzorkem byly ke vzorkům burčáku vždy přidávány dvě kapky oktanolu proti pění. Zkumavky s 10 ml burčáku byly podrobeny centrifugací při 4000 ot./min. po dobu 15 minut. Poté byl kapalný podíl opatrně odpipetován a zbývající pevný podíl kvantitativně převeden na plastové hodinové sklíčko k vysušení (sušení probíhalo na vzduchu při laboratorní teplotě po dobu několika dní) a následně do teflonového kelímku pro rozklad. Pro dostatečnou navážku byly spojeny vždy dva pevné podíly do jednoho teflonového kelímku, tedy vzorek pevného podílu odpovídal 20 ml původního burčáku. Rozloženy byly také 3 ml kapalného podílu.

Jiné rozdělení vzorků na frakce bylo provedeno pomocí centrifugačních filtrů Amicon Ultra s NMWCO 3000 Da a 10000 Da. 0,5 ml vzorku bylo napipetováno do centrifugačního filtru umístěného v 1,5ml mikrozkušavce a následně centrifugováno při 12100 ot./min. (odpovídá relativní centrifugační síle asi 14000 g). Pro získání nepřefiltrovaného podílu byl centrifugační filtr umístěn do čisté mikrozkušavky dnem vzhůru a centrifugován při 3200 ot./min (zhruba 1000 g). Opět byly spojovány dva odpovídající podíly filtrátu/nezfiltrovaného podílu daného vzorku. Tímto způsobem byly zpracovány vybrané vzorky vína, burčáku a kapalného podílu burčáku (přes 3kDa filtry vzorek vína PER23, burčáku č. 10 a kapalného podílu burčáku č. 6, přes 10kDa filtry vzorek burčáku č. 3 a kapalného podílu burčáku č. 9).

Všechny vzorky byly připravovány v duplikátech. Pouze při příliš nízké navážce (méně než 20 mg pro vysušený pevný podíl burčáku a 150 mg pro kapalné vzorky z filtrace) byly podíly dále spojeny a rozkládány pouze v jednom opakování.

#### 3.4.1 Rozklad vzorků

Do teflonového kelímku byly ke 3 ml vzorku nebo jeho kapalného podílu, případně převedené navážce pevného vzorku, filtrátu či nezfiltrovaného podílu, napipetovány vždy 3 ml HNO<sub>3</sub> a 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. V každém z rozkladů byl rozkládán i slepý pokus, jehož složení odpovídalo 3 ml HNO<sub>3</sub> a 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po uklidnění případné bouřlivé reakce vzorků s rozkladnou směsí, doprovázené bubláním a uvolňováním červenohnědých par oxidů dusíku, byly teflonové kelímky uzavřeny víčky s pojistkami a umístěny do karuselu. Použitý rozkladný program je podrobněji popsán v tabulce IV.

**Tab. IV** – Rozkladný program mikrovlnného mineralizátoru

Krok č.	Příkon [W]	Čas [min]
1	250	2
2	0	2
3	400	5
4	0	2
5	500	2
6	0	2
7	600	6
8	ventilace	5

Mezi jednotlivými rozklady byly kelímky vždy důkladně vypláchnuty demineralizovanou vodou. Před samotným rozkladem vzorků, mezi rozklady různých vzorků a na konci dne byl vždy proveden čistící krok (na konci dne dvakrát), aby se zabránilo kontaminaci vzorků mezi sebou navzájem. Čistící krok spočíval v působení mikrovlnného záření s příkonem 600 W na teflonové kelímky obsahující 3 ml HNO<sub>3</sub> po dobu 10 minut.

Po proběhnutí rozkladu byly vzorky převedeny do odměrných baněk a doplněny na definovaný objem demineralizovanou vodou. V případě slepých pokusů a vzorků vína, burčáku a jeho kapalného podílu byl výsledný objem 25 ml, rozložené pevné podíly, filtráty a nezfiltrované podíly byly převáděny do 10ml odměrných baněk. Takto připravené vzorky byly přímo analyzovány, případně při zjištění příliš vysokého obsahu některého ze stanovovaných prvků během měření dále adekvátně naředěny demineralizovanou vodou.



### 3.5 Příprava kalibračních standardů

Jednotlivé kalibrační standardy byly vždy namíchaný čerstvé do 25ml odměrných baněk z jednoprvkových CRM vodných kalibračních roztoků o koncentraci  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , v případě ICP-MS z předem připraveného směšného zásobního roztoku o koncentraci  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, a Pb. Ten byl připraven rovněž z jednoprvkových CRM vodných kalibračních roztoků o koncentraci  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , případně s využitím směšného CRM o koncentraci  $100 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  do 25ml odměrné baňky a uchováván v lednici v plastové lahvičce se širokým hrdlem a šroubovacím uzávěrem. Všechny kalibrační roztoky byly okyseleny 500  $\mu\text{l}$  kyseliny dusičné. Směšné kalibrační roztoky Ca a Mg pro AAS obsahovaly navíc 2 ml  $\text{LaCl}_3$ , jakožto uvolňovacího činidla pro lepší atomizaci vápníku. Složení kalibračního slepého pokusu tomu odpovídalo. Sada směšných kalibrační roztoků pro Na a K byla připravována do 25ml plastových odměrných baněk, aby se zabránilo kontaminaci sodíkem ze skla.

Při měření pomocí ICP-MS byla používána sada kalibračních roztoků o koncentracích 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 50; 100 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků pro měření pomocí AAS jsou uvedeny v tabulce V. Pro dvojice sodík a draslík a hořčík a vápník byla připravena vždy jedna sada směšných kalibračních standardů, pro zbývající prvky byla sada kalibračních roztoků připravována jednotlivě.

**Tab. V** – Koncentrace kalibračních standardů pro AAS

Prvek	c [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]							
	0	0,2	0,5	1	2	5	8	10
Na, K	0	0,2	0,5	1	2	5	8	10
Ca	0	0,5	1	2	5	8	10	–
Mg	0	0,05	0,1	0,2	0,5	0,8	1	–
Fe	0	0,2	0,5	0,8	1	2	5	–
Zn	0	0,025	0,05	0,1	0,2	0,5	0,8	1

### 3.6 Stanovení pomocí ICP-MS

Pro stanovení kovů s využitím izotopů  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{51}\text{V}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{85}\text{Rb}$ ,  $^{88}\text{Sr}$ ,  $^{95}\text{Mo}$ ,  $^{111}\text{Cd}$  a  $^{208}\text{Pb}$  byl použit hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem od firmy Agilent Technologies (ICP-MS 7700x). Roztoky kalibračních standardů a vzorků byly zmlžovány koncentrickým zmlžovačem, byla použita mlžná komora dle Scotta. Hmotnostním analyzátozem byl kvadrupól. Analýza probíhala v heliovém módu s využitím oktapólové kolizní cely. Výsledky měření byly průměrem pětkrát opakovaného proměření. Nastavené podmínky měření shrnuje tabulka VI.

**Tab. VI** – Nastavení přístroje ICP-MS během měření

Parametr	Nastavená hodnota
Příkon vysokofrekvenčního generátoru	1550 W
Impedanční přizpůsobení generátoru ( <i>angl. RF Matching</i> )	1,8 V
Hloubka vzorkování	8 mm
Rychlost čerpání pumpy zmlžovače	0,1 ot./s
Teplota mlžné komory	2 °C
Průtok nosného plynu ( <i>angl. carrier gas</i> )	1,07 l/min
Průtok vnějšího plazmového plynu ( <i>angl. plasma gas</i> )	15,01 l/min
Průtok středního plazmového plynu ( <i>angl. auxiliary gas</i> )	0,90 l/min
Průtok helia	5 ml/min

Samotnému měření předcházela teplotní stabilizace, naladění přístroje pomocí ladících roztoků a kontrola jeho výsledků (Tab. VII).

**Tab. VII** – Akceptační kritéria pro parametry kontrolované po naladění přístroje

Prvek	Pozice maxima píku [m/z]	Signál v No Gas módu [cps]	RSD	Oxidické ionty ( $^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ )	Dvojnásobně nabitě ionty ( $^{140}\text{Ce}^{2+} / ^{70}\text{Ce}^+$ )	Šířka píku (w-10 %)
$^7\text{Li}$	6,9–7,1	3000	≤ 3 %	≤ 1,5 %	≤ 3 %	0,65-0,80
$^{89}\text{Y}$	88,9–89,1	10000				
$^{205}\text{Tl}$	204,9–205,1	6000				

Spolehlivost výsledků a stabilita systému během měření byla kontrolována průběžnou analýzou certifikovaného referenčního materiálu stopových prvků v pitné vodě (TMDW–500). Před měřením referenčního materiálu byla proměřena čistá voda, po kalibračním standardu o nejvyšší koncentraci byla voda proměřena dvakrát.

