

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Analýza fenolických látek v destilátech

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Natálie Macháňová
Studijní obor:	Analytická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	5. 6. 2020

Olomouc 2020

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

Bc. Natálie Macháňová

Poděkování:

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Petru Bartákovi za odborné vedení, ochotu, cenné rady a trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině, příteli a přátelům za podporu a trpělivost po celou dobu studia.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2019_028 a IGA_PrF_2020_030).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Natálie Macháňová

Název práce: Analýza fenolických látek v destilátech

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Anotace:

Tato diplomová práce se zabývá stanovením fenolických látek v destilátech. V teoretické části se zabývá stručnou charakterizací alkoholických nápojů se zaměřením na whisky. Dále se zabývá fenoly a jejich zdrojem původu ve whisky. Experimentální část je zaměřena na stanovení bromfenolů ve skotské whisky z ostrova Islay. Fenoly byly derivatizovány anhydridem kyseliny octové a extrahovány hexanem. Následně byly analyzovány plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). V této práci byly optimalizovány kroky derivatizace a parametry analýzy. Kvantifikace byla provedena metodou vnitřního standardu a metodou standardního přídávku. Ve vzorcích whisky byly nalezeny koncentrace bromfenolů v desítkách až stovkách ng/L, v případě 2-bromfenolu až v tisících ng/L.

Klíčová slova: Fenoly, bromfenoly, whisky, Islay, acetylace, GC/MS

Počet stran: 59

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Natálie Macháňová

Title: Analysis of phenolic compounds in spirits

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Annotation:

The main theme of this diploma's thesis is analysis of phenolic compounds in spirits. The theoretical part deals with a brief characterization of alcoholic beverages with a focus on whiskey. It also deals with phenols and their source of origin in whiskey. The experimental part is focused on the determination of bromophenols in Scotch whiskey from the island of Islay. Phenols have been derivatised by acetic anhydride and extracted using hexane. Consequently, the extracts have been analysed using gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). Derivatisation steps and parameters of analysis were optimised in this thesis. The internal standard method and method of standard additions were used for a quantification. The concentration of bromophenols was found in tens to hundreds of ng/L and in case of 2-bromophenol in even up to thousands of ng/L in the whiskey sample.

Keywords: Phenols, bromophenols, whiskey, Islay, acetylation, GC/MS

Number of pages: 59

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD	- 8 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
2.1	Alkoholické nápoje	- 9 -
2.2	Whisky	- 11 -
2.2.1	Historie.....	- 12 -
2.2.2	Výroba	- 12 -
2.2.3	Padělání.....	- 13 -
2.2.4	Dělení whisky	- 13 -
2.2.4.1	Skotská whisky	- 13 -
2.2.4.2	Irská whiskey	- 14 -
2.2.4.3	Americká whiskey	- 14 -
2.2.4.4	Kanadská whisky	- 14 -
2.3	Fenoly.....	- 15 -
2.3.1	Fenoly ze zrání v sudech.....	- 15 -
2.3.1.1	Výběr dřeva	- 16 -
2.3.1.2	Sudy.....	- 18 -
2.3.1.3	Modifikace zrání.....	- 20 -
2.3.2	Fenoly z rašeliny	- 21 -
2.3.3	Fenoly z mořské vody	- 22 -
2.3.3.1	Bromfenoly v potravinách	- 23 -
2.3.3.2	Zdroj 2,6-dibromfenolu u australských krevet	- 24 -
2.4	Stanovení fenolických látek	- 24 -
2.4.1	Spektrofotometrické metody	- 25 -
2.4.2	Separační metody	- 26 -
2.4.2.1	Plynová chromatografie.....	- 26 -
2.4.2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	- 27 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 29 -
3.1	Použité chemikálie	- 29 -
3.2	Seznam vzorků	- 30 -
3.3	Přístrojové vybavení.....	- 30 -
3.4	Pracovní postup	- 31 -
3.5	Analýza GC/MS	- 32 -

4	VÝSLEDKY A DISKUZE	- 34 -
4.1	Derivatizace.....	- 39 -
4.1.1	Vliv teploty na derivatizaci.....	- 40 -
4.1.2	Vliv času na derivatizaci.....	- 40 -
4.2	Optimalizace podmínek pro chromatografickou analýzu	- 41 -
4.2.1	Optimalizace nástřiku	- 41 -
4.2.2	Optimalizace teplotního programu	- 44 -
4.2.3	Optimalizace objemu extrakčního činidla	- 46 -
4.2.4	Optimalizace slepých pokusů	- 47 -
4.3	Opakovatelnost.....	- 48 -
4.4	Potvrzení identity 2-bromfenolu	- 49 -
4.4.1	Acetylace	- 49 -
4.4.2	Vzorek bez derivatizace.....	- 50 -
4.4.3	Silylace.....	- 52 -
4.5	Kvantitativní vyhodnocení	- 53 -
4.5.1	Kvantitativní vyhodnocení pomocí metody vnitřního standardu	- 53 -
4.5.2	Kvantitativní vyhodnocení metodou standardního přídatku.....	- 54 -
4.6	Kvantitativní vyhodnocení reálných vzorků	- 54 -
5	ZÁVĚR.....	- 56 -
6	LITERATURA	- 57 -

1 ÚVOD

Fenoly představují důležitou součást vůně potravin a alkoholických nápojů. Zejména uzené výrobky jsou bohaté na fenoly. Fenoly v alkoholických nápojích byly nalezeny v pivu, vínu a také ve vyzrálých destilátech. [1] V potravinách mohou fenoly přispívat k hořkosti, svíravosti, barvě, chuti, zápachu a oxidační stabilitě výrobku. [2] Předpokládá se, že kouřové aroma, které se vyskytuje ve skotské whisky pochází alespoň částečně z fenolických sloučenin. [1]

Těkavé fenoly se pozitivně podílejí na závěrečném aroma whisky v různém rozsahu. Odpovědné sloučeniny jsou z velké části odvozeny z rašelinového kouře používaného při sušení sladu a jsou extrahovány z dubového dřeva během zrání. [3]

Cílem této kvalifikační práce je analýza fenolických látek v destilátech. Ve vzorcích whisky byla identifikována celá řada majoritních fenolických látek ze dřeva a minoritních bromovaných fenolů. Bromfenoly se vyskytují v daleko menších koncentracích, ale více se projevují na vůni/zápachu whisky. Proto se tato práce zaměřuje na stanovení bromovaných fenolů. Konkrétně je práce zaměřena na stanovení bromfenolů ve skotské whisky z ostrova Islay. Bromfenoly byly derivatizovány a následně byly analyzovány plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií (GC/MS).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Alkoholické nápoje

Zjednodušeně se alkoholické nápoje dělí na vína, ovocná vína, ostatní vína a medoviny, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje. Lihoviny se rozdělují podle obsahu ethanolu do dvou skupin: destilované lihoviny a likéry. [4] Destilované lihoviny mají mezi 30 - 75 obj. % alkoholu a jsou vyráběny destilací fermentovaných produktů. [5] Likéry jsou lihoviny s minimálním obsahem ethanolu 15 obj. % a minimálním obsahem cukru 100 g/l (u některých likérů 70 g/l). Likéry jsou vyráběny aromatizací ethanolu získaného destilací zemědělských plodin. [4]

Dělení destilovaných lihovin:

Ovocné destiláty

Destilované lihoviny z ovoce jsou lihoviny, které jsou označovány názvem ovoce například švestkové destiláty. Tyto destilované lihoviny se vyrábí kvašením a destilací čerstvého ovoce, respektive jejich moštů. Ve většině případů se jedná o lihoviny s charakteristikou vůní destilátů. Mezi nejčastěji používané ovoce patří švestky, třešně, meruňky, hrušky a jablka. [4]

Ovocné pálenky se obecně dvakrát destilují na přibližně 70 obj % alkoholu a nezrají v sudech. Proto se ve většině případů jedná o čiré destiláty. Jednou z výjimek je pálenka z jablek tzv. Calvados, kde konečný destilát zraje ve starém dubovém sudu po dobu minimálně dvou let. [6]

Vodka

Vodka je dominantní lihovina v Rusku, Finsku, Polsku, Švédsku a dalších východoevropských zemích. [4] Tradičně se vyrábí z nejlevnějšího zdroje škrobu obvykle z obilí, brambor a řepné melasy. [6] Žito a pšenice jsou hlavními surovinami vodky. Většina nejlepších ruských vodek se vyrábí z pšenice, zatímco v Polsku se většinou destiluje z žitného kvasu. [4] Zdroj není důležitý, protože fermentovaná báze se destiluje, aby se odstranila většina aromatických látek a zbytek se odstraní filtrací práškovým uhlím, aby vznikla neutrální chuť. [6] V podstatě čistá směs alkoholu a vody se pak ředí vodou na požadovanou sílu minimálně 37,5 obj % alkoholu. Vodka se nevkládá do dřevěných sudů a nezraje dlouhou dobu. Lze ji však ochutit nebo zbarvit (ovocem, kořením a bylinami). [4]

Gin

Existují dva hlavní styly destilovaného ginu, anglický a holandský, stejně jako levnější gin, který nelze označit za destilovaný, protože jeho příchutě se přidávají do neutrálního alkoholu. Tradiční nizozemská metoda produkce je destilovat fermentovanou směs sladu, kukuřice a žita dvakrát nebo třikrát v destilačních nádobách. Pak se destilát destiluje naposledy, a to na minimálně 37,5 obj. % alkoholu spolu s jalovcovými bobulemi, dalším kořením a bylinkami. Anglický neboli suchý gin začíná 96 % alkoholem vyrobeným z obilí či melasy. Tato kapalina se pak ředí vodou a redestiluje se v hrnci s jalovcem. Destilát se ředí před plněním na 37,5 až 47 obj % alkoholu.

Jalovec je vyžadován pro produkt, který se nazývá gin. Většina ginu také obsahuje koriandr a citrusovou kůru. Primární aromata v ginu pocházejí z terpenových aromatických látek v koření a bylinkách zejména tóny z borovice, citrusů, květin a dřeva. [6]

Tequila

Typická mexická destilovaná pálenka tequila se vyrábí destilací zkvašené šťávy z agáve. Ta může být vyrobena pouze z jednoho druhu agáve (agáve modrá) a to pouze ve specificky určených oblastech především ve státě Jalisco. Nejvyšší kvalita tequila je vyrobena z agávéové šťávy smíchané pouze s trochou vody. Výsledný destilát je čirý. Barva v tequile pochází nejvíce z přidání karamelu nebo ze stárnutí v sudu. [4]

Rum

Rum je chutná lihovina, která se tradičně vyrábí v zemích Karibiku a Střední Ameriky. Pochází především z fermentace a destilace cukrové melasy. Jakmile je alkohol získán fermentačním a destilačním procesem, prochází dalším zpracováním, jako je perkolace přes uhlíkové filtry, zrání v dubových sudech a míchání, které dodávají rumu jeho charakteristickou chuť.

Obecně lze rumy rozdělit do dvou tříd podle barvy i chuti. Bílé (rumy se filtrují, aby se odstranila jakákoli barva získaná během zrání) a tmavé nebo zrající rumy. Ačkoliv obě třídy reprezentují rumovou chuť, tak vyzrálé rumy mají bezpochybně nejvyváženější rumovou chuť.

Podobně jako u jiných destilovaných lihovin se rum organolepticky vyznačuje obsahem mnoha těkavých sloučenin jako jsou vyšší alkoholy, estery, karboxylové kyseliny, karbonylové sloučeniny, fenoly a furanové deriváty, které mimo jiné přispívají ke zvláštní chuti lihoviny. [7]

Brandy

Brandy jsou destiláty destilované z hroznového vína. Dva klasické druhy brandy jsou koňak a armaňak. Oba jsou vyrobeny z bílých hroznů hlavně z odrůdy Ugly blanc. Koňak je produkován kvasinkovou fermentací hroznů a je dvakrát destilován na obsah alkoholu 70 obj. %. Armaňak je fermentován bez přídavku kvasinek a je jednou destilován na obsah alkoholu 52 až 65 %. Každý pak zraje v nových francouzských dubových sudech minimálně půl roku. Před stáčením se zředí na 40 obj. % alkoholu a může být upraven cukrem, dubovým extraktem a karamellem. [6]

2.2 Whisky

Obecně je whisky považována za luxusní potravinářský výrobek vysoké kvality, a to částečně díky tradičnímu způsobu destilace a prodloužené době výroby a zrání. [8] Whisky je jedním z nejoblíbenějších destilátů vyrobených z obilovin. [9] Existuje několik základních druhů whisky. Mezi nejznámější druhy patří Skotská, Irská a Americká whisky. V Kanadě, Skotsku a Walesu se používá termín whisky. Zatímco ve Spojených státech a Irsku je to whiskey.

Evropská definice pro whisky stanovuje, že whisky je lihovina vyráběna výhradně destilací rmutu vyrobeného ze sladových obilovin. Provádí se jedna nebo více destilací na méně než 94,8 % objemových, takže destilát má chuť a aroma od použitých surovin. Poté destilát zraje po dobu nejméně tří let v dřevěných sudech nepřesahujících 700 litrů. Do konečného destilátu smí být přidána pouze voda a karamel. Karamel se přidává pro vybarvení whisky. Minimální obsah alkoholu ve whisky je 40 %. Whisky nesmí být slazeny ani obarveny žádnými aditivy jen již zmíněným karamellem. [9, 10]

Proces zrání známý jako stárnutí nebo zjemňování po dobu minimálně 3 let zásadně ovlivňuje chuťový profil whisky. [11] Během procesu stárnutí získá pálenka velmi charakteristickou chuť, která se výrazně liší od původního čerstvého destilátu. [12] Tyto senzorické úpravy jsou velmi ovlivněny původem a druhem dřeva, tepelným zpracováním dřeva a dobou stárnutí.

Vztah mezi koncentracemi polyfenolových složek ve whisky a dobou stárnutí v dubových sudech je složitější než u koňaků. To je spojeno jak se složením dubového dřeva, tak se skutečností, že stárnutí lze provádět v nových, starých, opálených a neopálených sudech. [13]

Těživé fenolické látky jako je kresol a guajakol, které se tvoří v praženém ječmenu jsou odpovědné za specifickou chuť whisky. Ale také laktony se výrazně podílí na vůni a chuti whisky. Právě whisky lakton je odpovědný za sladké a mastné aroma ve whisky. [10]

2.2.1 Historie

Whisky údajně pochází z Irska, kde místní mniši produkovali destilovaný alkohol známý v latině jako aqua vitae v sedmém století. Byla to směs získaná z fermentovaného ovoce a byla používána pouze pro léčebné účely. V 17. století se začalo používat zkrácené jméno uiskie, zatímco v roce 1715 bylo jméno změněno na whiskie. Dnešní jméno whisky bylo založeno v roce 1736. [10]

V devátém století irští mniši a jejich léčivý alkohol dosáhl do Skotska. Informace o vodě života z ječmene se objevila v polovině 16.století. Na přelomu 18. století britský parlament zdanil výrobu whisky, což vedlo ke snížení legální výroby a samozřejmě ke zvýšení nezákonné výroby. Tyto okolnosti stimulovaly vývoj různých druhů whisky vyráběných malými maskovanými lihovary a používání tradičních receptů předávaných skotskými klany. [10]

V důsledku toho dnes existují tři typy whisky-směsná, obilná a sladová whisky. Míchaná whisky je vyráběna smícháním obilné whisky s whisky sladovou. Tato whisky je reprezentována značkami jako Johnnie Walker nebo Ballantine's. Obilná whisky je vyrobena z rmutu skládajícího se z různého obilí většinou ječmene, pšenice a kukuřice. Vyrábí se kontinuální destilací v koloně. Jediným rozdílem mezi obilnou whisky a vodkou je fakt, že whisky musí zrát po dobu 3 let v dubovém sudu. Sladová whisky je vyrobena ze sladového ječmene. Destilace se provádí v měděných kotlích a následuje zrání v dubových sudech obvykle po dobu více než 8 let. Sladové whisky lze rozdělit do dvou skupin: jednosladovou whisky (pocházející z jednoho lihovaru) a míchanou sladovou whisky (směs jednosladové whisky pocházející z různých palíren). [10, 11]

2.2.2 Výroba

Obiloviny (obecně pšenice) se vaří za vysokých teplotních podmínek, aby se z obilí uvolnil škrob a přešel do roztoku. Tento proces se provádí proto, aby mohl být škrob účinně rozložen enzymy ze sladu ječmene na fermentační cukry. Tyto cukry jsou během fermentace přeměněny kvasinkami na alkohol a alkohol se následně odděluje kontinuální destilací. [14]

V počátečních fázích výroby sladové whisky není horkovodní extrakt sladu vařen tak jak je v pivovaru. Tímto způsobem se během kvašení udržuje aktivita rozpustných enzymů ze sladu, aby se maximalizoval výnos alkoholu. V důsledku toho se do kvašení dostanou bakterie ze sladu, které dokáží přežít rmutování (62 až 63 °C po dobu alespoň 30 minut). Bakterie mléčného kvašení dominují bakteriální flóře fermentace kvůli jejich tepelné toleranci a schopnosti metabolizovat a množit se při nízkém pH a anaerobních podmínkách fermentace. Přítomnost těchto bakterií může ovlivnit kvasinkovou fermentaci různými způsoby. Pokud do fermentace vstoupí velké množství bakterií, soutěží o živiny s kvasinkovými buňkami, snižují růst kvasinek a výnos ethanolu. V dobře zvládnutém lihovaru však bakterie kyseliny mléčné kvetou až v pozdějších fázích kvašení, kdy kvasinky vyčerpaly dostupné živiny a jsou ve stacionární fázi. Má se za to, že tato pozdní mléčná kvašení pozitivně přispívají k chuti whisky. [3, 15]

