

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

ANALÝZA LAKTONŮ V POTRAVINÁCH

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Karolina Morcinková

Studijní obor: Analytická chemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2021

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá analýzou tří laktonů (whisky laktonu, sotolonu a vinného laktonu) v alkoholických nápojích. Všechny vybrané analyty byly analyzovány ve vzorcích plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

Cílové látky vyžadovaly podle své povahy rozdílné zpracování vzorku a způsob izolace z matrice. Pro stanovení whisky laktonu v reálných vzorcích byla provedena pouze extrakce analytu vhodným rozpouštědlem. V případě sotolonu byla vyžadována derivatizace z důvodu přítomnosti hydroxylové skupiny na molekule. Byly vyzkoušeny experimenty s derivatizačními činidly N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidem a acetanhydridem. Při pokusu o stanovení vinného laktonu byla provedena frakcionace na silikagelové koloně, neboť bez frakcionace docházelo k překrytí možného píku vinného laktonu ethylesterem kyseliny dekanové a kyselinou dekanovou. Frakcionace tak zajistila rozdělení těchto látek mezi jednotlivé frakce a lepší vzájemnou separaci.

Dále byly sledovány podmínky, které ovlivňují výtěžnost extrakce a odezvu analytů. V případě whisky laktonu se jednalo o typ extrakčního činidla. U sotolonu byl pozorován vliv vysolení, volby extrakčního a derivatizačního činidla, velikosti nástřiku, teploty nástřiku a teploty kolony na začátku analýzy. Velmi zajímavým zjištěním byl pozitivní vliv přídavku balastních látek (diethylesteru kyseliny jantarové, 2-fenylethanolu a tyrosolu) do vzorku portského vína na velikost odezvy sotolonu. Při snaze o stanovení vinného laktonu ve víně byl sledován vliv poměru rozpouštědel pro eluci látek ze silikagelové kolonky.

SUMMARY

This study is focused on analysis of three lactones (whiskey lactone, sotolone and wine lactone) in alcoholic beverages. All of these analytes were determined by gas-chromatography mass spectrometry.

Target compounds required different processing of samples and form of isolation from matrix. Simple extraction by suitable solvent was needed for the determination of whiskey lactone. In the case of sotolone the derivatization was required because of hydroxy group in its molecule. Some experiments with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and acetic anhydride as derivatization reagents were made. The possible peak of wine lactone was probably overlapped by ethyl decanoate and decanoic acid, therefore the fractionation on silica gel column was tried for the determination of this lactone. Fractionation provided distribution of these compounds between fractions and better mutual separation.

Conditions which influence the yield of extraction and the determination of the analyte were also observed. In the case of whiskey lactone, the type of extraction reagent was studied. Influence of salting, type of extraction and derivatization reagents, injected volume, temperature of injection and temperature of column at the beginning of the analysis were observed in the analysis of sotolone. Very interesting finding was the positive influence of ballast substances addition (diethyl succinate, tyrosol, 2-phenylethanol) on the response of the sotolone in port wine. The solvents ratio effect on the elution of substances from silica gel column was observed for the determination of the wine lactone.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma **Analýza laktonů v potravinách** vypracovala samostatně. Využila jsem pouze literární prameny, které uvádím v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má diplomová 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:

.....

Vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Petru Bartákovi za trpělivost, odborný dohled a mnoho užitečných rad, které mi poskytl při psaní této práce.

Poděkování patří také mé rodině a blízkým za podporu a vytvoření ideálních podmínek ke studiu.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2020_030 a IGA_PrF_2021_021).

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 LAKTONY	10
2.2 VÝSKYT LAKTONŮ V ALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH.....	10
2.2.1 Víno	10
2.2.2 Whisky	12
2.2.3 Koňak.....	14
2.3 PŘEHLED ZKOUMANÝCH LAKTONŮ.....	15
2.3.1 Whisky lakton	15
2.3.2 Sotolon	16
2.3.3 Vinný lakton	18
2.4 CHEMICKÁ SEPARACE A ANALÝZA LAKTONŮ V ALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH.....	18
2.4.1 Derivatizace	18
2.4.1.1 Derivatizace v kapalinové chromatografii	19
2.4.1.2 Derivatizace v plynové chromatografii	20
2.4.2 Kapalinová chromatografie.....	21
2.4.2.1 Analýza sotolonu.....	22
2.4.3 Plynová chromatografie	23
2.4.3.1 Analýza whisky laktonu.....	23
2.4.3.2 Analýza sotolonu.....	23
2.4.3.3 Analýza vinného laktonu	24
2.4.4 Kapilární elektroforéza	24
2.4.4.1 Analýza sotolonu.....	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 PŘÍSTROJOVÉ POMŮCKY A VYBAVENÍ.....	26
3.2 CHEMIKÁLIE	26
3.2.1 Derivatizační činidla	26
3.2.2 Standardy.....	26
3.2.3 Rozpouštědla.....	26
3.2.4 Analyzované vzorky.....	27
3.2.5 Ostatní chemikálie	28