Pomocí certifikovaného referenčního materiálu TMDW–500 byly také přiřazovány vnitřní standardy, a to vždy tak, aby získané výsledky co nejlépe odpovídaly certifikovaným hodnotám a aby rozdíl mezi m/z přiřazeného vnitřního standardu a m/z měřeného prvku nebyl větší než 50. Vzhledem k přítomnosti bismutu v tomto certifikovaném referenčním materiálu nebylo možné použití  $^{209}\text{Bi}$  jako vnitřního standardu

pro olovo. Proto byl olovu přiřazen nejbližší vnitřní standard –  $^{159}\text{Tb}$ . Nejčastější přiřazení vnitřních standardů je uvedeno v tabulce VIII.

**Tab. VIII** – Přiřazení vnitřních standardů pro vyhodnocení koncentrace měřených prvků

Vnitřní standard	Měřené prvky
$^{45}\text{Sc}$	$^{27}\text{Al}$ , $^{52}\text{Cr}$ , $^{66}\text{Zn}$
$^{89}\text{Y}$	$^{51}\text{V}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{56}\text{Fe}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{60}\text{Ni}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{85}\text{Rb}$ , $^{88}\text{Sr}$
$^{115}\text{In}$	$^{95}\text{Mo}$ , $^{111}\text{Cd}$
$^{159}\text{Tb}$	$^{208}\text{Pb}$

### 3.7 Stanovení pomocí AAS

Sodík, draslík, hořčík, vápník, železo a zinek byly stanovovány pomocí atomového absorpčního spektrometru SavantAA (GBC Scientific Equipment). Pro sodík a draslík byl využit emisní mód měření, tedy otočení hořáku o  $90^\circ$  a snímání intenzity emisního záření, nikoli absorbance. Ostatní prvky byly měřeny klasickým způsobem v absorpčním módu. Atomizace ve všech případech probíhala v plameni o složení acetylen–vzduch. Data pro vyhodnocení opět pocházela z pětkrát opakovaných proměření daného vzorku. Konkrétní podmínky jednotlivých měření jsou shrnuty v tabulce IX. Při stanovení vápníku a hořčíku byly vzorky míchány s uvolňovacím činidlem ( $\text{LaCl}_3$ ) v poměru odpovídajícímu složení kalibračních roztoků.

**Tab. IX** – Nastavení přístroje AAS během měření jednotlivých prvků

prvek	Na	K	Ca	Mg	Fe	Zn
mód	emisní		absorpční			
vlnová délka [nm]	589,00	766,50	422,70	285,20	248,30	213,90
průtok paliva (acetylen) [l/min]	1,100	1,400	1,600	1,300	1,700	1,300
průtok oxidovadla (vzduch) [l/min]	11,00	11,00	11,00	10,50	11,00	10,00
poloha (úhel otočení) hořáku [°]	$90^\circ$	$90^\circ$	$0^\circ$	$0^\circ$	$0^\circ$	$0^\circ$
šířka štěrbinu monochromátoru [nm]	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	0,5
žhavicí proud výbojky [mA]	5,00	6,00	5,00	3,00	8,00	5,00

Pro hodnoty duplikátů, ze kterých byla při vyhodnocení výsledků (AAS i ICP-MS) vypočítána průměrná hodnota koncentrace ve vzorku, byla vypočítána také dovolená diference  $D_r$  podle vzorce:

$$D_r[\%] = \frac{x_1 - x_2}{(x_1 + x_2)/2} \cdot 100 \quad (4)$$

kde  $D_r$  je dovolená diference,  $x_1$  a  $x_2$  jsou dílčí naměřené hodnoty koncentrace duplikátů.

### 3.8 Validace

V rámci validace byly proměřeny dva vzorky vína a jeden vzorek burčáku rozložené vždy v sedmi opakováních. U obou použitých metod byly posuzovány následující validační parametry: meze detekce a stanovitelnosti, pracovní rozsah a linearita kalibrační závislosti, pravdivost a preciznost.

#### 3.8.1 Určení meze detekce a stanovitelnosti

Hodnoty mezí detekce a stanovitelnosti byly získány za podmínek mezilehlé preciznosti. Byly vyhodnoceny z naměřených signálů blanků pocházejících z různých rozkladů provedených ve třech dnech, a to pomocí následujících výpočtů:

$$LOD = \frac{3 \cdot SD}{b} \quad LOQ = \frac{10 \cdot SD}{b} \quad (5, 6)$$

kde  $SD$  je směrodatná odchylka absorbcí/cps a  $b$  je směrnice kalibrační závislosti.

#### 3.8.2 Pravdivost

Pravdivost měření byla ověřována na základě testování výtěžnosti. Stanovované prvky byly rozděleny do třech skupin na základě jejich přibližného obsahu ve vzorcích, kterému následně odpovídal adekvátní přídavek standardu. Přídavek standardu byl proveden na dvou různých koncentračních úrovních dle tabulky X. Vzorky s přídavkem standardu byly rovněž připraveny v sedmi opakováních.

**Tab. X** – Použité přídávky standardu při testování výtěžnosti

Vzorek	V, Cr, Ni, Cd, Pb, As, Mo, Cu	Al, Fe, Mn, Zn, Rb, Sr	Na, K, Ca, Mg
Bílé víno	10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	4000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Růžové víno	5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	2000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Červený burčák	5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	4000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

Výtěžnost potom byla vypočítána pomocí následujícího vzorce:

$$R_f[\%] = \frac{(c_{sp} - c_0)}{c_{ref}} \cdot 100 \quad (7)$$

kde  $R_f$  je výtěžnost,  $c_{sp}$  koncentrace ve vzorku s přidavkem standardu,  $c_0$  koncentrace ve vzorku bez přidavku a  $c_{ref}$  skutečná koncentrace přidavku standardu.

Nastavené kritérium pro vyhovující výtěžnost bylo 70–130 %.

### 3.8.3 Další validační parametry

Preciznost byla vyhodnocována na základě hodnoty relativní směrodatné odchylky výsledků ze sedmi opakování vzorku s přidavkem standardu. Za vyhovující bylo považováno  $RSD < 20 \%$ . Linearita kalibrační závislosti byla hodnocena podle hodnoty korelačního koeficientu. Akceptační kritérium bylo  $R \geq 0,99$ .

## 3.9 Použitý software pro zpracování dat

Data z obou metod (AAS i ICP-MS) byla dále zpracována s využitím MS Excel. Tento software byl použit i pro provedení statistického srovnání výsledků párovým testem.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Výsledky validace

#### 4.1.1 Meze detekce a stanovitelnosti

Tabulka XI prezentuje meze detekce a stanovitelnosti za podmínek mezilehlé preciznosti. Ty byly vypočítány jako instrumentální meze detekce a stanovitelnosti, tedy jejich hodnota udává nejmenší detekovatelné/stanovitelné množství v měřeném roztoku. Dále jsou pro vzorky vína, burčáku a jeho kapalného podílu uvedeny hodnoty přepočítané na množství detekovatelné a stanovitelné v původním vzorku. V dalších případech (pevné podíly burčáku, filtráty a nezfiltrované podíly) je potřeba zohlednit přepočítání na konkrétní navážku daného vzorku.

**Tab. XI** – Meze detekce a stanovitelnosti

Metoda	Kov	LOD	LOQ	LOD	LOQ
		[ $\mu\text{g/l}$ ]	[ $\mu\text{g/l}$ ]	[ $\mu\text{g/l}$ ]	[ $\mu\text{g/l}$ ]
		v měřeném roztoku		v původním vzorku*	
AAS	Na	59,57	198,58	496,44	1654,81
	Mg	11,21	37,37	93,42	311,41
	Fe	32,47	108,25	270,62	902,07
	Zn	53,12	177,07	442,68	1475,61
ICP-MS	Al	27,66	92,19	230,48	768,26
	V	0,08	0,25	0,64	2,12
	Cr	0,30	0,99	2,48	8,26
	Mn	0,29	0,97	2,42	8,08
	Fe	4,74	15,81	39,52	131,72
	Ni	1,83	6,10	15,25	50,83
	Cu	0,64	2,15	5,36	17,88
	Zn	33,25	110,82	277,06	923,53
	As	1,28	4,28	10,70	35,66
	Rb	1,18	3,95	9,87	32,91
	Sr	0,52	1,75	4,37	14,56
	Mo	3,25	10,84	27,09	90,30
	Cd	0,02	0,07	0,16	0,54
	Pb	0,28	0,93	2,33	7,78

\*platí pro vzorky vína, celého burčáku a jeho kapalného podílu.