2.2.3 Padělání

Whisky patří do segmentu alkoholických nápojů s vysokou přidanou hodnotou, který je náchylný k padělání a jiným manipulacím zaměřených na napodobování či kopírování autentické whisky. Prokázání původu a pravosti je hlavním zájmem pro lihovary, prodejce a spotřebitele pravé whisky po celém světě. Proto byly učiněny pokusy o vypracování norem a metod kontroly kvality, prokázání původu a pravosti. [8]

Jako ukazatel pravosti skotské whisky byla navržena analýza mědi a dalších stopových prvků, zatímco distribuce methyl rozvětvených alkoholů odlišuje irskou whisky od jiných variant. [8]

2.2.4 Dělení whisky

2.2.4.1 Skotská whisky

Skotská whisky je nejoblíbenějším typem whisky. Vyrábí se zcela ze sladového ječmene dvojitou destilací ve velkém měděném kotli. [10] Ve Skotsku se whisky vyrábí pouze z obilovin, kvasinek a vody. [9] Existují tři druhy skotské whisky: sladová whisky, obilná whisky a míchaná. Sladová skotská whisky je fermentována ze sladového ječmene. Obilná skotská whisky se fermentuje z kaše obsahující jiné nesladové vařené obiloviny (žito, pšenici nebo kukuřici) a menší podíl sladového ječmene. Obilná whisky je proto méně nákladná, ale i méně aromatická. [6] Třetí a nejčastější druh je whisky míchaná tedy směs sladové a obilné whisky, přičemž obilná whisky tvoří 40-70 %. Jak sladové, tak

obilné lihoviny se pak vodou zredukuje na obsah alkoholu 65 až 70 % a zraje v dubových sudech nejméně tři roky. [9] Tradičně skotské whisky dozrávají ve španělských dubových sudech, které dříve obsahovalo víno Sherry. [16] Na konci zrání se whisky buď smíchá nebo se vezme jako jeden produkt a dále se redukuje vodou do lahví na minimální obsah alkoholu 40 %. [9]

Skotská whisky vděčí za svou speciální příchut' převážně ječnému sladu. Sladové whisky ze západního pobřeží Skotska mají jedinečnou kouřovou příchut', která pochází z používání rašeliny. [6]

2.2.4.2 Irská whiskey

Většina irské whiskey se vyrábí ze směsi asi 40 % sladového ječmene a 60 % nesladového ječmene. [6] Stejně jako ve Skotsku i Irsko vyrábí sladové a obilné whiskey. [9] Irské whiskey jsou obvykle trojnásobně destilované. [13] Zatímco irští výrobci whiskey tvrdí, že jejich whisky je ve výsledku čistší, tak skotské palírny tvrdí, že jejich výrobek je dostatečně destilovaný a zachovává si svůj chuťový profil. [11] Minimální doba zrání jsou také tři roky. [9]

2.2.4.3 Americká whiskey

Typické pro americkou bourbon whiskey je vysoký obsah kukuřice mezi použitými obilovinami (>51 %), vysoký obsah alkoholu v destilátu (max. 80 % objemových) a skladování destilátu v nových, opálených dubových sudech. [9, 17] Zrání dává bourbonu hlubší barvu a intenzivnější vanilkovou vůni, než mají skotské whisky. [6]

Výrobek skladovaný po dobu nejméně dvou let se nazývá bourbonská whiskey. Bourbonská whiskey může pocházet nejen z okresu Bourbon v Kentucky, ale může také pocházet z jiných oblastí, pokud je vyrobena podle výše uvedených požadavků. [17]

2.2.4.4 Kanadská whisky

Kanadská whisky patří mezi nejmírnější a nejjemnější z lihovin vyrobených z obilí. Je to směs lehce ochucené kukuřičné whisky s malým množstvím silnější whisky. Mohou také obsahovat víno, rum a brandy, a to až do 9 % směsi, Zraje minimálně 3 roky v použitých dubových sudech. [6]

2.3 Fenoly

Hydroxysloučeniny obsahující charakteristickou hydroxy skupinu -OH dělíme na alkoholy a fenoly. Alkoholy patří mezi hydroxyderiváty uhlovodíků, které mají hydroxylovou funkční skupinu na alifatickém řetězci. Fenoly jsou organické sloučeniny, které obsahují hydroxylovou funkční skupinu vázanou přímo na aromatický kruh. Podle počtu hydroxylových skupin se dělí na jednosytné a vícesytné. Nejjednodušším zástupcem je fenol C_6H_5OH . Je to bezbarvá nebo bílá krystalická látka, která má charakteristický zápach. Použití fenolu je například při desinfekci předmětů, výrobě barviv a léčiv. [18]

2.3.1 Fenoly ze zrání v sudech

Whisky obsahují velké množství aromatických látek, které patří do různých chemických skupin jako jsou vyšší alkoholy, ethyl a isoamylestery, acetáty, mastné kyseliny, ketony, monoterpeny a fenoly. Tyto sloučeniny mohou být přítomny v široké škále koncentrací od ng/l až několik g/l. Některé z nich pocházejí ze surovin a následných procesů rmutování, fermentace, destilace a stárnutí, zatímco ostatní pocházejí z dubu. [19]

Široká škála destilovaných nápojů je známá zráním po dobu několika let v dřevěných sudech. Během zrání dochází k řadě fyzikálních a chemických interakcí mezi sudem, okolní atmosférou a zrajícím destilátem, které proměňují chuť i složení nápoje. Doba zrání je vysoce proměnlivá a je velice ovlivněna zejména použitým typem sudu. Široká škála alkoholických nápojů dnes zraje v dubových sudech, především whisky a brandy, ale také mnoho rumů a likérů. Zatímco původně sudy sloužily pro skladování a dopravu nápojů, tak dnes je doba strávená v sudu vnímaná jako zásadní parametr. Druh sudu i délka zrání se velmi liší a často jsou dány mezinárodními normami. Například americká kukuřičná whisky musí dozrávat v nových vypálených sudech. Proces zrání a stárnutí se vyznačuje změnou barvy a chuti a také snížením objemu i obsahu alkoholu. Doba potřebná ke zrání se liší podle vlastností surového destilátu, velikosti, původu dřeva a ošetření sudu. Změna chuti zrajících lihovin je způsobena změnami ve složení a koncentraci sloučenin ovlivňujících chuť a aroma. Tyto změny mohou být způsobeny:

- Přímou extrakcí sloučenin dřeva;
- Rozkladem dřevních makromolekul a extrakcí produktů do destilátu;
- Reakcemi mezi složkami dřeva a složkami surového destilátu;
- Reakcemi zahrnujícími pouze složky dřeva;
- Reakcemi týkajícími se pouze složek destilátu;
- Odpařováním těkavých sloučenin.

Charakteristikou nápojů vyzrálých v dubových sudech je přítomnost eugenolu, který poskytuje hřebíčkovou chuť a whisky lakton, který přímo souvisí s hodnocením kvality whisky. [20, 21]

2.3.1.1 Výběr dřeva

Nejvíce používané dřevo pro výrobu sudů je dřevo dubové. V dubovém dřevě bylo identifikováno několik těkavých sloučenin a jejich přínos pro chuť a aroma byla předmětem několika studií. Kromě dubu se používá kaštan, třešeň a vzácněji například jasan. Kaštanové dřevo bylo v oblasti Středozemního moře hojně používáno, a to díky jeho široké dostupnosti a nízkým nákladům. Podle studií bylo dokázáno, že vína skladovaná v třešňových sudech jsou více ovocná než vína dozrálá v dubových sudech, která jsou více aromatizována vanilkou. [22]

V Evropě je používán Dub zimní nebo dub letní. Obecně se používají směsi různých dřev. Dub bílý je dřevo charakterizované uvolňováním laktonů s vůní pryskyřice. V Evropě se používá především pro stárnoucí lihoviny. Kaštan obecný se vyznačuje vyšší pórovitostí než dub, tím lze převést do nápoje větší množství polyfenolů. Třešňové dřevo se vyznačuje vysokou pórovitostí a propustností kyslíku a obvykle se používá pro krátkou dobu stárnutí. [23]

Druh a původ použitého sudu se liší mezi alkoholickými nápoji, které v dubu zrají. Francouzské tradičně zrají v sudech vyrobených z dubu z blízkých regionů, například koňak zraje výhradně v dubu z oblasti Limousin. Americké whisky dozrávají v amerických dubových sudech, zatímco skotská whisky se přesunula od používání převážně evropských k americkým dubovým sudům. [20]

Brandy před prodejem a spotřebou zraje v dřevěných sudech. Obvykle se brandy uchovává nejprve krátkou dobu v novém sudu a poté se přemístí do sudů použitých. Během zrání v sudu dochází k mnoha změnám. V důsledku toho má konečný výrobek výraznou vůni a chuť oproti nově destilovanému lihu. Mezi nejdůležitější faktory patří druh dřeva a tepelná úprava dřeva. Nejpoužívanějším druhem dřeva je dřevo dubové a kaštanové. Například byla provedena studie Lourinhã brandy, která pochází z Portugalska. Byl proveden experiment, kdy došlo k naplnění 63 různých dřevěných sudů (7 druhu dřeva, 3 úrovně opékání, 3 replikáty). Vzorky byly odebírány po dvou, třech, čtyřech a pěti letech zrání. Výsledky ukázaly významný vliv doby zrání na několik smyslových atributů, kterými jsou například alkohol, ovocnost, vanilka, spálenina, dřevina a kouř. Intenzita

pozitivních atributů (vanilka, dřevina, kouř) se postupem času zvyšovala stejně jako celková kvalita brandy. Negativní atributy (alkohol, ovocnost) s časem klesala. Studie prokázaly pozitivní vliv kaštanového dřeva na kvalitu brandy a také období zrání pěti let v nových sudech. [24]

Pro analýzu fenolových kyselin, fenolových aldehydů a derivátu furanu v destilátech se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Mezi nejdůležitější fenolové kyseliny patří například kyselina gallová, ellagová, syringová a vanilková. Do skupiny fenolových aldehydů se řadí vanilín, syringaldehyd nebo sinapaldehyd. Fenolové kyseliny a fenolové aldehydy se do destilátu dostávají výhradně ze dřeva. Zatímco deriváty furanu (furfural nebo 5-methylfurfural) jsou dodávány ze dřeva a destilátu. [21, 25]

Je všeobecně známo, že dubové sudy zlepšují kvalitu výrobku, protože dřevo přenáší řadu aromatických látek do produktů. [26] Ze dřeva se do produktů přenáší mnoho druhů sloučenin: ellagitanniny, kumariny, laktony, polysacharidy, mastné kyseliny, terpeny, steroidy, karotenoidy a furanové sloučeniny. [17] Obzvláště významné jsou těkavé fenoly a aromatické aldehydy, protože výrobkům dodávají důležité sensorické vlastnosti.

Přesto i v neopečeném dubovém dřevě byly identifikovány stovky těkavých sloučenin například vanilín, eugenol a whisky lakton. Ostatní těkavé sloučeniny vznikají tepelným rozkladem ligninu, celulózy a hemicelulózy při opékání. Opékání může také zvýšit hladinu těch sloučenin, které se nacházejí v neopečených sudech.[26]

Struktury hlavních těkavých sloučenin identifikovaných v dubovém dřevě jsou znázorněny na obrázku 1. Eugenol a vanilín extrahovaný z dubového dřeva jsou produkty rozkladu ligninu. [26] Vanilín a eugenol se vyznačují typickými sensorickými vlastnostmi. [23] Eugenol má aroma hřebíčku a jeho koncentraci lze při opékání sudů zvýšit. [26] Vanilín, hlavní aromatická složka přírodní vanilky, je obecně považován za významného přispěvatele ke kvalitě vín a lihovin. Koncentraci vanilínu lze také zvýšit opékáním sudu. Dubové laktony (whisky lakton) patří k nejvýznamnějším z těkavých sloučenin dubu, které přispívají k chuti nápojů. Poměry benzoových/skořicových aldehydů byly stanoveny tak, aby rozlišovaly výrobky zrající v kaštanovém nebo dubovém dřevě a v opékaných nebo neopečených sudech. [23] Furan a deriváty pyranu jsou sloučeniny s příchutí karamelového aroma, které se vytváří v důsledku tepelného ošetření při výrobě sudů.

Sloučeniny jako benzaldehyd, vanilín, syringaldehyd, cinnamaldehyd, koniferylaldehyd, eugenol, methoxyeugenol, guajakol, vinylguajakol, furfural a 5-methoxyfurfural přispívají k vytváření aroma ve starších vínech a destilátech. [27]

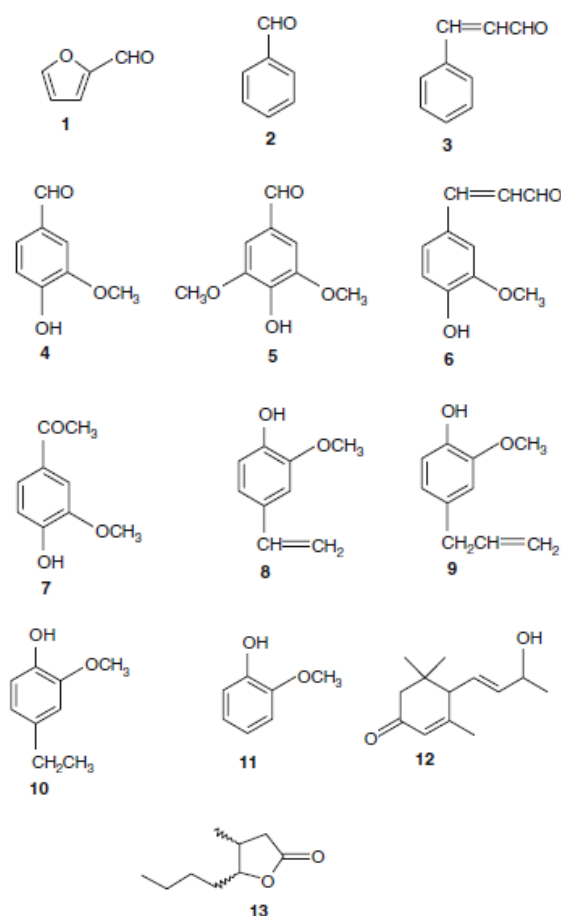


Fig. 1 Main volatile compounds identified in oak wood extract: (1) furfural, (2) benzaldehyde, (3) cinnamaldehyde, (4) vanillin, (5) syringaldehyde, (6) coniferaldehyde, (7) acetovanillone, (8) 4-vinylguaiacol, (9) eugenol, (10) 4-ethylguaiacol, (11) guaiacol, (12) 3-oxo- α -ionol, (13) *cis* and *trans* β -methyl- γ -octalactones

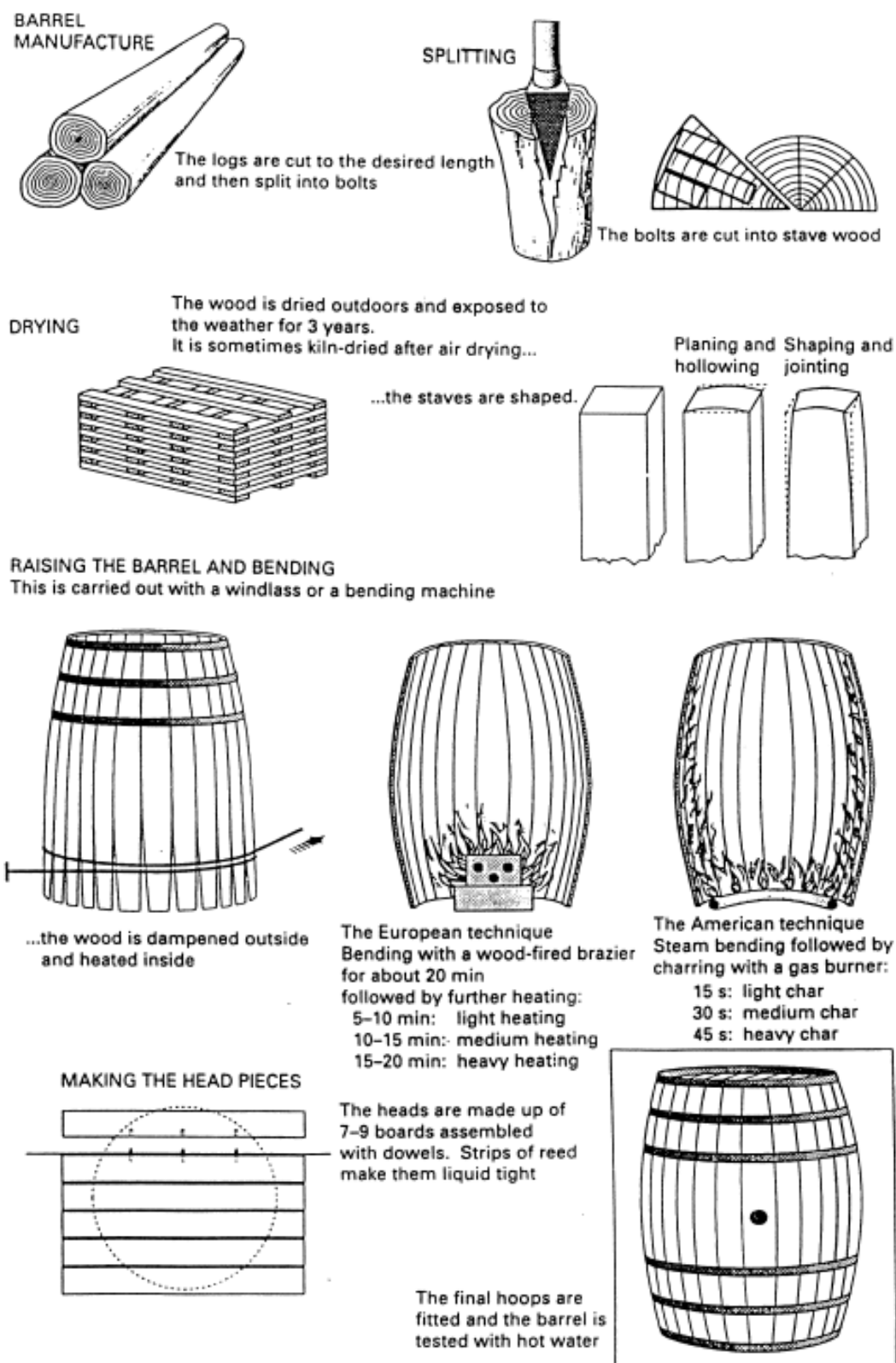
Obrázek 1: Těkavé sloučeniny identifikované v extraktu z dubového dřeva (převzato z [23])

2.3.1.2 Sudy

Výroba sudů

Způsob výroby sudu není jednotný. Mezi evropskými a americkými výrobci jsou pozorovány největší rozdíly (obrázek 2). Sušení nebo zrání dřeva je pravděpodobně jedním z nejméně srozumitelných kroků při výrobě sudů. Až do nedávna byly účinky vzduchu nebo sušení v peci brány jako málo důležité. V poslední době však přibývá důkazu, že složky dubového dřeva mohou projít značnými změnami. Důležitý vliv na vlastnosti dřeva mají procesy zahrnující ohřev sudu. Metoda ohřevu se může lišit od různých stupňů

intenzit až k intenzivnímu zuhelnatění, které používají americké společnosti při výrobě sudů určených k výrobě bourbonu nebo jiné whisky.[20]



Obrázek 2: Konstrukce sudů převzato z [20]

Použití a úprava sudů

Použité sudy uvolňují nižší koncentrace většiny extraktů a obecně vedou k mnohem delším dobám zrání, než jaké byly zjištěny z nových sudů. Avšak skotský průmysl whisky kupuje nové sudy málokdy, a závisí na opětovném použití sudů použitých ke zrání jiných alkoholických nápojů. Koňak nejprve zraje 1 - 2 roky v novém sudu, ale poté se převede do použitých sudů pro další zrání.