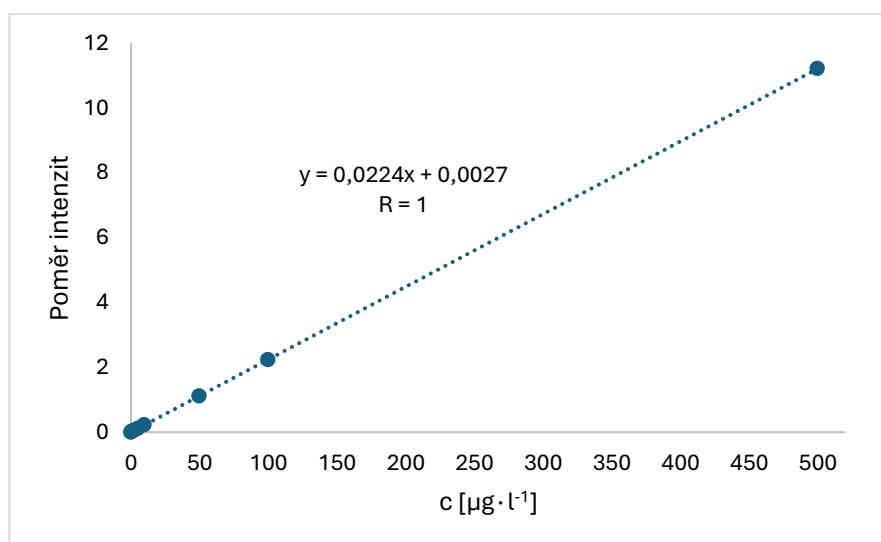
U metody AAS bylo dosaženo očekávatelných hodnot mezí detekce a stanovitelnosti. Vyšší hodnoty LOD a LOQ u hliníku, železa a zinku při stanovení pomocí ICP-MS byly pravděpodobně způsobeny neodhalenou kontaminací při přípravě vzorku nebo při měření. K jejich snížení nepomohl ani přesun rozkladu vzorků do čistšího prostředí (z laboratoře na Katedře analytické chemie do laboratoře R-lab).

#### 4.1.2 Linearita a rozsah kalibrace

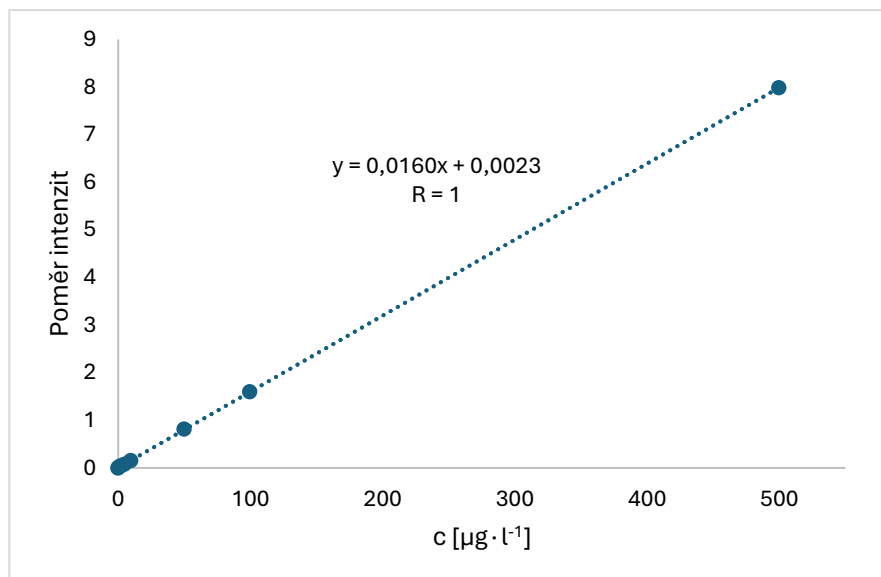
Linearita kalibračních závislostí byla posuzována na základě hodnot korelačních koeficientů. Obvyklé kritérium  $R \geq 0,99$  bylo splněno ve všech případech. Konkrétní hodnoty jsou spolu s používanými rozsahy jednotlivých kalibrací uvedeny v tabulce XII. Grafické zobrazení vybraných kalibračních závislostí včetně kalibračních rovnic a korelačních koeficientů je vyobrazeno na obrázcích 4–7.

**Tab. XII** – Rozsah a linearita jednotlivých kalibračních závislostí

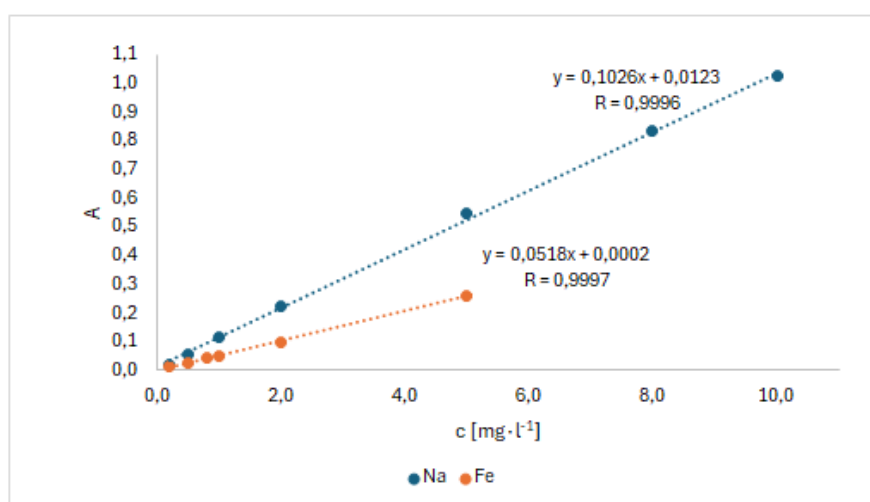
Metoda	Kov	Rozsah	R
AAS	Na	LOQ–10 mg·l <sup>-1</sup>	0,9996
	Mg	LOQ–1 mg·l <sup>-1</sup>	0,9998
	Fe	LOQ–5 mg·l <sup>-1</sup>	0,9997
	Zn	LOQ–1 mg·l <sup>-1</sup>	0,9997
ICP-MS	Al	LOQ–500 µg·l <sup>-1</sup>	1,0000
	V		1,0000
	Cr		1,0000
	Mn		1,0000
	Fe		1,0000
	Ni		1,0000
	Cu		1,0000
	Zn		1,0000
	As		1,0000
	Rb		1,0000
	Sr		1,0000
	Mo		1,0000
	Cd		1,0000
Pb	0,9999		



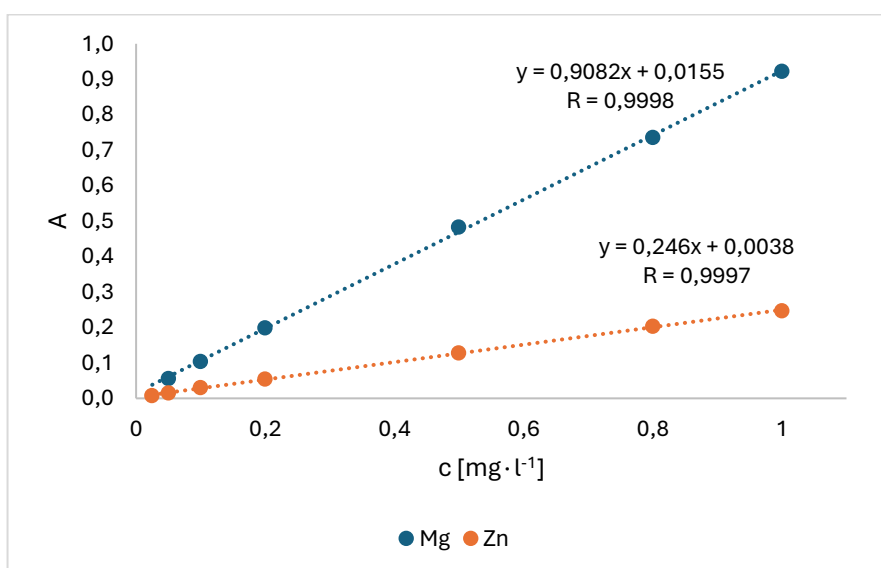
**Obr. 4** – Kalibrační závislost pro mangan



**Obr. 5** – Kalibrační závislost pro rubidium



**Obr. 6** – Kalibrační závislosti pro sodík a železo (AAS)



**Obr. 7** – Kalibrační závislosti pro hořčík a zinek (AAS)



#### 4.1.3 Pravdivost

Výsledky testování výtěžnosti za účelem ověření pravdivosti měření shrnuje tabulka XIII. Kritérium 70–130 % bylo dodrženo u všech uvedených prvků kromě železa v růžovém víně, kde je však rozdíl nevýznamný, a také mědi v červeném burčáku, kde je důvodem nevhodně zvolená koncentrační hladina přídávku standardu. Ta byla volena na základě předpokládané koncentrace ve vzorku podle obsahu mědi ve víně, v burčáku však byla koncentrace řádově vyšší, a proto přídavek standardu na koncentrační úrovni  $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  nebyl dostatečný pro to, aby bylo možné smysluplně hodnotit výtěžnost.

**Tab. XIII** – Výsledky testování výtěžnosti

Vzorek:		Růžové víno	Bílé víno	Červený burčák
Metoda	Kov	Výtěžnost [%]		
AAS	Na	97,2	89,9	93,7
	Mg	126,1	119,0	96,4
	Fe	119,3	125,6	82,6
	Zn	119,7	116,7	95,4
ICP-MS	Al	128,3	111,3	91,7
	V	122,1	118,1	93,1
	Cr	78,6	90,4	94,5
	Mn	113,5	114,3	88,0
	Fe	68,7	112,5	82,7
	Ni	104,3	106,7	76,3
	Cu	108,4	113,3	-4,9
	Zn	119,7	117,3	88,1
	As	114,1	113,2	95,0
	Rb	128,2	123,1	92,8
	Sr	115,9	115,3	98,9
	Mo	120,1	119,3	86,6
	Cd	116,4	114,6	83,1
	Pb	105,9	101,6	76,7

#### 4.1.4 Preciznost

Preciznost byla posuzována jako relativní směrodatná odchylka 7 opakování vzorku bílého vína, růžového vína a červeného burčáku s přídávkem standardu. Jak je vidět z tabulky XIV, nastavené kritérium  $\text{RSD} < 20 \%$  bylo splněno ve všech případech.