Průmysl výroby whisky často podrobuje použité sudy různým omlazovacím úpravám, aby zvýšil jejich vliv na zrající destilát. Může se například jednat o seškrábání opotřebované vnitřní vrstvy dřeva. [20]

2.3.1.3 Modifikace zrání

Doplňky a výtažky z dubového dřeva

Nejjednodušší metodou přidávání dřevitých sloučenin je používání dubových lupínků (dubových chipsů), které se stále častěji používají při zrání vína, ale používají se i při zrání mnoha pálenek. [26] Dubové lupínky se zejména používají při kompenzaci nízkého extraktu ve starých sudech. [20] Vyrábí se různé velikosti, které jsou následně podrobeny tepelné úpravě.

Další přísadou jsou dřevní výtažky. Dubové výtažky získané extrakcí dubových lupínků vroucí vodou, obvykle postrádají většinu těkavých složek, které odpovídají především dubovým tříslovinám. K dispozici jsou sofistikovanější výtažky, které jsou získané infuzí nebo extrakcí dubového dřeva, které bylo dříve podrobeno ošetření na podporu rozkladu molekul. Tyto výtažky (buď v kapalně formě nebo jako prášek po lyofilizaci) obsahují především fenolové sloučeniny. [20]

Úprava prostředí

Teplota a vlhkost jsou dva nejdůležitější faktory prostředí ovlivňující účinky zrání a zejména ztráty objemu a obsahu alkoholu. Ztráty koňaku se odhadují na 1-3 % ročně. Roste tendence omezovat extrémní výkyvy teplot, a to buď lepší izolací nebo vytápěním. Sklepy se však zřídka kdy udržují při konstantní teplotě, a to kvůli vysokým nákladům. Úplné kontroly podmínek zrání lze dosáhnout uložením sudu do uzavřené nádoby, v níž lze plně kontrolovat teplotu a atmosféru, ale takto extrémní metody jsou zřídka rentabilní. [20]

2.3.2 Fenoly z rašeliny

Rašelina se definuje jako světle hnědý až černý organický sediment tvořený z částečného rozkladu mechů, trav, keřů nebo stromů. [28] Chemické složení rašeliny je odvozeno od kombinace rostlin a mikroorganismů, kvality půdy a vody a sekundárních látek vytvořených během rozkladu. [29] Obecně jde o méně reaktivní strukturální prvky jako lignin a celulóza, které přispívají k pevné struktuře rašeliny.

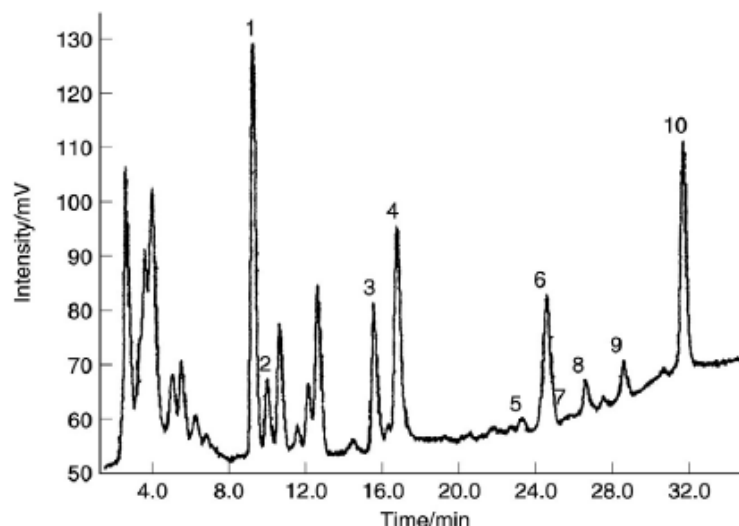
Všechna rašeliniště tvoří dvě vrstvy: akrotelm a katotelm, jejichž separace je definována hladinou vody. Akrotelm zhruba odpovídá horní aerobní vrstvě mezi 10-50 cm a katotelm představuje spodní promočenou anaerobní vrstvu. [28]

Ve Skotsku lze rašeliniště rozdělit na klimatická a místní. Klimatické bažiny jsou typické pro západní a severní Skotsko, protože jsou závislé na vydatných a pravidelných srážkách, aby zůstaly zamokřené. Tyto bažiny se typicky vyznačují mechy *Sphagnum*, suchopýry a vřesovci. Místní rašeliniště jako je například údolí se nespolehají na klimatické podmínky spíše se tvoří vlivem podzemní vody z okolní půdy. Mohou se tak tvořit na jakémkoli místě, dokud přítok podzemní vody postačí k tomu, aby umožnil růst rostlin a zpomalil rozklad. [28]

Některé skotské sladové whisky, zejména ty z ostrova Islay, jsou vyhlášené svou kouřovou chutí. Tyto aromatické sloučeniny jsou odvozeny ze sušení sladu. Složky tohoto kouře nebo „rašelinné vůně“ jsou adsorbovány sladem a dodávají pálenice charakteristickou příchut'. [29]

Důležitým faktorem jsou oblasti, ze kterých rašelina pochází. Například rašelina na Orknejič používána například k výrobě whisky Highland Park neobsahuje žádné dřevité součásti, ale tvoří ji většinou zbytky vřesu. Ve výsledné chuti má whisky velice zajímavou kombinaci rašelinového kouře a vřesové sladkosti. Naopak rašelina z ostrova Islay obsahuje výrazné množství zbytků mořských řas, což má vliv na „medicínský“ charakter whisky z ostrova Islay. [30]

Různé těkavé fenolické sloučeniny se nacházejí ve whisky, kde byla použita rašelina při vysoušení sladového ječmene. Tyto aromatické látky jsou přítomny v mnoha sladových whisky. Zejména v těch z ostrova Islay. Islay je ostrov s osmi palírnami u západního pobřeží Skotska. Kromě toho se fenoly nacházejí také v mnoha míchaných skotských whisky. Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií byly detekovány látky: fenol, guajakol, isomery kresolu a xylenolu, eugenol a další deriváty fenolu (obrázek 3). Jako vnitřní standard byl použit 2,3,5-trimethylfenol. [9]



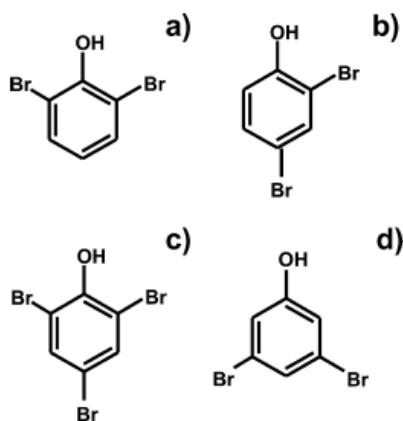
A high-performance liquid chromatogram of volatile phenolic congeners in blended Scotch whisky with fluorescence detection (excitation at 272 nm and emission at 298 nm).

Peaks: 1, phenol; 2, guaiacol; 3, *m*-, *p*-cresol; 4, *o*-cresol; 5, 3,5-xenol; 6, 4-ethylphenol (2,5-xenol); 7, 4-ethylguaiacol; 8, 2-ethylphenol; 9, eugenol; 10, internal standard.

Obrázek 3: Chromatogram fenolických látek v míchané skotské whisky (převzato z [9])

2.3.3 Fenoly z mořské vody

Whisky, které se vyrábí například na jižním pobřeží ostrova Islay ve Skotsku jsou známy kromě kouřové a rašelinové příchutě také mořskou příchutí. Tato mořská příchut' zahrnuje tóny jódu, mořských řas a solí. Příchutě podobné jódu byly přiřazeny k bromfenolům. Bromfenoly mají extrémně nízké prahové hodnoty chuti, což způsobuje nepříjemnou chuť, a to i pokud jsou přítomny v koncentracích menších než 1 nanogram na litr (sub-ng/l). Při takových nízkých koncentracích poskytuje 2,6-dibromfenol a 2,4,6-tribromfenol chuťové vjemy připomínající jod, krevety, krabí maso a mořskou sůl. Bromfenoly zobrazené na obrázku 4 jsou přirozeně produkovány mořskými organismy (řasy a houby). Stejně tak přirozeně vyprodukované bromfenoly jsou hlavní sloučeniny v pobřežních mořských vodách. Ve vodě bylo zjištěno, že aroma bromfenolů má charakter jódový, fenolický nebo medicínální. Stejná chuť byla připsána whisky Islay Scotch. [31]



Obrázek 4: Struktura 2,6-dibromfenolu (a); 2,4-dibromfenolu (b); 2,4,6-tribromfenolu (c) a 3,5-dibromfenolu (d) (převzato z [31])

2.3.3.1 Bromfenoly v potravinách

Potenciální příčinou „desinfekčního“ zápachu v potravinách je tvorba chlor- a bromfenolu v důsledku reakcí mezi chloračními činidly (zbytkovými nebo vznikajícími) a fenolem (získaným z potravin nebo kontaminací). Ke kontaktu se slabými roztoky halogenačních činidel může dojít při čištění surovin nebo na linkách na zpracování surovin. Nejčastěji se používá chlor, ale příležitostně se používají donory bromu jako je bromchlordimethylhydantoin (BCDMH), který hydrolyzuje na kyselinu bromnou (HBrO), která pak může přijít do přímého kontaktu s potravinami. HBrO může také vznikat oxidací kontaminačního bromidového iontu buď chlorem nebo ozonem. Zbytkový nebo vznikající HBrO pak může reagovat s fenolem a poskytovat tak směs halofenolů. Je-li tedy fenol přítomen ve vodě používané k rozpouštění nebo ředění desinfekčního prostředku v důsledku kontaminace zdroje, tak pravděpodobně dojde k rychlé produkci halofenolu. V případě, že by nebyl zcela odstraněn, mohl by se přenést a způsobit zápach v jakémkoli potravinovém produktu, který přijde do přímého kontaktu s desinfikovanou oblastí. Případně by zbytkový halogen, který nebyl zcela odstraněn z výrobní linky, mohl reagovat přímo v potravinářském produktu, pokud by obsahoval fenol. Tato cesta byla v některých případech považována za příčinu chlorfenolového zápachu ve výrobcích jako je pivo, mléko nebo sýr.

Bromfenoly mají velmi nízký senzorický práh. 2-bromfenol a 2,6-dibromfenol mají obzvláště nízké prahové hodnoty a s největší pravděpodobností způsobují aroma desinfekčního prostředku v potravinářských výrobcích. [32]

2.3.3.2 Zdroj 2,6-dibromfenolu u australských krevet

Nejčastěji se opakující nežádoucí chuť u krevet je ta, která je popsána jako jodová nebo jodoformní. Vyskytuje se u druhů ulovených u severozápadního a severovýchodního pobřeží Austrálie, ale zřídka se vyskytuje u druhů ze severních nebo jižních oblastí. V roce 1970 se uvádělo, že jeden druh krevety (*Metapenaeus endevour*) ulovený v Exmouthském zálivu v západní Austrálii tuto chuť pravidelně vlastnil, i když jiné druhy ze stejné oblasti byly nepoškozeny. Analýza vzorků krevet s intenzivním jodoformovým zápachem vedla k identifikaci 2- a 4-bromfenolu, 2,4- a 2,6-dibromfenolu a 2,4,6-tribromfenolu. Následné hodnocení roztoků bromfenolů ukázalo, že 2,6-dibromfenol vykazoval jodový zápach při extrémně nízké prahové koncentraci 0,5 ng/l. U krevetového masa bylo zjištěno, že prahová koncentrace chuti je 60 ng/kg. Kvantitativní analýza pomocí GC-MID-MS extraktů silně kontaminovaných krevet ukázala, že 2,6-dibromfenol byl přítomen v koncentracích výrazně přesahujících jeho chuťovou prahovou koncentraci. Pitva těchto krevet následovaná extrakcí a analýzou části hlavy a ocasu ukázala, že bromfenoly byly koncentrovány v hlavě.

Rozbory jiného druhu krevety (*Penaeus latisulcatus*) z Exmouthského zálivu ukázaly, že ačkoli bylo přítomno pět bromovaných fenolů, tak koncentrace 2,6-dibromfenolu byla přibližně jedna čtyřicetina oproti krevetě *Metapenaeus endevour*. Nejsou žádné zprávy o tom, že by tato kreveta byla někdy ovlivněna chutí podobnou jódu.

Exmouthský záliv je polouzavřená pánev, ve které se hromadí velké množství řas a zbytků zvířat. Záliv obsahuje nejrozmanitější mořské řasy a vzhledem k tomu, že organické naplaveniny představují hlavní zdroj potravy pro krevety, tak místní rybáři navrhli, že právě řasy a houby by mohly být zdrojem jodové chuti krevet. Rozbory řas prokázaly, že 2,6-dibromfenol byl přítomen v relativně vysokých koncentracích stejně jako menší množství ostatních bromfenolů. [33]

2.4 Stanovení fenolických látek

Metody stanovení fenolických látek lze rozdělit na metody stanovení celkových fenolů a metody pro stanovení určité skupiny fenolů. Pro stanovení sumy fenolů se nejčastěji používá spektrofotometrie. Pro stanovení určité skupiny fenolů se využívají separační metody.

Je nutné mít nějaké metody pro posouzení stupně rašelínovosti u whisky. A to jak ve smyslu kvantitativním (hodnocení množství rašelínových esencí adsorbovaných ve sladu), tak v kvalitativním (vzhled, aroma a chuť sladu). [34]

2.4.1 Spektrofotometrické metody

Celkový obsah fenolů většinou vychází z reakce fenolů s kolorimetrickým činidlem a měření absorpce barevného produktu ve viditelné oblasti spektra. Nejuznávanějšími metodami pro stanovení celkového obsahu fenolu jsou metoda Folin-Ciocalteu, Bishopova metoda a zkouška založená na vzniku pruské modři. [35]

Jedna metoda, která byla použita v průmyslu byla založena na reakci fenolů s diazotovanou kyselinou sulfanilovou. Bylo zjištěno, že toto činidlo není dostatečně specifické a nestabilita diazoniové soli způsobuje obtíže.

Jako další činidlo pro stanovení fenolů byl zvolen 4-aminofenazon. Toto činidlo má vysokou citlivost a je specifické pro fenoly. [36] Základem této analýzy je oxidace fenolu alkalickým ferrokyanidem na odpovídající p-chinon, který se kondenzuje s 4-aminofenazonem za vzniku chinoidní struktury. [34] Ale toto činidlo není citlivé na některé z hlavních fenolických složek rašelínového kouře. Pokud je fenol substituován v poloze para, pak nemůže dojít k oxidaci a takové fenoly nereagují s 4-aminofenazonem.

UV spektrofotometrický test

Jednoduché fenoly mají absorpční maxima mezi 220 – 280 nm, ale jejich absorpce je ovlivněna povahou použitého rozpouštědla a pH roztoku. Proto je vývoj uspokojivého UV testu obtížný úkol. Spektrofotometrické měření v UV a viditelném spektru se často používají ke stanovení fenolických sloučenin (například flavonoidů). [2]

Metoda Folin-Denis

Je nejrozšířenější postup pro kvantifikaci celkových fenolů. K redukci fosfomolybden fosforečné kyseliny (Folin-Denisovo činidlo) na příslušnou modř v alkalickém roztoku dochází za přítomnosti fenolických sloučenin. Swain a Hills upravili metodu Folin-Denis pro analýzu velkého počtu vzorků. [2]

Metoda Folin-Ciocalteu

Metoda se používá pro stanovení celkového obsahu fenolů v potravinách. Obě metody Folin-Denis i Folin-Ciocalteu nejsou specifické reakce, tudíž detekují všechny

fenolické skupiny. [2] Metoda je založena na redukci činidla Folin-Ciocalteu polyfenoly a měření absorpce při 260 nm. [35] Redukční reakce se zvyšuje za alkalických podmínek.