**Tab. XIV – Preciznost**

Vzorek:		Růžové víno	Bílé víno	Červený burčák
Metoda	Kov	RSD [%]		
AAS	Na	17,8	4,9	12,6
	Mg	6,8	3,2	7,1
	Fe	8,2	7,5	9,8
	Zn	7,7	5,1	18,5
ICP-MS	Al	15,2	1,9	9,0
	V	3,4	6,3	7,1
	Cr	16,4	13,0	9,0
	Mn	2,3	3,6	7,0
	Fe	7,0	17,8	7,7
	Ni	4,1	4,8	9,7
	Cu	2,1	2,9	7,5
	Zn	6,6	4,3	15,0
	As	2,6	4,8	9,2
	Rb	3,8	4,1	7,2
	Sr	2,0	3,8	7,8
	Mo	3,8	3,7	11,0
	Cd	4,0	4,1	7,3
	Pb	5,6	3,7	7,8

## 4.2 Výsledky měření reálných vzorků

### 4.2.1 Celkový obsah kovů ve vzorcích

Nikl, arsen, molybden a kadmium byly ve všech vzorcích přítomny v koncentracích menších než příslušná hodnota meze stanovitelnosti, stejně jako Zn ve víně při stanovení pomocí AAS – touto metodou se podařilo stanovit jen obsah 2,46 mg·l<sup>-1</sup> Zn ve víně odrůdy Peron z roku 2022 a 2,73 mg·l<sup>-1</sup> u téhož vína z roku 2023. Ostatní výsledky vzorků vína a burčáku jsou shrnuty v tabulkách XV a XVI.

Pro hodnoty duplikátů použité pro získání průměrné koncentrace ve vzorku byla vypočítána dovolená diference  $D_r$ , která je v případě dvou hodnot vhodnější než relativní směrodatná odchylka. Hodnoty, které nejsou <LOQ, ale není u nich v tabulkách uvedeno  $D_r$ , byly získány pouze z jednoho opakování, neboť koncentrace druhého duplikátu byla pod mezí stanovitelnosti.

Tab. XV – Celková koncentrace kovů obsažených ve vzorcích vína

Vzorek:		HIB16	HIB18	HIB19	HIB20	HIB22	D19	D20	D21	D23	CM19	CM20	CM23	PER19	PER21	PER22	PER23	
AAS	Na	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	122,30	71,21	21,18	19,08	23,30	17,68	6,52	5,60	3,55	11,43	5,98	3,58	6,28	8,55	19,36	23,26
		D <sub>r</sub> [%]	136,32	108,47	12,67	12,66	19,27	7,17	3,32	5,65	6,57	3,65	2,79	11,16	6,63	10,42	12,48	9,64
	Mg	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	66,98	88,13	68,92	67,88	74,76	78,44	68,12	69,86	93,94	65,78	59,06	79,63	74,50	69,81	68,50	96,69
		D <sub>r</sub> [%]	0,73	3,69	2,52	0,72	10,33	3,35	4,06	5,77	7,85	0,68	4,87	17,58	0,34	2,33	8,39	0,65
	Fe	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	3,26	2,49	<LOQ	1,07	1,00	1,91	1,08	<LOQ	<LOQ	2,18	<LOQ	0,91	4,14	4,59	1,10	2,65
		D <sub>r</sub> [%]	96,81	74,71	–	12,50	10,00	19,61	2,32	–	–	15,68	–	–	5,63	6,90	12,12	0,00
ICP-MS	Al	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	1724,49	<LOQ	<LOQ	<LOQ	823,09	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	793,78	<LOQ
		D <sub>r</sub> [%]	–	4,51	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	V	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	2,75	6,02	<LOQ	4,89	2,91	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,12	<LOQ	7,09	<LOQ
		D <sub>r</sub> [%]	2,63	14,11	–	20,13	17,95	–	–	–	–	–	–	–	–	–	15,46	–
	Cr	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	9,32	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10,96	20,29	<LOQ	<LOQ	13,87	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10,40	<LOQ
		D <sub>r</sub> [%]	1,12	–	–	–	–	12,67	106,54	–	–	22,57	–	–	–	–	5,30	–
	Mn	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	489,29	697,92	499,29	513,47	495,54	774,48	531,93	458,19	558,57	1250,25	920,74	1283,72	510,83	497,34	424,79	519,71
		D <sub>r</sub> [%]	0,73	2,50	3,97	1,94	4,86	5,41	3,53	2,34	3,19	0,68	0,22	2,78	2,18	3,05	2,49	0,99
	Fe	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	1535,36	1567,67	871,78	1036,26	991,22	1739,89	1036,66	864,89	731,90	2047,83	776,04	869,30	3661,62	4249,13	974,10	2531,41
		D <sub>r</sub> [%]	0,71	1,81	2,54	6,08	5,18	4,69	8,02	2,84	3,26	1,43	0,10	8,57	3,49	4,64	2,47	2,15
	Cu	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	67,70	<LOQ	70,99	23,34	29,81	70,21	198,10	158,24	40,90	55,80	345,74	46,95	<LOQ	26,14	37,14	182,16
		D <sub>r</sub> [%]	2,75	–	5,99	5,73	11,97	8,51	11,17	5,95	5,63	8,06	0,22	2,65	–	0,34	3,56	20,91
	Zn	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1029,21	1122,57	986,64	<LOQ	<LOQ	997,81	1059,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2234,54	2445,25
		D <sub>r</sub> [%]	–	–	–	–	6,76	2,32	5,18	–	–	–	0,01	–	–	–	3,64	24,09
	Rb	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	510,73	480,34	378,19	364,62	644,45	1353,21	1385,26	1465,21	1898,40	730,96	713,30	865,76	720,88	874,28	668,27	708,58
		D <sub>r</sub> [%]	2,85	0,06	3,56	0,66	5,00	6,26	4,40	4,33	1,55	0,09	0,08	3,55	2,11	3,00	0,02	3,91
	Sr	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	532,15	604,63	293,05	331,50	481,24	605,85	499,28	677,38	795,63	517,64	360,04	682,80	258,07	280,52	429,44	482,66
		D <sub>r</sub> [%]	0,60	0,80	3,20	1,59	2,74	3,76	3,23	2,05	3,11	0,98	0,84	0,98	1,10	4,51	2,84	2,07
Pb	c [µg·l <sup>-1</sup> ]	19,00	18,00	10,02	12,39	22,50	23,72	34,01	16,83	<LOQ	28,15	38,37	10,36	<LOQ	<LOQ	48,18	58,16	
	D <sub>r</sub> [%]	0,77	3,83	1,01	0,44	2,31	4,98	17,21	6,82	–	7,52	1,28	2,52	–	–	2,37	3,00	

**Tab. XVI** – Celková koncentrace kovů ve vzorcích burčáku

<b>Vzorek:</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
AAS	Na	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	4,37	2,82	8,81	4,59	10,51	8,08	7,55	26,80	18,63	
		D <sub>r</sub> [%]	–	7,82	5,02	–	9,07	2,93	12,07	8,72	5,57	33,91	
	Mg	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	121,75	70,03	54,22	104,20	81,09	59,84	37,78	38,26	94,06	66,25	
		D <sub>r</sub> [%]	–	0,89	0,58	–	5,01	2,61	6,99	4,72	1,33	51,89	
	Fe	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,96	2,03	<LOQ	3,10	1,82	<LOQ	4,17	
		D <sub>r</sub> [%]	–	–	–	–	71,60	–	5,38	1,83	–	52,95	
	Zn	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	<LOQ	1,67	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,70	1,75	<LOQ	<LOQ	
		D <sub>r</sub> [%]	–	–	2,49	–	–	–	–	10,93	–	–	
	ICP-MS	Al	c [μg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3636,02	<LOQ	<LOQ	1044,38	901,93	<LOQ	1546,62
			D <sub>r</sub> [%]	–	–	–	7,30	–	–	18,13	0,49	–	–
V		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	<LOQ	<LOQ	12,85	<LOQ	<LOQ	2,82	2,99	<LOQ	10,76	
		D <sub>r</sub> [%]	–	–	–	3,09	–	–	27,43	52,76	–	66,14	
Cr		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	<LOQ	22,90	27,08	<LOQ	<LOQ	18,86	18,13	<LOQ	<LOQ	
		D <sub>r</sub> [%]	–	–	0,69	5,71	–	–	1,11	10,09	–	–	
Mn		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	673,20	603,61	648,85	817,60	349,84	328,68	920,84	1053,03	1109,40	285,22	
		D <sub>r</sub> [%]	–	2,92	0,58	1,25	0,10	4,06	6,53	3,09	6,69	53,27	
Fe		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	308,84	393,16	565,11	2427,76	1187,48	333,07	2293,47	1348,41	638,91	3314,39	
		D <sub>r</sub> [%]	–	9,00	6,57	3,21	13,57	3,76	0,74	2,92	2,00	50,81	
Cu		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	1175,44	272,88	3414,08	1060,18	370,91	214,39	1537,40	1492,96	684,26	362,85	
		D <sub>r</sub> [%]	–	1,36	10,87	0,72	6,94	1,89	8,75	0,85	7,14	52,71	
Zn		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	<LOQ	1165,69	1025,56	<LOQ	<LOQ	1115,91	1164,35	<LOQ	<LOQ	
		D <sub>r</sub> [%]	–	–	0,45	–	–	–	0,64	13,55	–	–	
Rb		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	1202,13	2625,84	703,48	2800,24	1233,38	828,38	1902,23	3498,97	1724,98	1137,79	
		D <sub>r</sub> [%]	–	1,71	3,04	0,40	1,31	2,40	0,28	5,99	6,24	46,66	
Sr		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	284,76	488,96	238,58	678,30	228,38	289,47	507,79	617,42	596,61	340,96	
		D <sub>r</sub> [%]	–	3,61	4,67	1,61	2,89	2,95	6,81	3,82	7,68	57,09	
Pb		c [μg·l <sup>-1</sup> ]	<LOQ	<LOQ	30,74	7,86	<LOQ	<LOQ	58,57	31,98	<LOQ	17,58	
		D <sub>r</sub> [%]	–	–	2,74	0,00	–	–	3,63	9,30	–	66,50	

Výsledky analýz certifikovaného referenčního materiálu TMDW–500 potvrdily spolehlivost výsledků a stabilitu systému po celou dobu měření ICP-MS. Nalezené koncentrace odpovídaly téměř ve všech případech 80–120 % certifikované hodnoty. Výjimkou byl pouze arsen na začátku jednoho měření, kdy nejvzdálenější byla hodnota 125,10 %.

Výsledky AAS a ICP-MS pro železo byly statisticky porovnány párovým testem na hladině významnosti  $\alpha = 5$  %. Párový test ukázal statisticky významný rozdíl mezi výsledky obou metod pro víno i pro burčák. AAS poskytuje nepatrně vyšší výsledky než ICP-MS. Srovnání pro zinek nebylo možné provést, neboť u obou metod byla velká část

výsledků <LOQ. U železa bylo pod mezí stanovitelnosti AAS pouze několik hodnot (čtyři u vína a tři u burčáku), které byly pro potřeby statistického porovnání nahrazeny hodnotou LOQ.

Stanovení celkového obsahu kovů ve víně a burčáku ukázalo, že zdraví škodlivé kovy v analyzovaných vzorcích nejsou přítomny, nebo jen v zanedbatelných koncentracích. Ani obsah olova nepřekročil legislativou dané limity, jeho koncentrace se často pohybovaly na o řád nižší úrovni.

Obsah sledovaných kovů je řádově stejný ve víně a burčáku, pouze mědi bylo nalezeno v burčáku více. Její koncentrace tam dosahovaly desetin až jednotek  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , zatímco ve víně se pohybovaly okolo desítek maximálně stovek  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Možným vysvětlením tohoto rozdílu je, že měď z burčáku nemůže být odstraněna srážením při fermentaci a následným stáčením, jako je tomu u vína. Koncentrace mědi ve víně byly pod doporučovanou hranicí  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , nehrozí tedy její nežádoucí účinek v podobě rychlejšího kažení vína vlivem oxidace. Ve více než polovině vzorků burčáku byly koncentrace mědi vyšší než  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , avšak tento produkt je určen k rychlé spotřebě. Nadměrná konzumace by ale potenciálně mohla vést k zažívacím potížím.

Burčák obsahoval v některých vzorcích okolo  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  zinku a většinou jednotky  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  sodíku, ve vzorcích č. 6 a 10 obsah sodíku přesáhl  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a ve vzorku č. 9 byla jeho koncentrace až  $26,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Hořčík se ve vzorcích vyskytoval v řádu spíše vyšších desítek  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , v některých vzorcích přesáhl  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Koncentrace manganu a železa se pohybovaly přibližně od 0,3 do jednoho, v případě železa až do více než tří  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

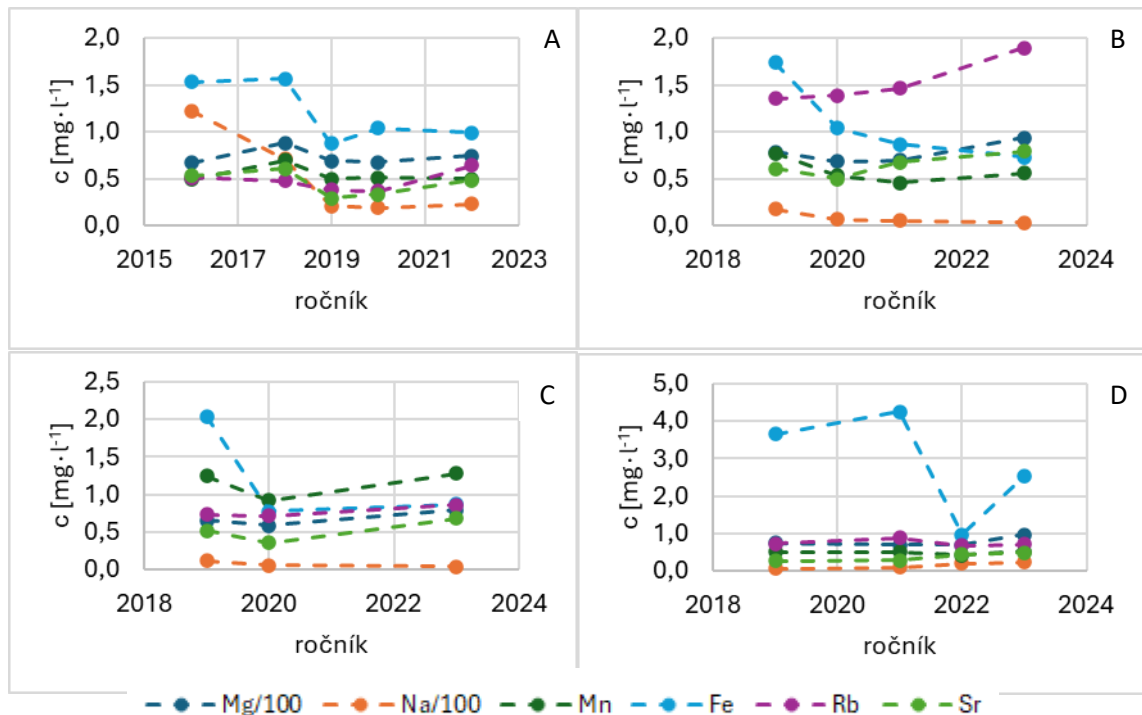
Hliník byl nalezen pouze v několika vzorcích vína i burčáku, za to v koncentracích jednotek  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ačkoli pocházel vzorek burčáku č. 9 z hroznů pěstovaných na hlinitopísčitém typu půdy, koncentrace hliníku v tomto vzorku byla pod mezí stanovitelnosti. Zastoupení vanadu do jisté míry kopíruje hliník, jeho koncentrace jsou však řádově menší ( $2\text{--}13 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Při porovnání bílého, růžového a červeného burčáku od stejného výrobce (vzorky 6, 1 a 2) vidíme nejvyšší obsah železa, rubidia a stroncia v červeném burčáku, nejvíce sodíku naopak v bílém. Hořčíku, manganu a mědi je nejvíce v růžovém vzorku. Al, V, Cr a Pb se nevyskytují ani v jednom z nich nad LOQ. Tyto trendy však nejsou pravidlem, neboť obsah kovů v jednotlivých burčácích je velmi různorodý a závisí na řadě faktorů. Také vzorky stejné odrůdy od jiných výrobců (Svatovavřínecké – vzorky 9 a 2) vykazují různé výsledky, ačkoli až na výjimky je obsah kovů většinou řádově srovnatelný.

Ve vzorcích vína nebyly nalezeny tak vysoké koncentrace mědi, olova či chromu jako ve vínech z jiných českých regionů analyzovaných vědci z Karlovy Univerzity v Praze. [11] Oproti výsledkům vín z Čech byly nižší také nejvyšší nalezené koncentrace manganu nebo vanadu. Naopak koncentrace zinku ve vzorcích PER 22 a 23 byla o něco vyšší. Koncentrace většiny kovů byly ale řádově srovnatelné.

#### 4.2.2 Trendy v jednotlivých odrůdách vína dle ročníků

Obrázek 8 zobrazuje trendy v koncentracích kovů ve víně dle jednotlivých ročníků.