Bishopova metoda

Jedná se o spektrofotometrickou metodu založenou na chelatační reakci mezi polyfenoly a Fe (III), kde se vzorek smíchá s karboxymethylcelulózou/ethylendiamintetraoctovým činidlem. Absorbance se měří při 600 nm. Při srovnání s metodou Folin-Ciocalteu bývají výsledky této metody selektivnější, a proto poskytují nižší koncentrace polyfenolů. [35]

Zkouška s pruskou modří

Je dobrou volbou pro stanovení fenolů, protože má nízkou interferenci s nefenolovými sloučeninami. Metoda je založena na reakci fenolů s $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ iontem. Tento ion je redukován na $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Vzniklý ion reaguje s přebytkem Fe (III) za vzniku $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ - pruské modři (zvané také berlínská modř), jejíž absorbance se měří při 700 nm. [35]

2.4.2 Separační metody

Metody separační jsou založeny na principu separace. Separace je proces, při kterém se separují (oddělují) složky obsažené ve vzorku. Pro analytickou chemii mají největší význam zejména chromatografické metody.

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě nemísitelné fáze: stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen. Na stacionární fázi mohou být některé složky zachyceny (zdržují se). Čím více jsou složky poutány na stacionární fázi, tím více se zdrží. Tímto postupem se složky postupně od sebe odseparují. [37]

Chromatografických metod je velké množství. Pro stanovení těkavých látek se nejčastěji využívá plynová a kapalinová chromatografie.

2.4.2.1 Plynová chromatografie

Jako mobilní fáze se u plynové chromatografie používá plyn zvaný jako nosný plyn. Vzorek se dávkuje do proudu plynu, kterým je unášen kolonou. Vzorek se ihned po nadávkování musí přeměnit na plyn. Jednotlivé složky se separují v koloně na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Opouštějící složky indikuje detektor.

Plynový chromatograf se skládá ze zdroje nosného plynu (tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon), čistícího zařízení (zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu), regulačního systému (zajišťuje průtok nosného plynu), dávkovače (zavedení vzorku do proudu nosného plynu), termostatu (zajišťuje teplotu dávkovače, kolony a detektoru), kolony (v ní je umístěna stacionární fáze), detektoru (detekce látek) a vyhodnocovacího zařízení (zpracovává signál z detektoru). [37]

Množství fenolů ve sladu whisky jsou obvykle určeny plynovou chromatografií, která dává přesné a kvantitativní výsledky pro každou fenolovou sloučeninu. Tato metoda je ovšem problematická kvůli potřebnému přístroji a přípravě vzorku. Proto jsou některé kolorimetrické metody často používány jako jednodušší a rychlejší metody pro měření celkového obsahu fenolů. [38]

Stanovení rašelinového kouře za pomoci plynové chromatografie, která zahrnovala parní destilaci sladu následovanou extrakcí destilátu do etheru. [34]

Pro kvantifikaci bromovaných fenolů ve whisky z ostrova Islay byla použita plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS). [31]

2.4.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografií se jako mobilní fáze používá kapalina. O separaci složek rozhodují interakce se stacionární fází a použitá mobilní fáze. Během separace dochází k rozdělení analytu mezi mobilní a stacionární fází. Jako mechanismy separace se používá například adsorpce, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo rozdělování na základě rozpustnosti.

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníků mobilní fáze, čerpadla (čerpá se do kolony kapalina), směšovacího zařízení (směšování mobilní fáze), dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. [37]

Pro detekci fenolů v potravinách s pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se nejčastěji používají detektory v ultrafialovém až viditelném spektru záření (UV-Vis), detektory s diodovým polem (DAD) a elektrochemické coulometrické detektory (EC).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) bývá běžně používána pro charakterizaci fenolů. Kombinace HPLC techniky

a voltametrie byla úspěšně použita pro detekci, identifikaci a kvantifikaci flavonoidních fenolů ve víně. [2]

Další práce se zaměřuje na separaci a kvantifikaci deseti fenolů ve skotské whisky pomocí HPLC s fluorescenčním detektorem. [39]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce je optimalizace metody na analýzu fenolických látek v destilátech pomocí derivatizace analytu s následnou analýzou plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Optimalizovaná metoda byla následně použita na reálné vzorky různých destilátů.

3.1 Použité chemikálie

Hydrogenuhlíčitan sodný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
Anhydrid kyseliny octové (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Hexan (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
Methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
Denaturovaný ethanol 97,3 % - Hipersolv
HPLC voda (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
Nasycený roztok chloridu sodného
Roztok kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l
Pyridin (Penta, Praha, ČR)
Hexamethyldisilazan (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Tetrachlormethan (Lachema, Brno, ČR)
2-methylfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
3-methylfenol (Lachema, Brno, ČR)
4-methylfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
2-ethylfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
2,5-dimethylfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
4-ethylfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
3,5-dimethylfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Guajakol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
2,3-dimethylfenol (Koch-Light Laboratories, Colnbrook, Bucks, England)
Whisky lakton (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
4-ethylguajakol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
2,6-dimethoxyfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Eugenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Vanilín (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Isoeugenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

3-nitrofenol (Loba Feinchemie AG, Vídeň, Rakousko)
 2-bromfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 4-bromfenol (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
 2,4-dibromfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 2,6-dibromfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 3,5-dibromfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 2,4,6-tribromfenol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

3.2 Seznam vzorků

Tabulka 1: Seznam reálných vzorků

	WHISKY	PŮVOD	TYP		OBSAH ALKOHOLU
1	Ardbeg	Islay, Skotsko	single malt	10 y.	46 %
2	Bowmore	Islay, Skotsko	single malt		40 %
3	Bruichladdich, Port Charlotte	Islay, Skotsko	single malt	6.y	50 %
4	Bruichladdich, The Classic Laddie	Islay, Skotsko	single malt		50 %
5	Bunnahabhain	Islay, Skotsko	single malt	12 y.	46,3 %
6	Caol Ila	Islay, Skotsko	single malt	12 y.	43 %
7	Finlaggan	Islay, Skotsko	single malt		40 %
8	Kilchoman	Islay, Skotsko	single malt		46 %
9	Lagavulin	Islay, Skotsko	single malt	16 y.	43 %
10	Laphroaig	Islay, Skotsko	single malt	10 y.	40 %
11	Laphroaig, Select	Islay, Skotsko	single malt		40 %
12	Big Peat	Islay, Skotsko	blended		46 %
13	Islay Mist	Islay, Skotsko	blended		40 %
14	Scallywag	Speyside, Skotsko	blended		46 %
15	Talisker	Skye, Skotsko	single malt	10 y.	45,8 %

3.3 Přístrojové vybavení

Automatické pipety Eppendorf (Hamburk, Německo)
 Analytické váhy Mettler Toledo XSE205DU (Columbus, USA)
 Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A, GC Systém (Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA)
 Hmotnostní spektrometr Agilent Technologies 5975C Inert XL EI/CI MSD with Triple-Axis Detector (Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA)

Blokový termostat Stuart SBH130 (Staffordshire, VB)

Vialky, inserty

Laboratorní sklo

Eppendorfký, špičky

3.4 Pracovní postup

Příprava standardních roztoků

Na analytických váhách bylo do plastové eppendorfký naváženo asi 2 mg standardní látky přesně. Následně byl ke standardu přidán automatickou pipetou takový objem methanolu, aby výsledná koncentrace činila 2 mg/ml. Z každého standardu bylo odpipetováno 25 μ l standardu a roztok byl doplněn do 2 ml whisky, čímž vznikl směsný roztok všech standardů. Tento roztok byl naředěn odpipetováním 20 μ l do 2 ml whisky. Koncentrace každého standardu činila 0,25 μ g/ml.

Příprava vnitřního standardu

Vnitřní standard byl připraven navážením 2 mg m-nitrofenolu do plastové eppendorfký. K standardu byl přidán automatickou pipetou takový objem methanolu, aby výsledná koncentrace činila 2 mg/ml.

Derivatizace standardů

Acetylace

Do plastové eppendorfký bylo odpipetováno 50 μ l smíchaných standardů a přidáno 950 μ l destilované vody. Do připraveného roztoku bylo přidáno 40 mg hydrogenuhličitanu sodného a 40 μ l anhydridu kyseliny octové. Po ukončení vývoje CO₂ (cca 45 minut) bylo přidáno 0,1 ml hexanu. Poté byla směs intenzivně protřepávána a centrifugována (4400 ot/min, 4 min). Následně byla odpipetována do vialky horní organická fáze. Extrakce byla ještě jednou zopakována. Nakonec byla vialka zakrimpována a připravena pro analýzu.

Tento postup byl inspirován článkem o kvantifikaci bromfenolů v Islay whisky [31].

Silylace

Do vzorku k 1 ml whisky bylo přidáno 0,5 ml nasyceného roztoku chloridu sodného, 100 μ L 1M kyseliny chlorovodíkové, 20 μ L m-nitrofenolu (c=0,5 μ g/ml) a 40 μ L

smíchaných bromovaných standardů ($c=1 \text{ } \mu\text{g/ml}$). Poté bylo přidáno $100 \text{ } \mu\text{L}$ tetrachlormethanu s následnou extrakcí. Extrakce byla ještě jednou zopakována. K extraktu bylo přidáno $200 \text{ } \mu\text{L}$ pyridinu a $200 \text{ } \mu\text{L}$ hexamethyldisilazanu (HMDS). Vialka byla zakrímpována a umístěna do blokového termostatu při $80 \text{ } ^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut a $95 \text{ } ^\circ\text{C}$ po dobu dalších 15 minut.

Příprava vzorku

Do plastové eppendorfky bylo odpipetováno $20 \text{ } \mu\text{l}$ m-nitrofenolu ($c=0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$) a přidán 1 ml vzorku. Do roztoku bylo přidáno 40 mg hydrogenuhličitanu sodného a $40 \text{ } \mu\text{l}$ anhydridu kyseliny octové. Po ukončení vývoje CO_2 (cca 45 minut) bylo přidáno 0,1 ml hexanu. Směs byla protřepána a centrifugována (4400 ot/min , 4 min). Následně byla do vialky odpipetována organická fáze. Extrakce byla ještě jednou zopakována. Takto připravený roztok ve vialce byl zakrímpován a připraven pro analýzu.

Obdobným způsobem byl zpracován vzorek se standardním přídatkem $20 \text{ } \mu\text{l}$ směsi standardů ($c=0,005 \text{ } \mu\text{g/ml}$).

3.5 Analýza GC/MS

Základní chromatografické podmínky analýzy plynovým chromatografem spojeným s hmotnostním spektrometrem jsou uvedeny v tabulce 2. Hmotnostní spektrometr pracoval v módu SIM (monitorování selektivních iontů) a v módu TIC (celkovém iontovém proudu).

Po celou dobu analýzy acetylovaných bromfenolů v módu SIM byly sbírány ionty o m/z 172, 174, 181, 250, 252 a 330. Pro mono bromfenoly je molekulový ion $172 \text{ } m/z$ a izotopický ion $174 \text{ } m/z$. Ion mono bromovaných acetátů je $214 \text{ } m/z$. Tento ion se v iontovém zdroji rozpadne na ion $172 \text{ } m/z$. Tudíž ion $172 \text{ } m/z$ se dá použít pro detekci acetátů i mono bromovaných fenolů.

Pro analýzu silanizovaných bromfenolů byly sbírány ionty o m/z 196, 229, 231, 309, 387 a 389.

V módu TIC pracoval hmotnostní spektrometr s detekcí od 29 do $520 \text{ } m/z$.

Tabulka 2: Parametry analýzy

Teplotní program:	40 °C-2 min-10 °C/min-300 °C-15 min
Objem nástřiku:	2 µL
Teplota nástřiku:	280 °C
Doba analýzy:	43 minut
Kolona:	nepolární Agilent HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Dávkování s tlakovým pulsem:	40 psi po 0,4 min
Průtok nosného plynu:	He: 0,9 ml/min
Zpoždění (Solvent delay):	acetylce 4 min silylace- 6 min



Obrázek 6: Vzorky whisky

Ardbeg

Pro výrobu whisky používá palírna Ardbeg silně rašelinný slad, který dodává whisky nezaměnitelný charakter. [41] Když se palírna znovu otevřela jedna z bývalých sušáren sladu se proměnila v obchod. [42] Nabízel například čaj, kávu nebo tradiční moučník. Whisky vyrobená po znovuootevření už není tak rašelinná jako starý Ardbeg. Právě díky tomu, že místo vlastního sladu se začal používat slad z Port Ellen.

Bowmore

Palírna Bowmore se nachází na březích zálivu Loch Indaal. [40] Bowmore je whisky s nádechem rašelinového kouře a slanosti. Je považována za nejlehčí whisky z ostrova Islay. [43] Společnost má vlastní sladovny, kde se rašelina drtí před spálením, aby poskytla více kouře než tepla. [44] Palírna je vystavena více západnímu větru, takže v aroma může být více cítit ozon.

Bruichladdich

Palírna se nachází na břehu zálivu Loch Indaal. Palírna Bruichladdich na rozdíl od ostatních palíren na ostrově Islay neleží u moře, ale je oddělena pobřežní cestou. Od roku

2018 je produkce v palírně rozdělena na: Bruichladdich, Port Charlotte a Octomore. Bruichladdich označují jako nenakouřenou whisky a Port Charlotte jako silně nakouřenou whisky. [43]

Bunnahabhain

Leží na ostrově Islay nejseverněji ze všech palíren. Palírna se nachází přímo u moře. Tato palírna používá převážně nerašelinovitý slad, proto se řadí mezi nejméně rašelinové whisky z oblasti Islay. [43] Whisky má nádech islayského námořního charakteru. [44] U palírny byl postaven obrubník, který má zastavit auta návštěvníků, aby nesjela do moře. Ze zdi vidí lodní zvon ze zachráněného nedalekého vraku.

Caol Ila

Palírna Caol Ila se nachází v zátoce u Port Askaigu, [44] Whisky Caol Ila se vyznačuje vůni rašeliny, sladovou sladkostí a citrusovým aroma. Má olejovitou strukturu s příchutí melasy a kouře. [40]

Finlaggan

Finlaggan je whisky z ostrova Islay. Je pojmenována podle hradu Finlaggan. Je velkým tajemstvím, neboť palírna, ze které pochází, je neznámá. [45]

Kilchoman

Jedná se o nejmladší palírnu na ostrově Islay. [40] Whisky se zde začala vyrábět od roku 2005. Palírna Kilchoman je známá tím, že celá výroba od pěstování ječmene až po stáčení destilátu do lahví se odehrává na jednom místě. [41]

Lagavulin

Palírna Lagavulin se nachází jen dva kilometry severně od palírny Laphroaig. [31] Lagavulin je typicky ostrovní whisky s nádechem kouře, rašeliny a slanosti. [43] Zrající sklady jsou otlučeny mořem a mají vlastní molo. [44] Lagavulin v překladu znamená „mlýn v kotlině“.

Laphroaig

Laphroaig je nejjižnější palírna na ostrově Islay. [31] Sklady se nachází přímo u moře a při vysokých přílivech je omývá oceán. Whisky z palírny Laphroaig se řadí mezi

velice silné a ostré chutě. [43] Na chuti se podílí kouřový, rašelinový a jodový charakter z mořských řas. Odborníci se domnívají, že vzduch vanoucí od moře proniká do sudů. Naopak zaměstnanci se domnívají, že právě rašelina může za specifickou příchut' whisky.

Big Peat

Whisky Big Peat je míchaná pouze ze sladových whisky z oblasti Islay. Obsahuje Ardbeg (jodový charakter a zemitost), Bowmore (dodává vyváženost), Caol Ila (sladkost) a Port Ellen (přidává eleganci). [43]

Islay Mist

Whisky Islay Mist byla původně vyrobena jako single malt whisky na ostrově Islay. Lord Margadale si myslel, že místní single malt whisky Laphroaig je příliš těžká pro návštěvníky, tak smíchal slad z oblasti Speyside. Tím vznikla míchaná whisky Islay Mist, která má tóny rašeliny, mořských řas a kouře z ostrova Islay a sladkost, jemnost z oblasti Speyside. [46]

Scallywag

Whisky Scallywag je míchaná pouze ze sladových whisky z oblasti Speyside. Scallywag je nový přírůstek do řady Douglas Laing. Zraje v kombinaci sherry a bourbon sudů. [47]

Talisker

Talisker je jediná palírna na ostrově Skye. [43] Vzhledem k velikosti a blízkosti Skye k pevnině se zdá zvláštní, že je tam jen jedna palírna, když Islay jich má 8. [40] O chuti whisky se říká, že má charakter mořských řas a pepřovou příchut'. [43]

Přírodní barva sladové whisky uzrálé v obyčejném dřevě je světle žlutá. Tmavší odstíny (od jantarové barvy až po tmavě hnědou) mohou být získány sherry dřevem nebo obarveny karamellem. [44]

Na obrázku 7 je znázorněna barva vzorků whisky této kvalifikační práce.

Analýzou fenolů ze dřeva bylo identifikováno 17 látek (tabulka 3). Tyto fenoly lze jednoduše identifikovat a kvantifikovat.

Tabulka 3: Charakteristika standardů fenolů

	Acetátová forma	Volný	SIM
STANDARDY	t (min)	t (min)	(m/z)
2-methylfenol	7,89	6,692	107
3-methylfenol	8,295	n.d.	107
4-methylfenol	8,368	n.d.	107
2-ethylfenol	9,004	7,935	107
2,5-dimethylfenol	9,33	8,104	107
4-ethylfenol	9,702	n.d.	107
3,5-dimethylfenol	9,707	8,396	107
Guajakol	9,758	7,26	109
2,3-dimethylfenol	9,775	8,515	107
trans-Whisky lacton	10,124	n.d.	99
cis-Whisky lacton	10,557	n.d.	99
4-ethylguajakol	12,188	9,938	152
2,6-dimethoxyfenol	12,532	10,94	154
Eugenol	13,1	10,99	164
Vanilín	13,162	11,586	152
cis-Isoeugenol	13,561	11,648	164
trans-Isoeugenol	14,135	12,166	164

V pozadí fenolů ze dřeva byly identifikovány minoritní bromované fenoly ve whisky. Tyto fenoly se vyskytovaly v daleko menších koncentracích. O to zajímavější je, že se daleko více projevují na vůni/zápachu whisky. Proto se tato práce zaměřuje na stanovení bromovaných fenolů.

4.1 Derivatizace

Jako derivatizační technika byla zvolena acetylace. Při acetylaci se používá jako derivatizační činidlo acetanhydrid (anhydrid kyseliny octové). Acetylace byla zvolena kvůli tomu, že fenoly jsou vysoce polární látky. Při acetylaci dochází jako první k derivatizaci, tím se sníží polarita látky a po derivatizaci následuje extrakce nepolárním rozpouštědlem, kde lze očekávat účinnější extrakci méně polárních derivátů ve srovnání s původními fenoly. U silylace je tento proces opačný, a to může být problém.

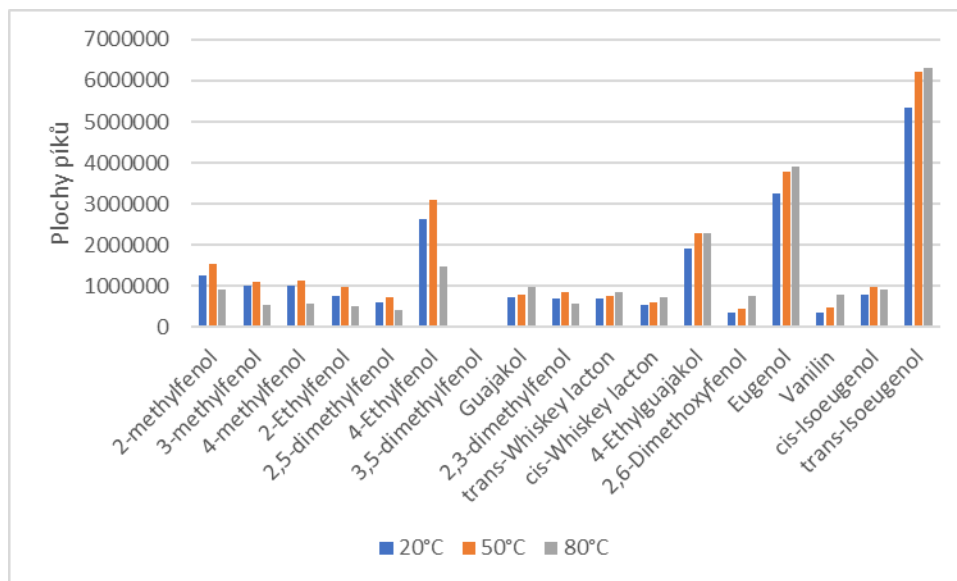
Jako první byla zaměřena pozornost na vliv teploty při derivatizaci a poté čas derivatizace.

4.1.1 Vliv teploty na derivatizaci

Do 3 eppendorfek bylo odpipetováno 50 μ l smíchaných standardů a 950 μ l vody. Před derivatizací bylo do každé eppendorfky přidáno 40 mg NaHCO_3 a 40 μ l acetanhydridu. Poté byly ihned eppendorfky vloženy do termostatu nastaveného na teplotu 20, 50 a 80 $^{\circ}\text{C}$. Po vývoji CO_2 bylo znovu do každé eppendorfky přidáno 40 mg NaHCO_3 a 40 μ l acetanhydridu. Po vývoji CO_2 byly eppendorfky vytaženy a k roztokům bylo přidáno 0,5 ml hexanu. Po protřepání byly organické fáze odpipetovány do vialek. Tento proces byl jednou zopakován.

Vyšší teplota derivatizace vedla k rychlejšímu ukončení vývoje CO_2 (vyšumění) a výtěžek reakce byl stejný jako u derivatizace při 20 $^{\circ}\text{C}$. Z grafu 1 je vidět, že zejména u níževroucích derivátů se plochy píků zvětšují při zvýšení teploty na 50 $^{\circ}\text{C}$, ale klesají při dalším zvýšení na 80 $^{\circ}\text{C}$. Příčinou mohou být ztráty způsobené těkavostí fenolů s malou molekulovou hmotností. U výševroucích derivátů už se tento efekt neprojevuje a plochy píků se s rostoucí teplotou mírně zvyšují.

Po vypočítání výtěžků reakce (acetylace) se prokázalo, že substituce v orto poloze vede k nižším výtěžkům díky sterickému bránění, ale i tak je výtěžek přes 90 %.

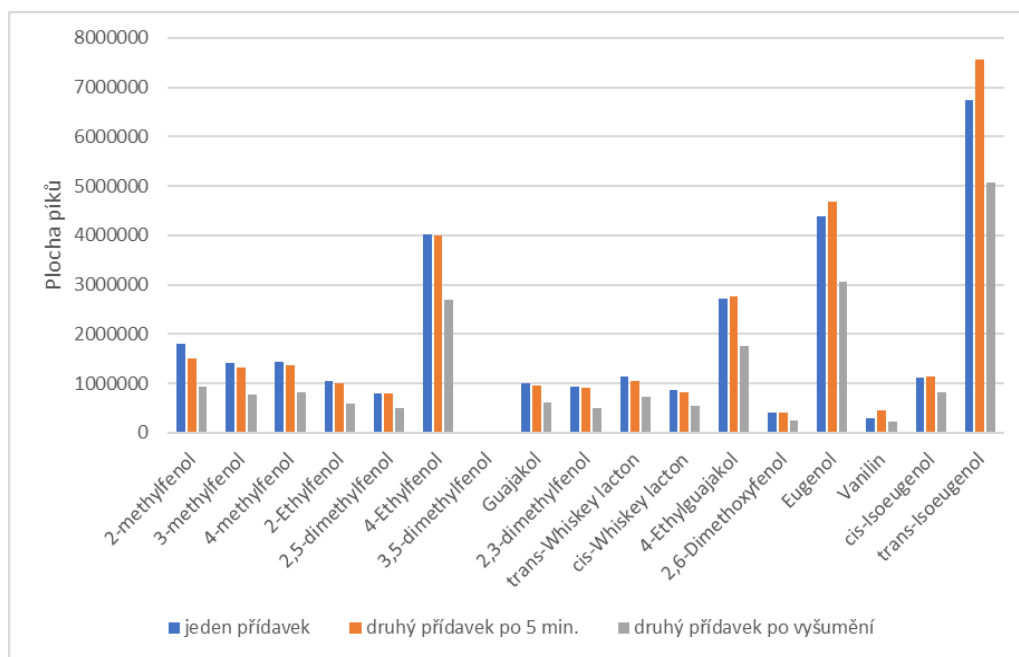


Graf 1: Vliv teploty na derivatizaci

4.1.2 Vliv času na derivatizaci

Do 3 eppendorfek bylo odpipetováno 50 μ l smíchaných standardů a 950 μ l vody. Před derivatizací bylo do každé eppendorfky přidáno 40 mg NaHCO_3 a 40 μ l acetanhydridu. V první eppendorfce byl pouze jeden přídavek acetylační směsi, ve druhé

eppendorfcce byl proveden druhý přídavek acetylační směsi po 5 minutách a ve třetí eppendorfcce byl proveden druhý přídavek až po ukončení vývoje CO₂ po prvním přídavku (cca po 40 minutách). Po vývoji CO₂ bylo přidáno 0,5 ml hexanu. Po protřepání byly organické fáze odpipetovány do vialek. Tento proces byl jednou zopakován. Prokázalo se, že stačí provést jen jeden přídavek acetylační směsi (graf 2).



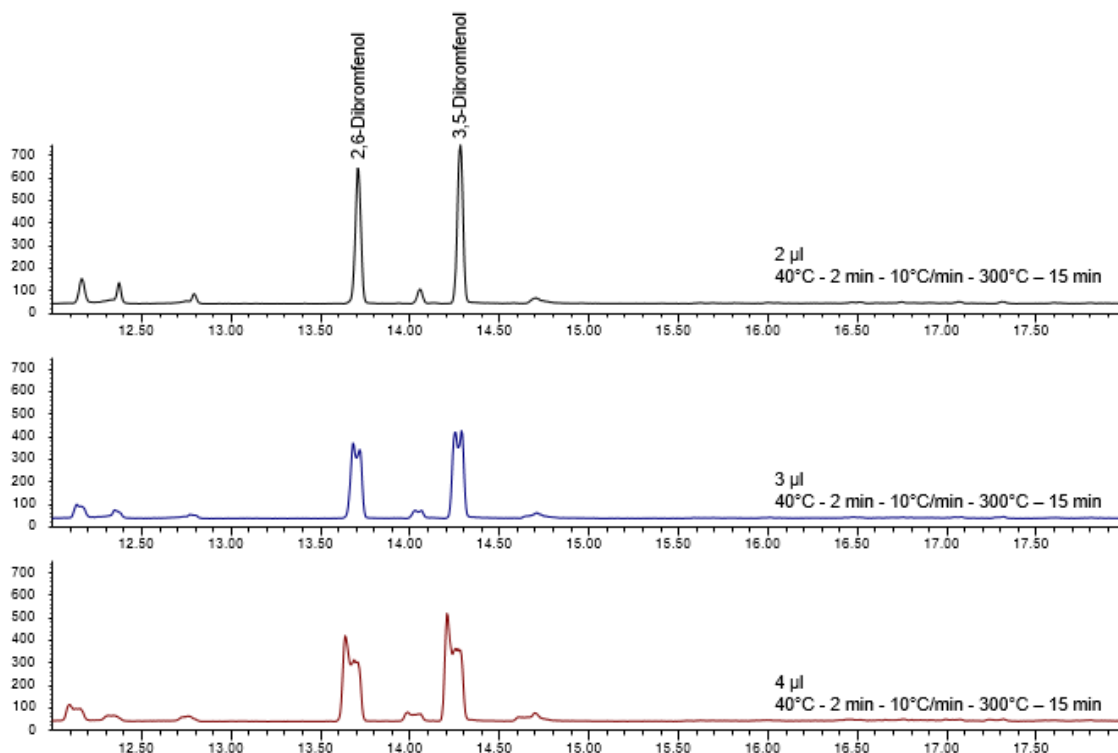
Graf 2: Vliv času na derivatizaci

4.2 Optimalizace podmínek pro chromatografickou analýzu

4.2.1 Optimalizace nástřiku

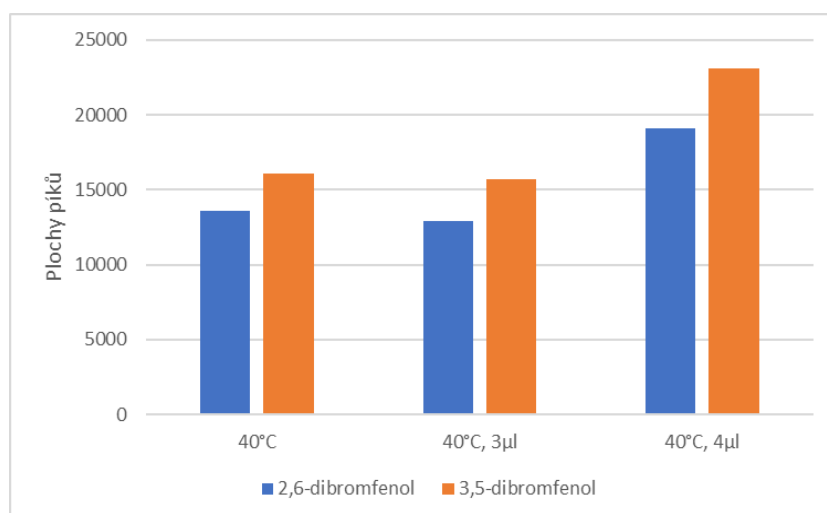
Optimalizace nástřiku byla provedena na m-nitrofenolu, 3,5-dibromfenolu a 2,6-dibromfenolu. Ke standardům byla přidána whisky Islay Mist s následnou acetylací a extrakcí. Pro optimalizaci nástřiku byl použit nástřik 2, 3 a 4 μ L.

Z obrázku 9 je dobře vidět, že s dalším zvětšováním dávkovaného objemu se píky rozšiřují. Mírně se zvětšuje jejich plocha, ale jejich výška se zmenšuje. Tedy zvětšování dávkovaného objemu nepřináší větší odstup signálu od šumu (poměr S/N) a tudíž nepomůže k dosažení lepšího detekčního limitu. Proto byl zvolen optimální nástřik pro bromované fenoly 2 μ L.



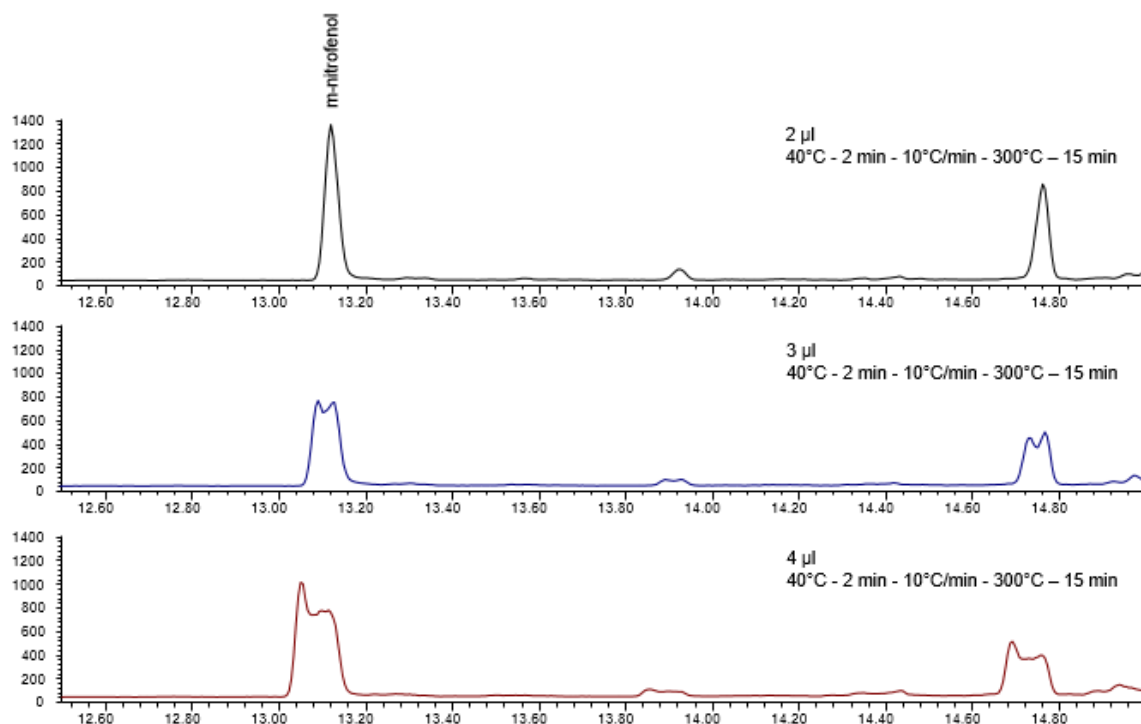
Obrázek 9: Výsledky optimalizace nástřiku pro 2,6-dibromfenol a 3,5-dibromfenol
(Islay Mist, 17 Y, přidavek 0.05 µg/ml, 252 m/z)

Při nástřiku 4 µL lze pozorovat (graf 3) větší plochu píku, ale díky rozštěpení píku není tento nástřik vhodný.

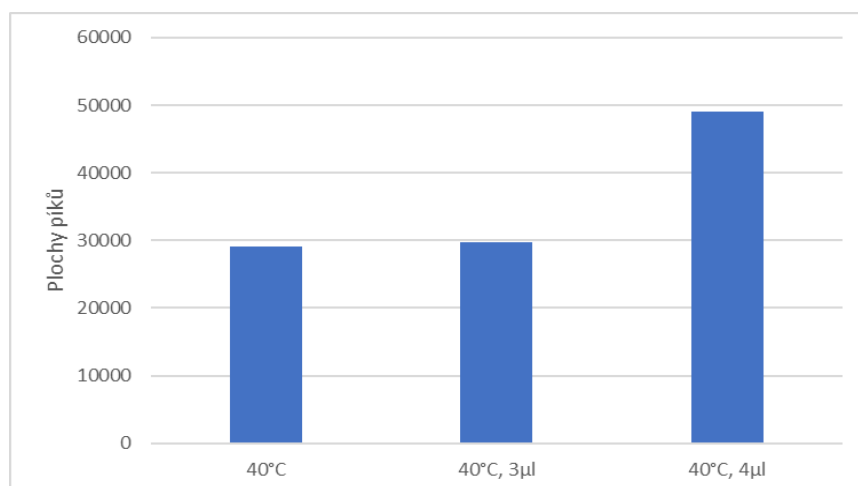


Graf 3: Optimalizace nástřiku (2,6-dibromfenol a 3,5-dibromfenol)

V případě m-nitrofenolu lze vypořádat (obrázek 10 a graf 4), že se chová stejně jako bromované fenoly. Optimální nástřik je 2 μL .