**Obr. 8** – Trendy v koncentracích jednotlivých kovů ve víně dle ročníků, A – odrůda Hibernal, B – Dornfelder, C – Cabernet Moravia, D – Peron

Koncentrace sodíku ve všech odrůdách kromě Peronu s časem klesá. U odrůdy Hibernal byla její hodnota nejvyšší v roce 2016 ( $122,30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), do roku 2020 poklesla na  $19,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , v roce 2022 byl obsah sodíku jen nepatrně vyšší ( $23,30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Nejvíce se mění koncentrace železa, a to v každé odrůdě jinak. Zatímco u odrůdy Dornfelder pozorujeme směrem od roku 2019 až k roku 2023 postupný pokles v jeho koncentraci, v dalších odrůdách obsah železa střídavě klesá a narůstá, případně zůstává podobný ve dvou po sobě následujících letech. Koncentrace hořčíku zůstává přibližně konstantní, narostla však v roce 2023 a u odrůdy Hibernal v roce 2018. Koncentrace rubidia v odrůdě Dornfelder s časem roste. V případě odrůdy Hibernal obsah rubidia od roku 2016 postupně klesá, ale ve vzorku z roku 2022 byl zpozorován nárůst. V ostatních odrůdách se trendy střídají, koncentrace Rb však zůstávají v rozmezí  $668\text{--}874 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Koncentrace

stroncia v odrůdě Peron s časem mírně narůstá, u odrůd Dornfelder a Cabernet Moravia pozorujeme její nárůst s propadem v roce 2020. V případě Hibernalu propad nastal už v roce 2019 a následovala opět rostoucí tendence. Změny v koncentraci manganu jsou u odrůdy Cabernet Moravia podobné jak u stroncia, ve víně odrůdy Hibernal zůstává hladina manganu konstantní, zvýšila se pouze ve vzorku z roku 2018 o asi 200 µg·l<sup>-1</sup>. V odrůdě Peron došlo k mírnému poklesu v roce 2022, koncentrace se víceméně neměnila. V Dornfelderu obsah manganu spíše klesá, v roce 2023 ale zase narostl.

#### 4.2.3 Výsledky analýzy frakcí

Distribuci nejzastoupenějších prvků v burčáku mezi jeho kapalnou a pevnou složku zobrazuje tabulka XVII.

**Tab. XVII** – Zastoupení vybraných kovů v pevném (s) a kapalném (l) podílu burčáku

<b>Vzorek:</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Na	<b>s [%]</b>	–**	0,59	6,41	1,87	1,47	0,64	0,30	0,40	1,24	1,57
	<b>l [%]</b>	–**	92,76	91,16	102,96	91,84	97,46	88,77	97,61	96,11	126,05
	<b>Σ [%]</b>	–**	93,35	97,57	104,82	93,31	98,10	89,08	98,01	97,35	127,62
Mg	<b>s [%]</b>	0,32	0,55	1,66	1,85	1,28	0,63	0,55	0,39	0,56	1,63
	<b>l [%]</b>	65,27	97,89	82,61	95,47	85,66	100,05	94,36	87,86	94,10	110,84
	<b>Σ [%]</b>	65,59	98,44	84,27	97,33	86,95	100,67	94,91	88,25	94,66	112,46
Mn	<b>s [%]</b>	1,35	1,20	6,29	4,84	4,95	2,10	2,13	0,75	2,41	3,07
	<b>l [%]</b>	98,83	92,39	86,94	89,39	86,10	93,84	85,86	90,83	96,47	129,92
	<b>Σ [%]</b>	100,19	93,59	93,24	94,23	91,06	95,93	87,99	91,58	98,87	132,99
Fe*	<b>s [%]</b>	11,82	23,68	42,82	51,54	21,98	27,19	24,05	8,78	33,75	60,10
	<b>l [%]</b>	–**	–**	38,19	23,77	43,44	69,81	14,24	33,25	51,33	31,31
	<b>Σ [%]</b>	–**	–**	81,01	75,30	65,42	97,00	38,28	42,03	85,08	91,41
Cu	<b>s [%]</b>	5,22	6,19	56,48	11,01	30,94	6,84	18,27	6,02	15,94	40,55
	<b>l [%]</b>	76,94	61,04	16,63	76,39	47,07	76,74	24,85	38,75	75,08	54,52
	<b>Σ [%]</b>	82,16	67,23	73,10	87,4	78,01	83,58	43,11	44,76	91,02	95,17
Rb	<b>s [%]</b>	1,75	1,34	30,51	1,78	11,18	1,56	2,98	2,48	9,19	24,39
	<b>l [%]</b>	94,40	91,84	62,93	95,00	76,89	92,20	80,20	69,89	91,3	76,87
	<b>Σ [%]</b>	96,15	93,18	93,44	96,78	88,07	93,77	83,19	72,37	100,49	101,26
Sr	<b>s [%]</b>	0,68	0,71	4,42	8,15	3,51	1,46	1,04	0,51	1,75	2,68
	<b>l [%]</b>	102,06	95,43	91,61	81,62	89,29	94,02	88,74	91,37	96,26	121,54
	<b>Σ [%]</b>	102,73	96,13	96,04	89,77	92,80	95,48	89,78	91,88	98,01	124,22

\*výsledky ICP-MS.

\*\*nevýhodnocováno (hodnoty <LOQ).

Z dalších prvků můžeme uvést například chrom, který se vyskytoval z 80 % v kapalném podílu (80,07 % ku 10,18 % obsažených v pevném podílu ve vzorku č. 3; 80,24 % ku 15,68 % ve vzorku č. 4) nebo vanad (vzorek č. 10: 25,08 % v pevné frakci, 77,17 % v kapalně; vzorek č. 4: 15,68 % v pevné a 80,24 % v kapalně). Olovo bylo ve vzorku č. 6 z 82,66 % v kapalně části a ze 7,24 % v pevné části. Okolo 85 % byl jeho

obsah také v dalších vzorcích kapalného podílu (85,22 % ve vzorku č. 7, 85,78 % ve vzorku 8, odpovídající pevné podíly obsahovaly okolo jednoho procenta Pb). Až okolo 90 % zinku se vyskytovalo v kapalném podílu vzorků 3, 7 a 8.

Většina prvků se tedy vyskytovala převážně v kapalné části vzorků, pouze u mědi a železa byl v některých případech trend opačný. V případě železa se poměry střídaly, asi u poloviny vzorků bylo více železa v pevném, u poloviny v kapalném podílu. Například ve vzorku tři jsou ale obsahy v obou frakcích velmi podobné. Obsah mědi v pevném podílu byl pouze u tohoto vzorku větší než v kapalném. Ve třetím vzorku byl také vyšší obsah rubidia v pevném podílu než v jiných vzorcích. Tvořil asi třetinu celkového obsahu, u vzorku č. 10 to byla čtvrtina. Ve vzorcích 5 a 9 se obsah rubidia v pevné části pohyboval okolo 10 %. U vzorků 5, 7 a 10 se obsahy Cu vyrovnávaly, ačkoli více mědi bylo stále v kapalném podílu. Hliník se naopak vyskytoval spíše v pevných částech vzorků (např. ve vzorku č. 4 66,40 % ku 20,64 % v části kapalné).

Rozdíly v rozdělení stejného kovu mezi pevnou a kapalnou část u různých vzorků mohou být vysvětleny například tím, že jednotlivé vzorky burčáku mohly být v různém stádiu kvašení. Procesy distribuce kovů mezi pevnou a kapalnou složku jsou tím, jak dlouho kvašení vzorku probíhá, dozajista ovlivněny. Příkladem může být vychytávání mědi kvasinkami.

Vybrané vzorky byly zpracovány také pomocí centrifugačních filtrů Amicon Ultra s NMWCO 3000 Da a 10000 Da. Kromě burčáku a jeho kapalných podílů byl tento postup vyzkoušen i pro jeden ze vzorků vína. Zastoupení kovů v jednotlivých frakcích uvádí tabulka XVII. Přes 3kDa filtry byly filtrovány vzorky vína PER23, burčáku č. 10 a kapalného podílu burčáku č. 6, přes 10kDa filtry vzorky burčáku č. 3 a kapalného podílu burčáku č. 9. Frakce  $f_1$  odpovídá nepřefiltrovanému podílu, frakce  $f_2$  filtrátu.



**Tab. XVII** – Zastoupení vybraných kovů ve frakcích > a < 3 či 10 kDa

Vzorek:		3	10	6 – kapalný podíl	9 – kapalný podíl	PER23
Na	f <sub>1</sub> * [%]	40,95	50,01	38,65	20,72	14,07
	f <sub>2</sub> * [%]	63,99	71,33	53,58	70,40	81,31
	Σ [%]	104,93	121,34	92,23	91,12	95,38
Mg	f <sub>1</sub> * [%]	27,67	53,21	38,52	18,14	11,67
	f <sub>2</sub> * [%]	59,48	73,30	54,81	68,06	64,39
	Σ [%]	87,15	126,51	93,33	86,20	76,07
Mn	f <sub>1</sub> * [%]	29,77	56,42	34,31	21,72	11,36
	f <sub>2</sub> * [%]	58,40	77,83	49,89	70,11	82,39
	Σ [%]	88,18	134,25	84,20	91,83	93,76
Fe**	f <sub>1</sub> * [%]	63,21	31,74	27,70	37,62	12,25
	f <sub>2</sub> * [%]	38,68	19,74	32,76	70,08	86,35
	Σ [%]	101,89	51,48	60,46	107,69	98,61
Cu	f <sub>1</sub> * [%]	40,06	41,71	36,76	25,12	13,53
	f <sub>2</sub> * [%]	32,01	40,66	53,96	67,52	70,25
	Σ [%]	72,08	82,37	90,72	92,64	83,77
Rb	f <sub>1</sub> * [%]	26,47	37,85	30,86	18,66	11,23
	f <sub>2</sub> * [%]	61,57	55,63	49,10	71,21	80,91
	Σ [%]	88,03	93,48	79,95	89,87	92,14
Sr	f <sub>1</sub> * [%]	39,46	56,21	35,54	33,00	12,12
	f <sub>2</sub> * [%]	56,88	68,96	47,19	60,67	80,96
	Σ [%]	96,34	125,17	82,73	93,67	93,08

\*f<sub>1</sub> – nepřefiltrovaný podíl (frakce > NMWCO filtru), f<sub>2</sub> – filtrát (frakce < NMWCO filtru), hodnota NMWCO byla 10 kDa pro vzorky 3 a 9, 3kDa pro vzorky 6, 10 a PER23.