Obrázek 10: Výsledky optimalizace nástřiku pro m-nitrofenol
(Islay Mist, 17 Y, přidavek 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 181 m/z)

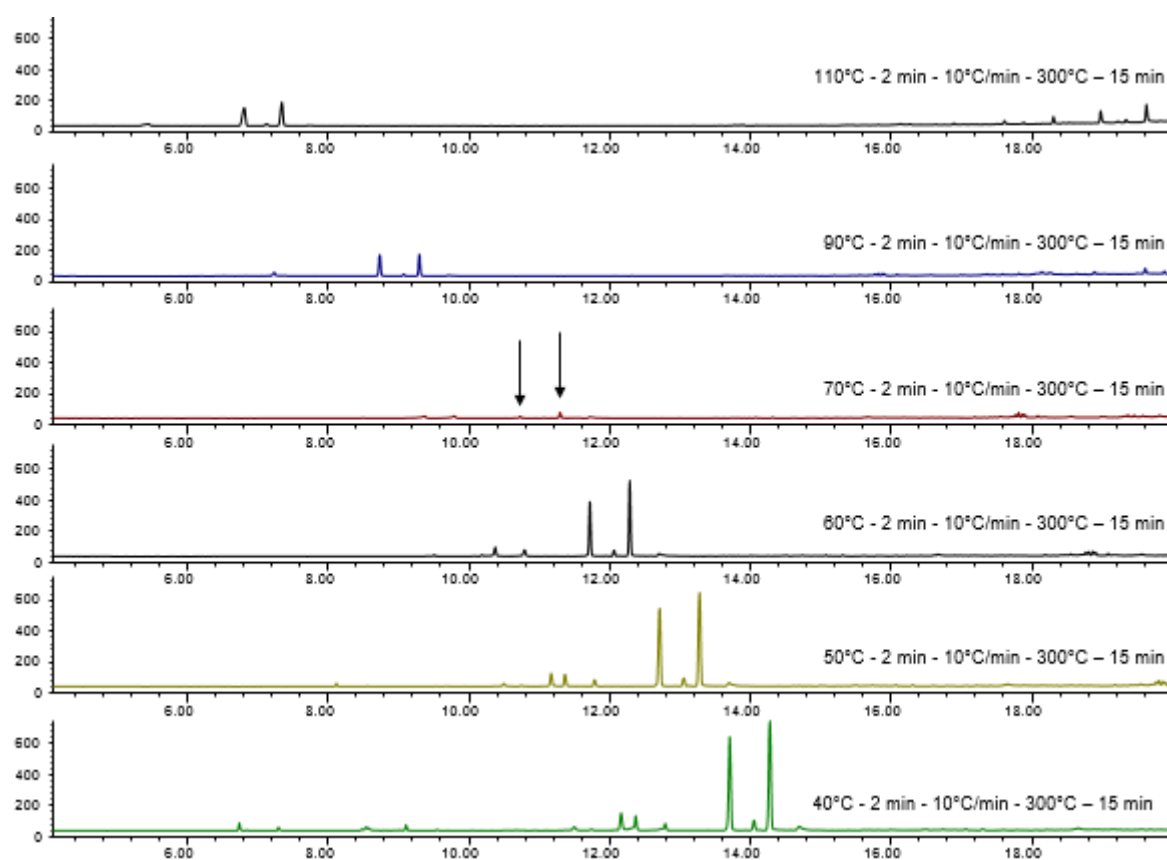


Graf 4: Optimalizace nástřiku (m-nitrofenol)

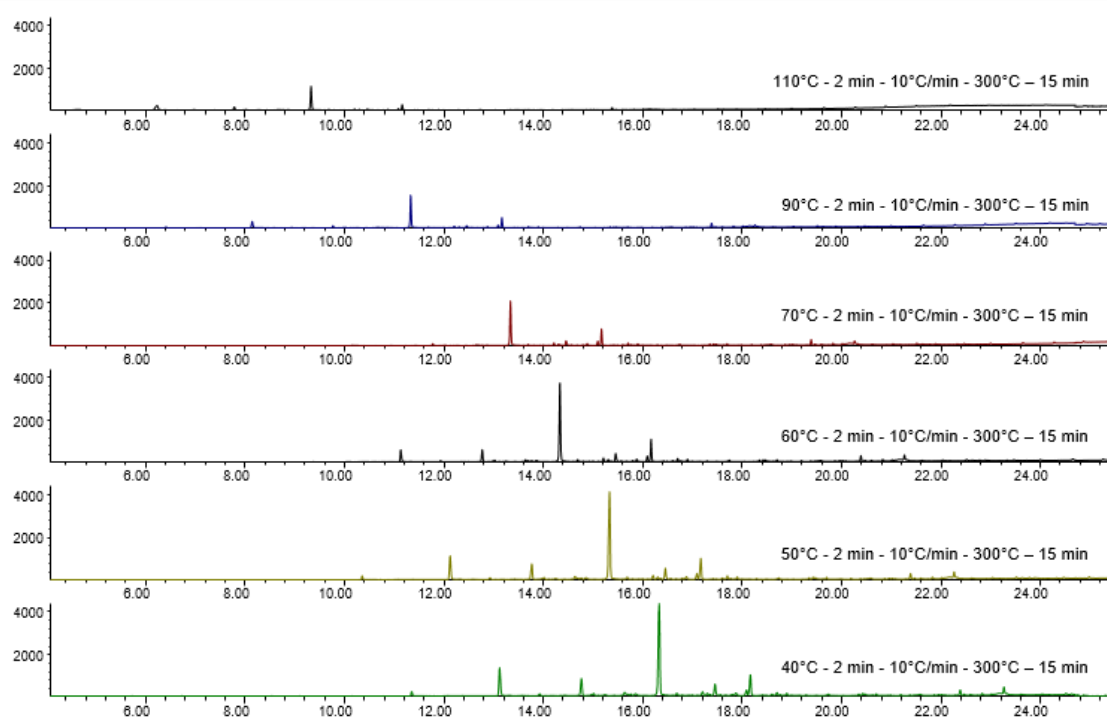
4.2.2 Optimalizace teplotního programu

Optimalizace počáteční teploty programu hraje v plynové chromatografii důležitou roli. Může vést například k účinnější nebo rychlejší separaci. Tato optimalizace byla vyzkoušena na 2,6-dibromfenolu, 3,5-dibromfenolu a m-nitrofenolu. Tyto standardy byly přidány ke vzorku whisky Islay Mist s následnou derivatizací a extrakcí. Pro optimalizaci byly zvoleny počáteční teploty programu 40, 50, 60, 70, 90 a 110 °C.

Prokázalo se, že nejúčinnější počáteční teplota pro analýzu fenolických látek v destilátech je teplota 40 °C. Tato teplota je optimální jak pro bromované fenoly (obrázek 11), tak i pro m-nitrofenol (obrázek 12).



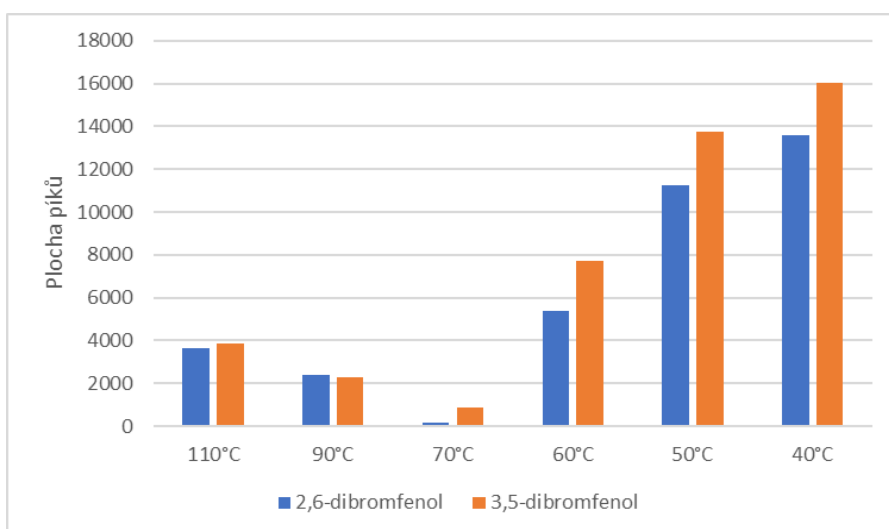
Obrázek 11: Výsledky optimalizace teplotního programu pro 2,6-dibromfenol a 3,5-dibromfenol (Islay Mist, 17 Y, přidavek 0.05 µg/ml, 252 m/z)



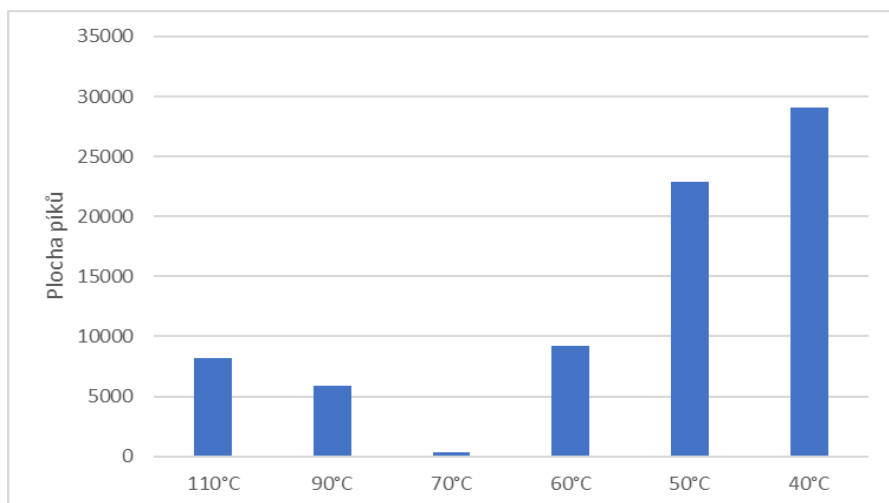
Obrázek 12: Výsledky optimalizace teplotního programu pro m-nitrofenol
(Islay Mist, 17 Y, přídavek 0.5 µg/ml, 181 m/z)

Vliv optimalizace teplotního programu na plochy píků je demonstrován v grafu 5. Při teplotě 70 °C vycházely nejmenší plochy píků 2,6-dibromfenolu a 3,5-dibromfenolu. Naopak teplota 40 °C se prokázala jako neúčinnější počáteční teplota.

Stejná závislost byla vypořazována i pro m-nitrofenol (graf 6).



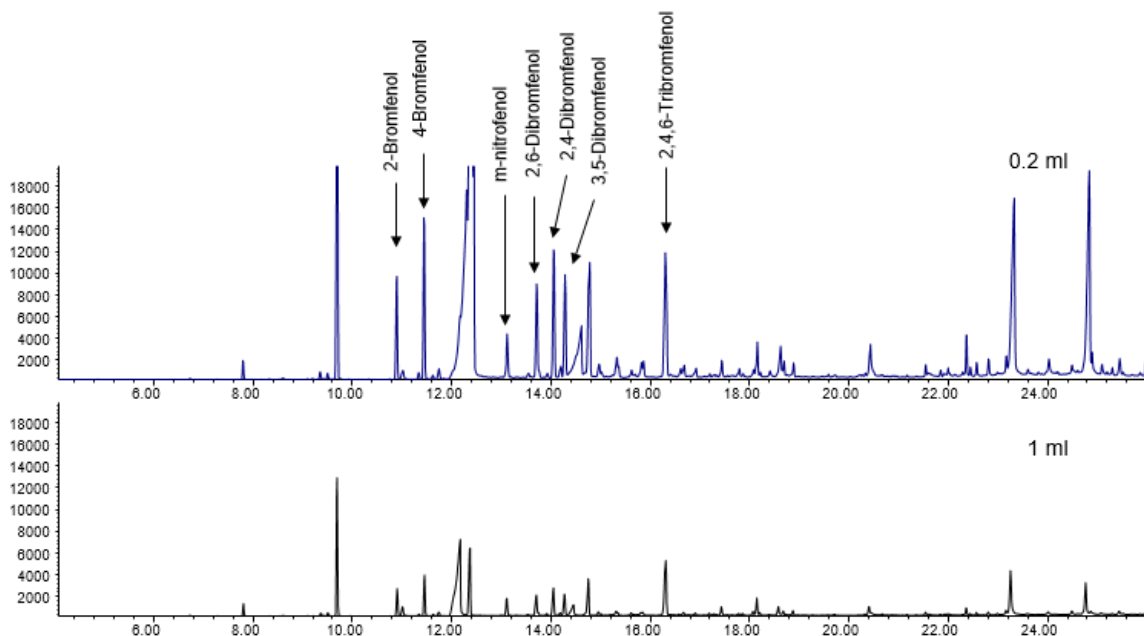
Graf 5: Optimalizace teplotního programu (2,6-dibromfenol a 3,5-dibromfenol)



Graf 6: Optimalizace teplotního programu (m-nitrofenol)

4.2.3 Optimalizace objemu extrakčního činidla

Dále byla vyzkoušena optimalizace objemu extrakčního rozpouštědla. Jeden vzorek byl extrahován dvakrát 0,5 ml hexanu a druhý vzorek dvakrát 0,1 ml hexanu. Z obrázku 13 je patrné, že použití menšího objemu rozpouštědla patrně sníží celkový výtěžek extrakce vyjádřený v látkovém množství, ale tím, že dané množství analytu bude zakoncentrováno v menším objemu se výsledná odezva zvýší.

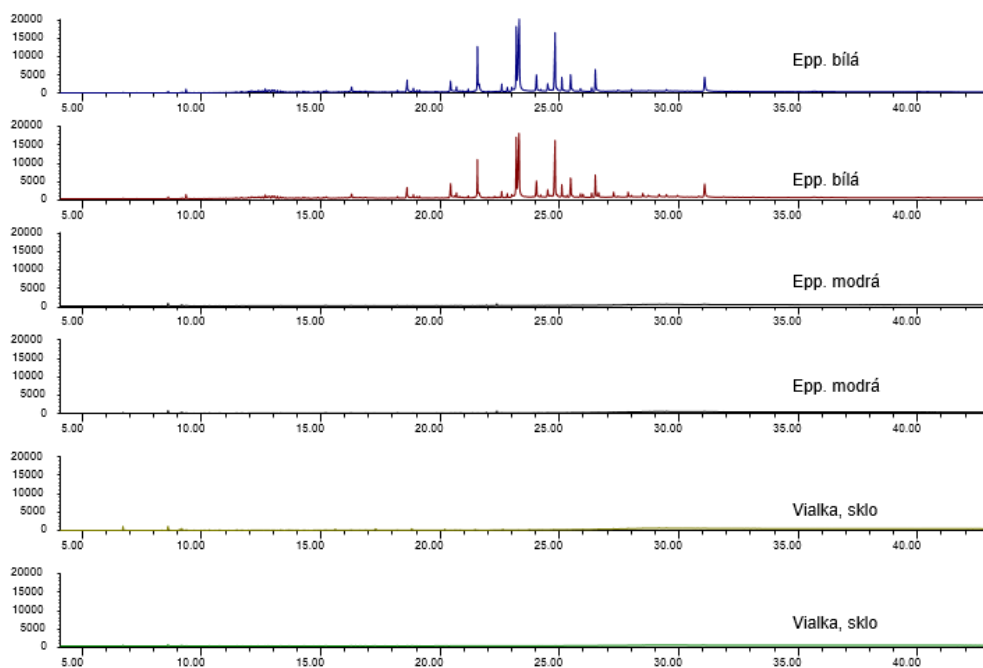


Obrázek 13: Optimalizace objemu extrakčního činidla

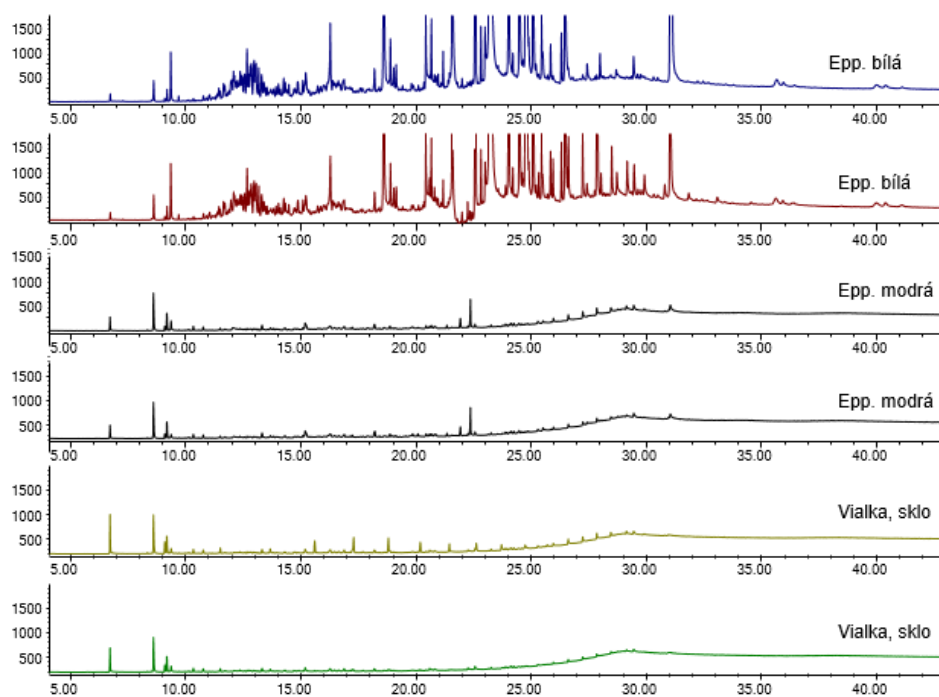
SIM 172, 174, 181, 252, 330 m/z

4.2.4 Optimalizace slepých pokusů

Použití bílých eppendorfek (1,5 ml) vedlo k velkým hodnotám slepých pokusů. Proto bylo vyzkoušeno použití modrých eppendorfek s kulatým dnem (2 ml) a skleněných vialek. Z obrázku 14 a 15 vyplývá, že použití modrých eppendorfek a skleněných vialek vede k výrazně nižším hodnotám slepých pokusů.

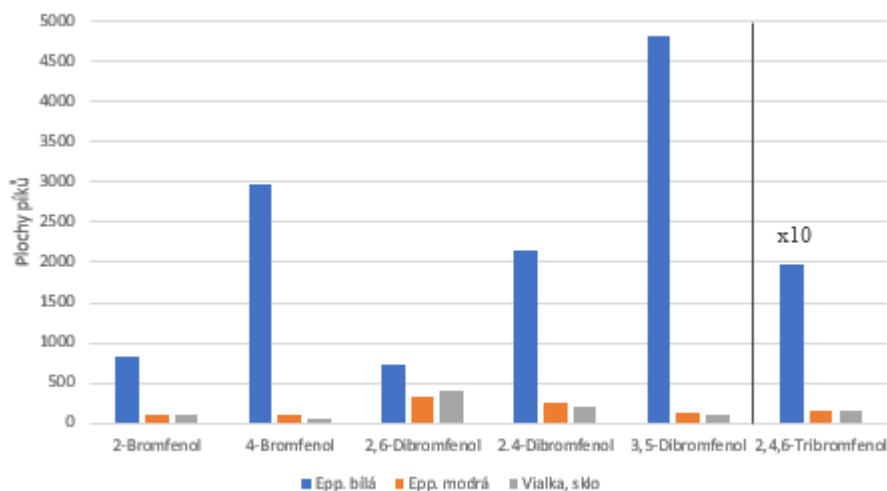


Obrázek 14: Optimalizace slepých pokusů



Obrázek 15: Optimalizace slepých pokusů - detail

Pro porovnání optimalizace slepých pokusů byl sestaven graf. Z grafu 7 lze vypožorovat, že použití bílých eppendorfek vedlo k daleko vyšším hodnotám slepých pokusů než při použití modrých eppendorfek nebo skleněných vialek.



Graf 7: Porovnání optimalizace slepých pokusů

Při použití skleněných vialek se ve spektru objevily nové píky, které odpovídají siloxanům. Zdrojem těchto siloxanů jsou víčka u skleněných vialek, které byly zapotřebí k provedení extrakce.

Řešení kontaminace bromfenolů z ovzduší

Jelikož jsou fenoly těkavé sloučeniny, tak lze předpokládat, že může dojít ke kontaminaci vzorku z ovzduší. Tato diplomová práce byla zaměřena na bromfenoly ve velmi nízkých koncentracích. Aby nedocházelo ke kontaminaci vzorku byla provedena následující opatření. Plastové eppendorfky a špičky byly před použitím promyté methanolem. Byl použit nový hexan a pro slepé pokusy ethanol 99,7 % a HPLC voda.

4.3 Opakovatelnost

Na whisky Lagavulin byla vyzkoušena opakovaná analýza. Byly připraveny 4 stejné vzorky a z nich byly spočítány průměrné koncentrace. Z výsledků vyplývá, že opakovaná analýza naznačuje relativní směrodatnou odchylku kolem 10 %. U 2,4,6-tribromfenolu vyšla vyšší směrodatná odchylka. Tato odchylka je důsledkem vysoké hodnoty slepého pokusu (tabulka 4).

Tabulka 4: Vyhodnocení opakované analýzy

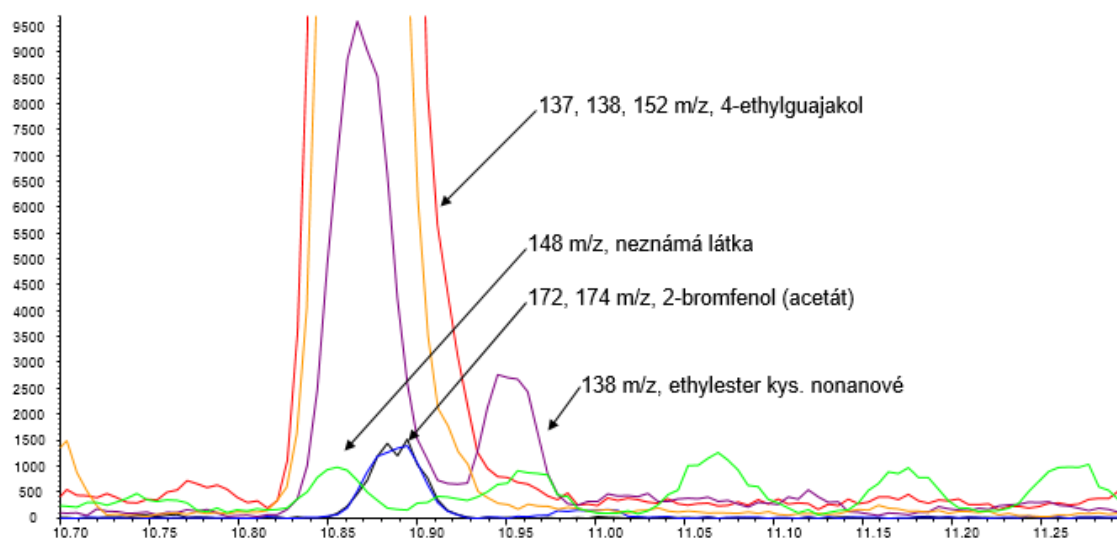
	Koncentrace standardu (ng/L)	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka (%)
2-bromfenol	6987	793,90	11,36
4-bromfenol	63	9,12	14,50
2,6-dibromfenol	409	20,83	5,10
2,4-dibromfenol	88	5,95	6,76
3,5-dibromfenol	34	3,78	11,07
2,4,3-tribromfenol	183	85,02	46,58

4.4 Potvrzení identity 2-bromfenolu

2-bromfenol se ve vzorcích vyskytoval ve velkém množství (velkých koncentracích). V předložené práci [31] se o 2-bromfenolu nezmiňují. Nejspíše kvůli právě zmíněným vysokým koncentracím a koelucím. Kvůli koelucím nebylo jednoduché 2-bromfenol identifikovat.

4.4.1 Acetylace

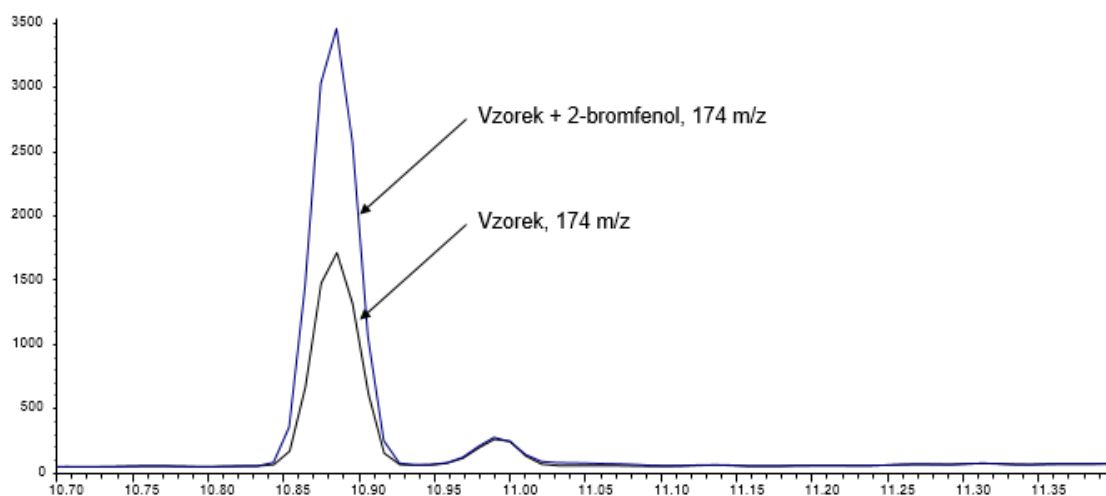
Vzorek whisky Lagavulin po derivatizaci (acetylaci) byl změřen v celkovém iontovém proudu (TICu), abychom viděli kromě 2-bromfenolu (172 a 174 m/z) také další ionty (nečistoty). Z obrázku 16 je vidět, že 2-bromfenol je schovaný (překrytý) dalšími 3 látkami (koeluce).



Obrázek 16: Derivatizovaný Lagavulin, TIC

Tentýž vzorek byl změřen i v módu monitorování selektivních iontů (SIMu). Následně byl změřen také vzorek se standardním přídatkem. Z obrázku 17 lze

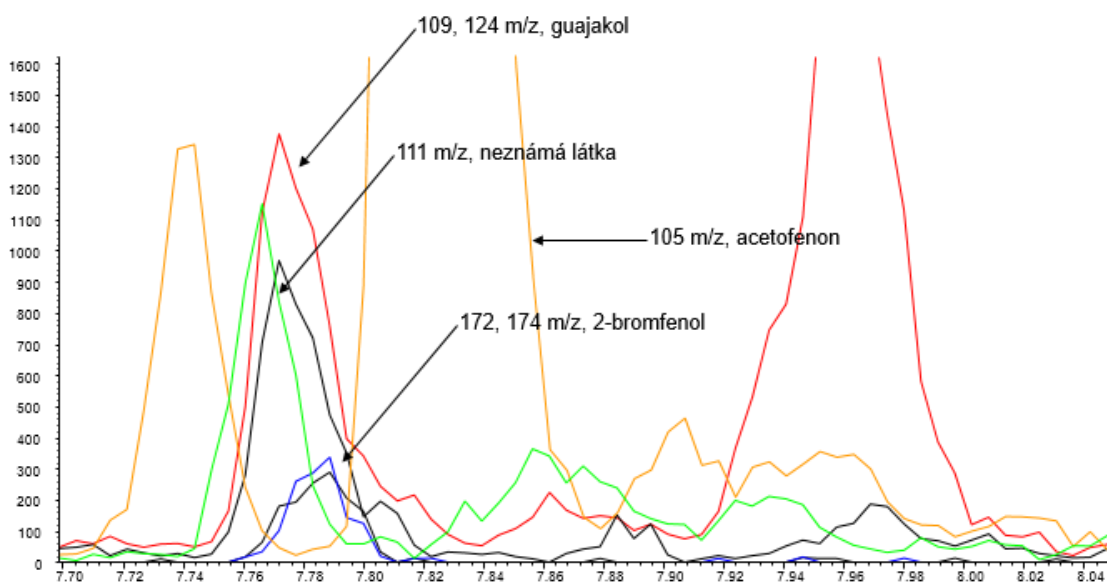
vypozorovat, že po přidání standardního přídatku došlo ke zvětšení píku. Tudíž tento přídatek potvrzuje, že se jedná o 2-bromfenol.



Obrázek 17: Derivatizovaný Lagavulin, SIM (174 m/z)

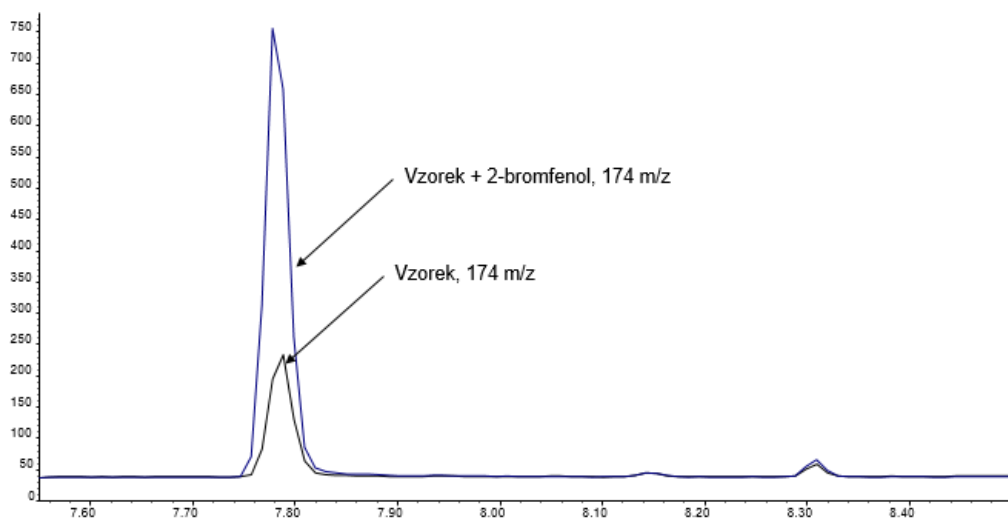
4.4.2 Vzorek bez derivatizace

Pro potvrzení byl proveden jednodušší experiment bez derivatizace. Vzorek bez standardního přídatku byl změřen v celkovém iontovém proudu (TICu). Z obrázku 18 můžeme vypozorovat, že 2-bromfenol se nachází v koeluci s dalšími látkami.



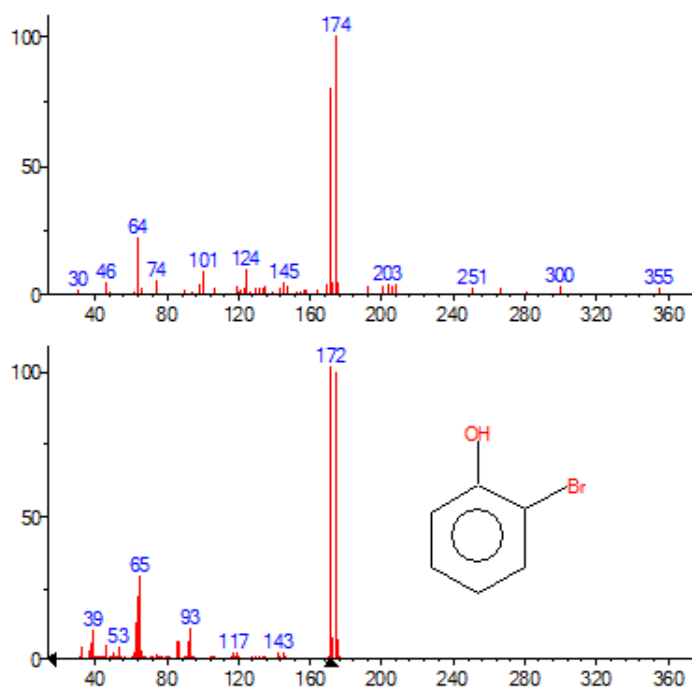
Obrázek 18: Nederivatizovaný Lagavulin, TIC

Vzorek bez derivatizace a vzorek se standardním přídatkem byl změřen i v módu SIM. Z obrázku 19 lze vidět, že po přidání standardního přídatku se zvětší pík. Zvětšení signálu potvrzuje, že se jedná o 2-bromfenol.



Obrázek 19: Nederivatizovaný Lagavulin, SIM (174 m/z)

Spektrum nederivatizovaného vzorku (obrázek 20), které bylo dobře očištěno od koelujících složek bylo přiřazeno 2-bromfenolu. Když se stejný postup aplikoval na acetáty, tak se nepodařilo spektrum očistit od koelujících složek.



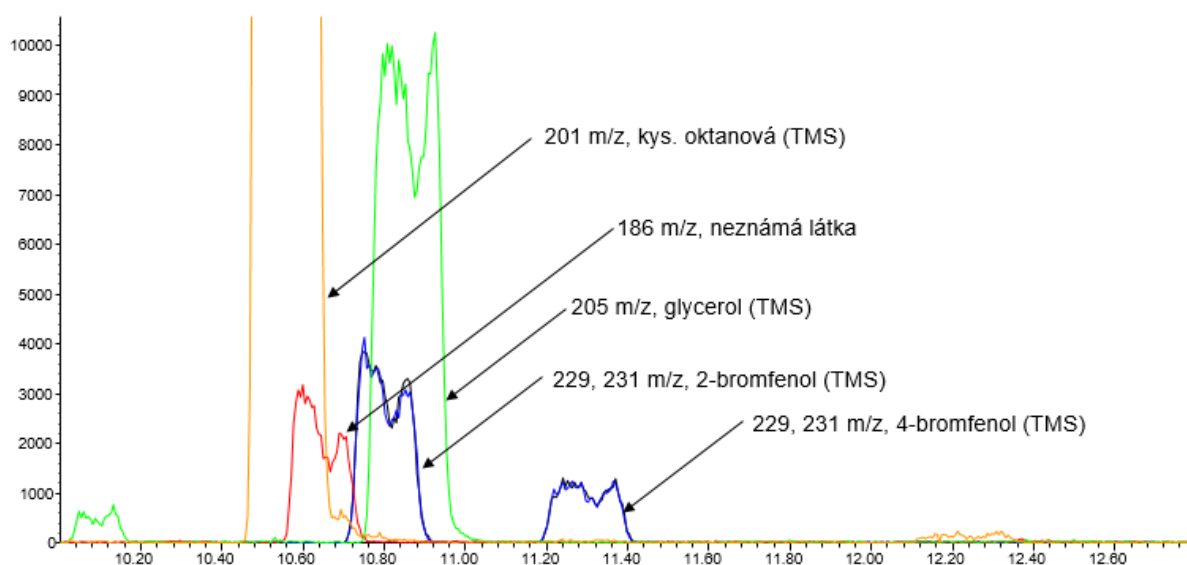
Obrázek 20: Hmotnostní spektrum 2-bromfenolu
(nahore- změřené spektrum, dole- spektrum z knihovny spekter)

Koncentrace 4-bromfenolu ve vzorku Lagavulin byla o dva řády nižší než koncentrace 2-bromfenolu. Díky nízké koncentraci se nepodařilo nederizovatelný 4-bromfenol v módu celkového iontového proudu (TICu) identifikovat. Ale po přidání standardního přídatku v SIMu se 4-bromfenol choval stejně jako 2-bromfenol.