\*\*výsledky ICP-MS.

Smyslem filtrace bylo rozdělit vzorky na frakce zohledňující možný výskyt kovů ve formě volných iontů, ale také jako vázané na organické ligandy různé velikosti. Větší část kovů byla povětšinou nalezena ve filtrátu, tedy ve formě, pro kterou je daný filtr s NMWCO 3 nebo 10 kDa propustný. Pouze u mědi a železa ve vzorcích celého burčáku to bylo naopak.

Přes 50 % vanadu ze vzorku č. 10 bylo nalezeno ve filtrátu, 40 % v nepřefiltrované frakci. U všech kovů uvedených v tabulce XVII bylo asi 70 % jejich celkového obsahu ve vzorku kapalného podílu burčáku č. 9 obsaženo ve frakci <10 kDa, u stroncia to bylo 60 %. Šedesátí procentům odpovídal také obsah většiny kovů v přefiltrované frakci vzorku č. 3, s výjimkou železa, kterého bylo okolo 60 % obsaženo naopak ve frakci > 10 kDa. Obsah mědi v této nepřefiltrované frakci byl okolo 40 %, stejně jako v případě vzorku druhého celého burčáku, který byl však filtrován přes filtr s NMWCO 3 kDa. Koncentrace v obou frakcích byly u tohoto vzorku srovnatelné. Ve vzorku kapalného podílu burčáku č. 6 bylo v přefiltrované frakci asi o 10–20 % více jednotlivých kovů než v nepřefiltrované části. Pouze u železa si byly obsahy blízké.

72,47 % olova obsaženého ve vzorku burčáku č. 3 bylo ve frakci > 10 kDa. Mohlo by se jednat mimo jiné o olovo navázané na dimer pektického polysacharidu rhamnogalakturonanu II (dRG-II), který byl identifikován týmem francouzských vědců jako ligand primárně zodpovědný za komplexaci olova ve víně. [49] Ze vzorku vína však bylo 84,63 % olova ve filtrátu a pouze 12,16 % ve frakci molekul větších než 3 kDa. Roli v tom mohl hrát použitý filtr, protože ve víně byly zachyceny všechny uvedené kovy pouze z cca 11–15 %. I zinek byl z 90,50 % obsažen ve filtrátu vína.

Podle výsledků I. Karadjové byla asi polovina mědi ve víně přítomna ve formě labilních specií. [52] V našem případě se do filtrátu dostalo 30–70 % celkového obsahu mědi v závislosti na typu vzorku a použitém filtru.

## 5 Závěr

Metodami AAS a ICP-MS byl stanovován obsah vybraných prvků v šestnácti vzorcích vína a deseti vzorcích burčáku. Pro přípravu vzorků byl použit mokrý rozklad v uzavřeném systému s využitím mikrovlnného záření, který se na základě informací uvedených v literatuře pro tento typ vzorků jeví jako nejvhodnější. U obou metod byla provedena validace.

Atomovou absorpční spektrometrií byl stanoven obsah Na, Mg, Fe a Zn. Ukázalo se, že AAS poskytuje pro železo o něco vyšší výsledky než ICP-MS. Díky schopnosti ICP-MS dosahovat obecně nižších mezí detekce než AAS, byly koncentrace zinku a železa pomocí ICP-MS stanoveny ve více vzorcích, než umožnila atomová absorpční spektrometrie. Ani meze detekce dosažené ICP-MS však nebyly tak nízké, jak se očekávalo. Přesto, že draslík a vápník jsou hojně zmiňovány v literatuře a jejich význam ve víně, jak z hlediska kvality vstupní suroviny, procesu fermentace, tak i výsledného produktu, je nezpochybnitelný, v této práci se bohužel jejich stanovení nepodařilo zvalidovat, a proto výsledky nejsou prezentovány. Do budoucna by bylo vhodné se na tyto dva prvky zaměřit.

Obsah potenciálně toxických kovů nebyl ve víně ani v burčáku nijak vysoký a u olova nepřekročil legislativní limit  $0,1\text{--}0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (dle roku slizně) definovaný Evropskou unií. Nejzastoupenějšími kovy byly Na, Mg, Mn, Fe, Cu, Rb a Sr, v řádu jednotek  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  byl v některých vzorcích přítomen také hliník a zinek. Naopak nikl, arsen, molybden a kadmium se v žádném ze vzorků nevyskytovaly v koncentracích vyšších, než byla hodnota meze stanovitelnosti. Burčák obsahoval více mědi než víno, což je v souladu s dřívějším pozorováním chování mědi během výrobního procesu vína jinými autory.

Srovnání jednotlivých ročníků vín v rámci čtyřech analyzovaných odrůd umožnilo sledovat, jak se obsah kovů v čase mění. Tyto trendy jsou v každé odrůdě jiné, pro některé prvky však mohou být ve vybraných odrůdách společné. Například koncentrace sodíku měla ve třech ze čtyřech analyzovaných odrůd klesající tendenci. Nejvyšší koncentrace rubidia byly nalezeny v odrůdě Dornfelder, kde jeho koncentrace směrem od starších ročníků k mladším rostla. U vzorků z roku 2023 narostl ve všech odrůdách obsah hořčíku. Vliv na koncentraci kovů ve víně může mít řada faktorů od podmínek pěstování vinné révy přes výrobní procesy až po skladování.

Vzorky burčáku byly také podrobeny rozdělení na frakce několika způsoby. Srovnání pevného a kapalného podílu u všech analyzovaných burčáků ukázalo, že většina prvků se vyskytuje převážně v kapalné části burčáku, například hliník ale

převažuje v pevném podílu. Výsledky železa a mědi byly nejednoznačné, lišily se u jednotlivých vzorků. Z analýzy frakcí získaných pomocí centrifugačních filtrů s NMWCO 3 a 10 kDa však bylo zjištěno, že ve vzorcích celého burčáku měď a železo převažují spíše v nepřefiltrované frakci.

Z uvedené analýzy frakcí nelze dělat jednoznačné závěry, zdá se však, že měď a železo vykazují jiné chování než další prvky a mohou se vyskytovat ve větší míře v pevných částech burčáku nebo navázané na větší organické molekuly. Jejich chování je však odlišné v různých vzorcích a zasloužilo by si další prostudování.

## 6 Seznam použité literatury

- [1] K. Pyrzynska, Chemical speciation and fractionation of metals in wine, *Chemical Speciation and Bioavailability* 19 (2007) 1–8.
- [2] B. Tariba, Metals in Wine—Impact on Wine Quality and Health Outcomes, *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (2011) 143–156.
- [3] OIV, International Code of Oenological Practices.  
<https://www.oiv.int/standards/international-code-of-oenological-practices/part-definitions/wines/basic-definition>, staženo 2. dubna 2024.
- [4] Vyhláška č. 88/2017 Sb.: Vyhláška o provedení některých ustanovení zákona o vinohradnictví a vinařství, březen 2017.
- [5] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007, prosinec 2013.
- [6] Vyhláška č. 254/2010 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví seznam vinařských podoblastí, vinařských obcí a viničních tratí, srpen 2010.
- [7] R. S. Jackson, *Wine Science: Principles and Applications*, third ed., Academic Press, London 2008.
- [8] R. B. Boulton et al., *Principles and Practices of Winemaking*, Springer Science+Business Media, New York 1999.
- [9] Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2019/934 ze dne 12. března 2019, kterým se doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013, pokud jde o vinařské oblasti, kde lze zvýšit obsah alkoholu, povolené enologické postupy a omezení týkající se výroby a ošetření výrobků z révy vinné, minimální procentní podíl alkoholu pro vedlejší výrobky a jejich likvidaci a zveřejnění složek OIV, březen 2019.
- [10] Zákon č. 321/2004 Sb.: Zákon o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství), duben 2004.
- [11] P. Kment, M. Mihaljevič, V. Ettler, O. Šebek, L. Strnad, L. Rohlová, Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil, *Food Chemistry* 91 (2005) 157–165.