4.4.3 Silylace

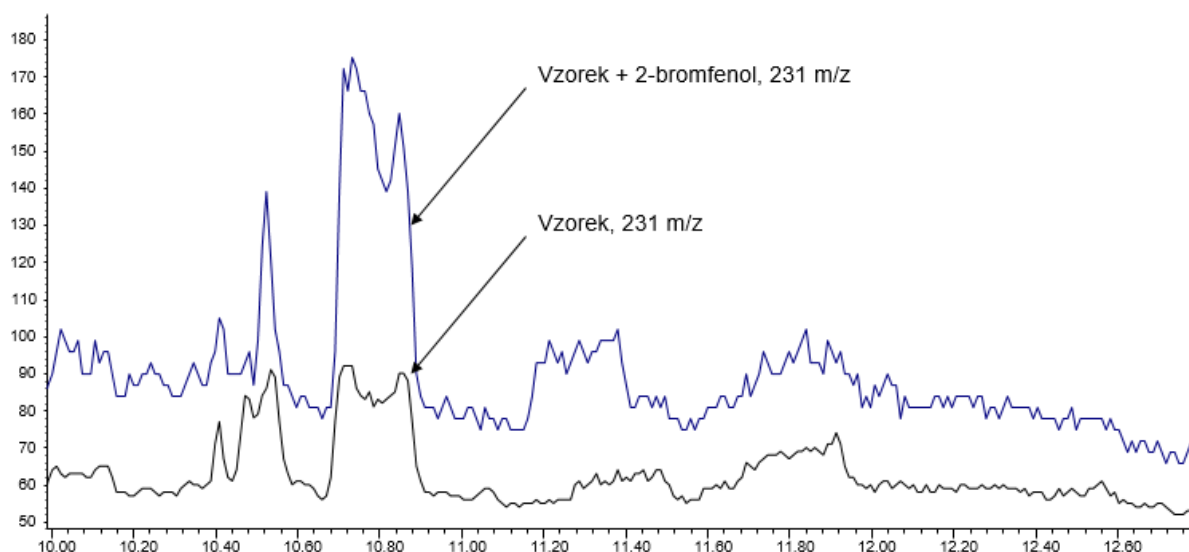
Vzorek whisky Lagavulin po derivatizaci (silylaci) byl změřen v celkovém iontovém proudu. V TICu bez standardního přídatku a se standardním přídatkem 0,005 $\mu\text{g/ml}$ díky vysoké koeluci nelze nic prokázat. Až při větším standardním přídatku 1 $\mu\text{g/ml}$ lze dokázat přítomnost 2-bromfenolu (obrázek 21).

Z obrázku lze vidět, že pík 2-bromfenolu je překryt z pravé strany glycerolem a z levé strany kyselinou oktanovou a neznámou látkou.



Obrázek 21: Derivatizovaný (TMS) Lagavulin + STD (1 $\mu\text{g/ml}$), TIC

Tentýž vzorek byl změřen i v módu SIM společně se vzorkem, k němuž byl přidán standardní přídatek. Z obrázku 22 lze vypožorovat, že po přidání standardního přídatku došlo opět ke zvětšení píku. Tudíž tento přídatek potvrzuje, že se jedná o 2-bromfenol.



Obrázek 22: Derivatizovaný (TMS) Lagavulin, SIM (231 m/z)

Tyto vzorky byly změřeny optimálními podmínkami pro analýzu acetátu. Pro acetáty máme optimalizované podmínky pro chromatografickou analýzu. Z chromatogramu lze vidět, že se píky štěpí. Kdyby se optimalizovaly podmínky pro silylaci, tak by došlo k lepšímu zafokusování vzorku.

4.5 Kvantitativní vyhodnocení

Pro kvantitativní vyhodnocení byla vyzkoušena metoda vnitřního standardu a metoda standardního přídatku.

4.5.1 Kvantitativní vyhodnocení pomocí metody vnitřního standardu

Při metodě vnitřního standardu se ke vzorku přidává určité množství látky tzv. vnitřního standardu. Vnitřní standard nesmí být obsažen ve vzorku. Výhodou této metody je to, že není třeba znát přesný objem nástřiku vzorku.

Pro kvantifikaci musely být vypočítány odezвовé faktory pro stanovené bromované fenoly (tabulka 5).

V této práci byl jako vnitřní standard použit m-nitrofenol.

Tabulka 5: Odezvové faktory

	Odezvový faktor	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka (%)
2-bromfenol	0,1459	0,0037	2,49
4-bromfenol	0,1018	0,0011	1,04
2,6-dibromfenol	0,1329	0,0007	0,54
2,4-dibromfenol	0,0997	0,0006	0,68
3,5-dibromfenol	0,1272	0,0022	1,76
2,4,6-tribromfenol	0,1229	0,0027	2,21

4.5.2 Kvantitativní vyhodnocení metodou standardního přídatku

Při použití metody standardního přídatku se ke známému množství vzorku přidává definované množství standardu látky, jejíž obsah se má stanovovat. Toto stanovení může být založeno na jednom až několika přídavech. Z plochy píku látky obsažené ve vzorku a plochy píku po přídatku standardní látky ke vzorku lze vypočítat obsah látky v původním vzorku.

4.6 Kvantitativní vyhodnocení reálných vzorků

Výsledky reálných vzorků jsou uvedeny v tabulkách. Pro vyhodnocení byla použita metoda vnitřního standardu (tabulka 6) a také metoda standardního přídatku (tabulka 7). Při metodě vnitřního standardu byla použita korekce na odezvový faktor.

Tabulka 6: Vyhodnocení reálných vzorků metodou vnitřního standardu (ng/L)

	PŮVOD	2-brom.	4-brom.	2,6-dibr.	2,4-dibr.	3,5-dibr.	2,4,6-tribr.
1	Islay, Skotsko	20217	135	760	96	n.d.	166
2	Islay, Skotsko	7237	88	252	91	47	593
3	Islay, Skotsko	11553	358	581	72	64	892
4	Islay, Skotsko	1066	92	n.d.	96	167	265
5	Islay, Skotsko	779	470	137	189	502	1996
6	Islay, Skotsko	18160	76	659	139	64	768
7	Islay, Skotsko	24020	86	956	116	n.d.	548
8	Islay, Skotsko	22188	82	867	81	n.d.	267
9	Islay, Skotsko	30331	233	1215	117	n.d.	680
10	Islay, Skotsko	22166	84	925	185	n.d.	545
11	Islay, Skotsko	16986	79	584	168	n.d.	540
12	Islay, Skotsko	37704	154	1517	123	n.d.	1241
13	Islay, Skotsko	2527	174	147	107	34	340
14	Speyside, Skotsko	287	100	n.d.	133	n.d.	513
15	Skye, Skotsko	7152	168	432	147	n.d.	517

Tabulka 7: Vyhodnocení reálných vzorků metodou standardního přídatku (ng/L)

	PŮVOD	2-brom.	4-brom.	2,6-dibr.	2,4-dibr.	3,5-dibr.	2,4,6-tribr.
1	Islay, Skotsko	4422	59	225	42	n.d.	78
2	Islay, Skotsko	1236	31	64	30	15	239
3	Islay, Skotsko	1880	119	136	20	15	254
4	Islay, Skotsko	175	31	n.d.	23	34	60
5	Islay, Skotsko	109	131	25	42	93	433
6	Islay, Skotsko	4205	37	235	65	27	427
7	Islay, Skotsko	3479	28	220	37	n.d.	225
8	Islay, Skotsko	3997	31	208	26	n.d.	93
9	Islay, Skotsko	4572	71	276	37	n.d.	264
10	Islay, Skotsko	13457	60	439	120	n.d.	440
11	Islay, Skotsko	3336	33	178	73	n.d.	298
12	Islay, Skotsko	4573	39	270	31	n.d.	378
13	Islay, Skotsko	345	51	30	30	9	113
14	Speyside, Skotsko	42	29	n.d.	29	n.d.	116
15	Skye, Skotsko	937	44	78	32	n.d.	114

5 ZÁVĚR

Cílem této práce byla optimalizace postupů a parametrů analýzy pro stanovení bromovaných fenolů ve skotské whisky z ostrova Islay. Fenoly byly derivatizovány anhydridem kyseliny octové a extrahovány hexanem. Následně byly fenoly stanoveny plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií.

Práce se nejprve zabývá optimalizací derivatizace. Konkrétně vlivu teploty a času na derivatizaci. Dále se práce zabývá optimalizací podmínek pro chromatografickou analýzu. Byla provedena optimalizace nástřiku, teplotního programu, objemu extrakčního činidla a slepých pokusů.

Ve vzorcích bylo stanoveno velké množství 2-bromfenolu. Proto se práce zabývá potvrzením identity 2-bromfenolu. Bylo zjištěno, že 2-bromfenol se nachází v koeluci s dalšími látkami.

Pro kvantitativní vyhodnocení bromfenolů ve whisky byla použita metoda vnitřního standardu a metoda standardního přídatku. Jako vnitřní standard byl použit m-nitrofenol. Metoda vnitřního standardu poskytuje vyšší výsledky než metoda standardního přídatku. Pravděpodobně správnější metoda je metoda standardního přídatku. Tato metoda poskytla nejvyšší koncentraci bromfenolů 440 ng/L s výjimkou 2-bromfenolu, kde byla stanovena koncentrace až 13 557 ng/L.

6 LITERATURA

- [1] M. Lehtonen. Phenols in whisky. *Chromatographia*. 1982, **16**(1), 201–203.
- [2] M. Naczka a F. Shahidi. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*. 2004, **1054**(1–2), 95–111.
- [3] S. van Beek a F. G. Priest. Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. 2000, **66**(12), 5322–5328.
- [4] R. G. Berger. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, New York, 2007.
- [5] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/787 o definici, popisu, obchodní úpravě a označování lihovin, používání názvů lihovin v obchodní úpravě a při označování jiných potravin, ochraně zeměpisných označení lihovin, používání lihu a destilátů země, 2019. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0122&from=CS>.
- [6] H. McGee. *On food and cooking: The science and lore of the kitchen*. Scribner, New York, 2004.
- [7] J. Pino, S. Tolle, R. Gök a P. Winterhalter. Characterisation of odour-active compounds in aged rum. *Food Chem.* 2012, **132**(3), 1436–1441.
- [8] J. K. S. Møller, R. R. Catharino a M. N. Eberlin. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: Immediate proof of origin and authenticity. *Analyst*. 2005, **130**(6), 890–897.
- [9] R. Aylott. Whisky analysis. In: I. Russell, G. Stewart (Ed.) *Whisky: Technology, Production and Marketing*. Academic Press, Amsterdam, 2014.
- [10] P. Wiśniewska, T. Dymerski, W. Wardencki a J. Namieśnik. Chemical composition analysis and authentication of whisky. *J. Sci. Food Agric.* 2015, **95**(11), 2159–2166.
- [11] B. White, M. R. Smyth a C. E. Lunte. Determination of phenolic acids in a range of Irish whiskeys, including single pot stills and aged single malts, using capillary electrophoresis with field amplified sample stacking. *Anal. Methods*. 2017, **9**(8), 1248–1252.
- [12] I. Caldeira, O. Anjos, V. Portal, A. P. Belchior a S. Canas. Sensory and chemical modifications of wine-brandy aged with chestnut and oak wood fragments in comparison to wooden barrels. *Anal. Chim. Acta*. 2010, **660**, 43–52.
- [13] S.A. Savchuk, V. N. Vlasov, S. A. Appolonova, V. N. Arbuzov, A. N. Vedenin, A. B. Mezinov a B. R. Grigor'yan. Application of chromatography and spectrometry to the authentication of alcoholic beverages. *J. Anal. Chem.* 2001, **56**(3), 214–231.
- [14] R. C. Agu, T. A. Bringhurst a J. M. Brosnan. Production of grain whisky and ethanol from wheat, maize and other cereals. *J. Inst. Brew.* 2006, **112**(4), 314–323.
- [15] S. van Beek a F. G. Priest. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation : a polyphasic study. 2002, **68**(1), 297–305.

- [16] C. Roullier-Gall, J. Signoret, D. Hemmler, M. A. Witting, B. Kanawati, B. Schäfer, R. D. Gougeon a P. Schmitt-Kopplin. Usage of FT-ICR-MS Metabolomics for characterizing the chemical signatures of barrel-aged whisky. *Front. Chem.* 2018, **6**(2), 1–11.
- [17] L. Poisson a P. Schieberle. Characterization of the most odor-active compounds in an American Bourbon whisky by application of the aroma extract dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2008, **56**(14), 5813–5819.
- [18] <http://www.irz.cz/latky/fenoly>, citace 8.10.2019.
- [19] J. S. Câmara, J. C. Marques, R. M. Perestrelo, F. Rodrigues, L. Oliveira, P. Andrade a M. Caldeira. Comparative study of the whisky aroma profile based on headspace solid phase microextraction using different fibre coatings. *J. Chromatogr. A.* 2007, **1150**(1–2), 198–207.
- [20] J. R. Mosedale a J. L. Puech. Wood maturation of distilled beverages. *Trends Food Sci. Technol.* 1998, **9**(3), 95–101.
- [21] S. Canas, A. P. Belchoir, M. I. Spranger a R. Bruno-De-Sousa. High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J. Sep. Sci.* 2003, **26**(6–7), 496–502.
- [22] L. Culleré, B. Fernández de Simón, E. Cadahía, V. Ferreira, P. Hernández-Orte a J. Cacho. Characterization by gas chromatography-olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. *LWT - Food Sci. Technol.* 2013, **53**(1), 240–248.
- [23] M. De Rosso, D. Cancian, A. Panighel, A. Dalla Vedova a R. Flamini. Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: Volatile compounds and polyphenols. *Wood Sci. Technol.* 2009, **43**(5–6), 375–385.
- [24] I. Caldeira, A. M. Mateus a A. P. Belchior. Flavour and odour profile modifications during the first five years of Lourinhã brandy maturation on different wooden barrels. *Anal. Chim. Acta.* 2006, **563**(1-2 SPEC. ISS.), 264–273.
- [25] A. Glabasnia a T. Hofmann. Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *J. Agric. Food Chem.* 2006, **54**(9), 3380–3390.
- [26] M. L. Morales, B. Benitez a A. M. Troncoso. Accelerated aging of wine vinegars with oak chips: Evaluation of wood flavour compounds. *Food Chem.* 2004, **88**(2), 305–315.
- [27] M. De Rosso, A. Panighel, A. D. Vedova, L. Stella a R. Flamini. Changes in chemical composition of a red wine aged in acacia, cherry, chestnut, mulberry, and oak wood barrels. *J. Agric. Food Chem.* 2009, **57**(5), 1915–1920.
- [28] B. Harrison, J. Ellis, D. Broadhurst, K. Reid, R. Goodacre, F. G. Priest a J. I. Brew. Differentiation of peats used in the preparation of malt for Scotch whisky production using fourier transform infrared spectroscopy. *J. Inst. Brew.* 2006.

- [29] B. M. Harrison a F. G. Priest. Composition of peats used in the preparation of malt for scotch whisky production s influence of. J. Agric. Food Chem. 2009, (1), 2385–2391.
- [30] <https://whiskytasting.webnode.cz/news/whisky-a-raselina/>, citace 9.3.2020.
- [31] P. Bendig, K. Lehnert a W. Vetter. Quantification of bromophenols in Islay whiskies. J. Agric. Food Chem. 2014, **62**(13), 2767–2771.
- [32] J. B. Adams, S. J. Lock, M. R. Toward a B. M. Williams. Bromophenol formation as a potential cause of „disinfectant" taint in foods. Food Chem. 1999, **64**(3), 377–381.
- [33] F. B. Whitfield, K. J. Shaw a D. I. Walker. The source of 2,6-dibromophenol: Cause of an iodoform taint in Australian prawns. Water Sci. Technol. 1992, **25**(2), 131–138.
- [34] G. N. Bathgate a A. G. Taylor. The qualitative and quantitative measurement of peat smoke on distiller's Malt. J. Inst. Brew. 1977, **83**(3), 163–168.
- [35] A. Martinez-Gomez, I. Caballero a C. A. Blanco. Phenols and melanoidins as natural antioxidants in beer. Structure, reactivity and antioxidant activity. Biomolecules. 2020, **10**(3).
- [36] C. Macfahlane, B. Sc. a F.R.I.C. The estimation and identification of phenols in malt from peat-fired kilns and some applications of the analysis. J. Inst. Brew. 1968, **74**, 272–275.
- [37] P. Klouda. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. 2003.
- [38] K. Sugibayashi, H. Sekiya a K. Nishimura. Colorimetric determination of phenols in peated malts using a modified Kleber's method. J. Inst. Brew. 1983, **89**(2), 75–80.
- [39] Ch. M. Ng a W. M. Reuter. Analysis of phenols in whisky using HPLC with FL detection. PerkinElmer. 2015, 1–5.
- [40] Ch. Maclean. World whiskey. Dorling Kindersley, Londýn, 2009.
- [41] <https://www.skotska-whisky.cz/skotsko-ostrov-islay/>, citace 9.5.2020.
- [42] M. Jackson. Complete guide to single malt Scotch. Dorling Kindersley, Londýn, 2015.
- [43] <https://www.thewhiskyexchange.com/b/40/finlaggan-single-malt-scotch-whisky>, citace 5.5.2020.
- [44] M. Jackson. Malt whisky companion. Dorling Kindersley, Londýn, 2004.
- [45] <https://www.thewhiskyexchange.com/b/40/finlaggan-single-malt-scotch-whisky>, citace 3.5.2020.
- [46] <https://www.e-whisky.cz/160-macduff-islay-mist-de-luxe-40/>, citace 13.5.2020.
- [47] <https://www.thewhiskyexchange.com/p/22579/scallywag-speyside-blended-malt>, citace 13.5.2020.