- [12] C. Cabrera-Vique, P. L. Teissedre, M. T. Cabanis, J. C. Cabanis, Determination and Levels of Chromium in French Wine and Grapes by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1808–1811.
- [13] A. J. McKinnon, G. R. Scollary, Size fractionation of metals in wine using ultrafiltration, *Talanta* 44 (1997) 1649-1658.
- [14] Nařízení Komise (EU) 2023/915 ze dne 25. dubna 2023 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách a o zrušení nařízení (ES) č. 1881/2006, duben 2023.
- [15] Kolektiv autorů pod vedením V. Kanického, J. Kučery a V. Tomáška, *Analýza anorganických látek*, 1. vydání (dotisk 2023), 2 THETA, Český Těšín 2021.
- [16] É. M. M. Flores (ed.), *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*, Elsevier, Amsterdam 2014.
- [17] K. Záruba, *Analytická chemie: 2. díl*, 1. vydání (dotisk 2019), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2016.
- [18] S. M. Nelms (ed.), *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford 2005.
- [19] J. Płotka-Wasyłka, M. Frankowski, V. Simeonov, Z. Polkowska, J. Namieśnik, Determination of Metals Content in Wine Samples by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry, *Molecules* 23(11) (2018) 2886–2896.
- [20] Ž. Fiket, N. Mikac, G. Kniewald, Arsenic and other trace elements in wines of eastern Croatia, *Food Chemistry* 126 (2011) 941-947.
- [21] S. Santos, N. Lapa, A. Alves, J. Morais, B. Mendes, Analytical methods and validation for determining trace elements in red wines, *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 48 (2013) 364–375.
- [22] M. C. P. Dutra, L. L. Rodrigues, D. Oliviera, G. E. Pereira, M. S. Lima, Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of method for determination of Cu, Fe and Mn, *Food Chemistry* 269 (2018) 157–165.
- [23] E. K. Kwegyir, Speciation of Lead and Copper Contents in Non-Alcoholic Wines From Marina Distribution Co. Ltd, Accra, Ghana, *Nat. Prod. Chem. Res.* 3(1) (2015).

- [24] S. Catarino, A. S. Curvelo-Garcia, R. Bruno de Sousa, Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A comparison of two calibration approaches, *Talanta* 70 (2006) 1073–1080.
- [25] A. Dehelean, C. Voica, Determination of lead and strontium isotope ratios in wines by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Rom. Journ. Phys.* 57 (2012) 1194–1203.
- [26] I. Tescione, M. Casalini, S. Marchionni, E. Braschi, M. Mattei, S. Conticelli, Conservation of  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  During Wine-Making of White Wines: A Geochemical Fingerprint of Geographical Provenance and Quality Production, *Front. Environ. Sci.* 8 (2020).
- [27] A. González, S. Armenta, A. Pastor, M. Guardia, Searching the Most Appropriate Sample Pretreatment for the Elemental Analysis of Wines by Inductively Coupled Plasma-Based Techniques, *J. Agric. Food Chem.* 56(13) 2008 4943–4954.
- [28] S. M. Rodrigues, M. Otero, A. A. Alves, J. Coimbra, M. A. Coimbra, E. Pereira, A. C. Duarte, Elemental analysis for categorization of wines and authentication of their certified brand of origin, *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 548–562.
- [29] K. Pasvanka, M. Kostakis, M. Tarapoulouzi, P. Nisianakis, N. S. Thomaidis, Ch. Proestos, ICP–MS Analysis of Multi-Elemental Profile of Greek Wines and Their Classification According to Variety, Area and Year of Production, *Separations* 8(8) (2021) 119–137.
- [30] R. Cellier, S. Bérail, E. Epova, J. Barre, F. Claverie, et al., The stability of major and trace element concentrations from musts to Champagne during the production process, *OENO One* 56(1) (2022) 29–40.
- [31] Y. Vystavna, L. Zaichenko, N. Klimenko, R. Rätsep, Trace metals transfer during vine cultivation and winemaking processes, *Sci. Food Agric.* 97 (2017) 4520–4525.
- [32] S. Catarino, J. L. Capelo, A. S. Curvelo-Garcia, R. B. Sousa, Evaluation of contaminant elements in Portuguese wines and original musts by high intensity focused ultrasound combined with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Int. Sci. Vigne Vin* 40 (2006) 91–101.

- [33] A. Bimpilas, D. Tsimogiannis, K. Balta-Brouma, T. Lymperopoulou, V. Oreopoulou, Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage, *Food Chemistry* 178 (2015) 164–171.
- [34] J. Kristl, M. Veber, M. Slekovec, The contents of Cu, Mn, Zn, Cd, Cr and Pb at different stages of the winemaking process, *Acta Chim. Slov.* 50 (2003) 123–136.
- [35] E. C. Rossano, Z. Szilágyi, A. Malorni, G. Pocsfalv, Influence of Winemaking Practices on the Concentration of Rare Earth Elements in White Wines Studied by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 311–317.
- [36] Z. Temerdashev, A. Abakumov, M. Bolshov, A. Khalafyan, N. Ageeva, A. Vasilyev, A. Ramazanov, Instrumental assessment of the formation of the elemental composition of wines with various bentonite clays, *Microchemical Journal* 175 (2022) 107145.
- [37] P. Paneque, M. T. Álvarez-Sotomayor, A. Clavijo, I. A. Gómez, Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing, *Microchemical Journal* 94 (2010) 175–179.
- [38] H. Hopfer, J. Nelson, T. S. Collins, H. Heymann, S. E. Ebeler, How Trace Elemental Analysis Provides Important Insight into Wine Chemistry, *Spectroscopy* 29(9) 2014.
- [39] M. Z. Bekker, M. P. Day, P. A. Smith, Changes in Metal Ion Concentrations in a Chardonnay Wine Related to Oxygen Exposure during Vinification, *Molecules* 24 (2019) 1523–1542.
- [40] M. M. Castiñeira, R. Brandt, N. Jakubowski, J. T. Andersson, Changes of the Metal Composition in German White Wines through the Winemaking Process. A Study of 63 Elements by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 52(10) (2004) 2953–2961.
- [41] A. Bica, R. Sánchez, J. L. Todolí, Evolution of the Multielemental Content along the Red Wine Production Process from Tempranillo and Grenache Grape Varieties, *Molecules* 25(13) (2020) 2961–2978.
- [42] C. M. R. Almeida, M. T. S. D. Vasconcelos, Lead Contamination in Portuguese Red Wines from the Douro Region: from the Vineyard to the Final Product, *J. Agric. Food Chem.* 51(10) (2003) 3012–3023.



- [43] H. M. Charnock, G. Cairns, G. J. Pickering, B. S. Kemp, Production Method and Wine Style Influence Metal Profiles in Sparkling Wines, *Am. J. Enol. Vitic.* 73 (2022) 170–182.
- [44] C. K. Tanabe, J. Nelson, S. E. Ebeler, Current Perspective on Arsenic in Wines: Analysis, Speciation, and Changes in Composition during Production, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 4154–4159.
- [45] C. M. Moreira, F. A. Duarte, J. Lebherz, D. Pozebon, E. M.M. Flores, V. L. Dressler, Arsenic speciation in white wine by LC–ICP–MS, *Food Chemistry* 126 (2011) 1406-1411.
- [46] M. Ch. Fontanellaa, R. D’Amato, L. Regni, P. Proietti, G. M. Beonea, D. Businelli, Selenium speciation profiles in biofortified sangiovese wine, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 43 (2017) 87–92.
- [47] Q. Liu, Determination of inorganic selenium species in commercial wine collected from the Beijing region, China, *Chemical Speciation & Bioavailability* 22(2) (2010) 81-85.
- [48] K. Karaś, A. Ziola-Frankowska, M. Frankowski, Chemical Speciation of Aluminum in Wine by LC–ICP–MS, *Molecules* 25 (2020) 1069–1083.
- [49] J. Szpunar, P. Pellerin, A. Makarov, T. Doco, P. Williams, B. Medina, R. Łobin’ski, Speciation analysis for biomolecular complexes of lead in wine by size-exclusion high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 749–754.
- [50] J. Y. Liu, G. B. Jiang, Survey on the Presence of Butyltin Compounds in Chinese Alcoholic Beverages, Determined by Using Headspace Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography–Flame Photometric Detection, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6683–6687.
- [51] V. Vacchina, J. Ch. Turlot, J. Malherbe, B. Médina, O. F. X. Donard, F. Séby, Potential of Arsenic speciation for geographical origin discrimination of red wines, 2nd IMEKOFOODS Promoting Objective and Measurable Food Quality & Safety, Benevento (Italy), October 2nd-5th 2016.
- [52] I. Karadjova, B. Izgi, S. Gucer, Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 57 (2002) 581–590.

- [53] E.K. Paleologos, D.L. Giokas, S.M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, Micelle mediated methodology for the determination of free and bound iron in wines by flame atomic absorption spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 458 (2002) 241–248.
- [54] E. Drioli, C. A. Quist-Jensen, L. Giorno, Molecular Weight Cutoff – heslo v příručce: E. Drioli, L. Giorno, *Encyclopedia of Membranes*, Springer Berlin, Heidelberg 2016.