3.3 PRACOVNÍ POSTUPY	28
3.3.1 Příprava roztoků standardů	28
3.3.2 Stanovení whisky laktonu	28
3.3.3 Stanovení sotolonu	28
3.3.3.1 Klasická a fortifikovaná vína	29
3.3.3.2 Koňak a whisky	29
3.3.4 Stanovení vinného laktonu	29
3.4 EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY	30
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1 WHISKY LAKTON	32
4.1.1 Určení cis a trans izomerů whisky laktonu	32
4.1.2 Volba extrakčních činidel	33
4.1.3 Ověření opakovatelnosti whisky laktonu ve vzorku Claude Chatelier	34
4.1.4 Vyhodnocení množství whisky laktonu v analyzovaných vzorcích	36
4.2 SOTOLON	40
4.2.1 Volba derivatizačních činidel	40
4.2.2 Volba extrakčních činidel	43
4.2.3 Vliv velikosti nástřiku vzorku na tvar píků	45
4.2.4 Vliv vysolení na výtěžnost extrakce	48
4.2.5 Vliv počáteční teploty kolony a teploty nástřiku na opakovatelnost	48
4.2.6 Vliv přídatku balastních látek na velikost odezvy sotolonu	53
4.2.7 Vyhodnocení množství sotolonu v analyzovaných vzorcích	63
4.3 VINNÝ LAKTON	64
4.3.1 Odhad retenčního času vinného laktonu pomocí retenčních indexů	64
4.3.2 Identifikace vinného laktonu dle poměru intenzit iontů 166, 151, 123, 93 m/z . 65	
4.3.3 Frakcionace na silikagelové koloně	66
4.3.4 Volba poměru rozpouštědel pro frakcionaci	68
5. ZÁVĚR	70
6. LITERATURA	72
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	76

1. ÚVOD

Laktony jsou produkty kondenzace hydroxylové a karboxylové skupiny ve struktuře hydroxykarboxylové kyseliny. Mohou být vyráběny i komerčně biotechnologickými procesy za použití kvasnic. Chemická struktura ovlivňuje jejich sensorické a chemické vlastnosti. Více než 100 různých laktonů je uznáno jako aromatické přísady, mezi takové patří například gamma-hexalakton se sladkou, kokosovou, bylinnou příchutí, nebo gamma- a delta-dekalakton s ovocným, oříškovým, mléčným a broskvovým aroma. V přírodě se vyskytují převážně nasycené a nenasycené gamma- a delta-laktony s nepatrným zápachem/vůní. [34, 35]

V alkoholických nápojích jako jsou whisky, koňak, klasická, fortifikovaná a bariková vína hrají laktony velmi důležitou roli a přispívají k typickému aroma nápoje. Některé laktony například whisky lakton se vyskytují v dubovém dřevě a jejich obsah v nápoji se zvyšuje s dobou zrání v sudu. Koncentrace laktonů v alkoholických nápojích je velmi nízká, proto je při stanovení těchto látek vyžadována prekoncentrace. V některých případech postačí jednoduchá extrakce laktonu ze vzorku do vhodného rozpouštědla. Tento snadný postup byl aplikován při stanovení whisky laktonu v reálných vzorcích. Jiné laktony naopak vyžadují kromě extrakce také derivatizaci, která vede ke zvýšení těkavosti, popřípadě tepelné stability analytů v důsledku snížení polarit. Vhodným laktonem, při jehož stanovení se uplatnil proces derivatizace, je sotolon, neboť ve své molekule obsahuje hydroxylovou skupinu. Záměnou aktivního vodíku polární skupiny za alkylovou, silylovou nebo acylovou skupinu dojde ke vzniku derivátu. Derivatizace může být uskutečněna před extrakcí analytu, nebo až po ní, například acetylace sotolonu acetanhydridem se provádí před extrakcí a následně je vytvořený derivát extrahován do vhodného rozpouštědla, zatímco silylace tohoto laktonu N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidem je z důvodu nízké hydrolytické stability činidla provedena až po extrakci rozpouštědlem. Velmi často používanou možností prekoncentrace je extrakce tuhou fází (SPE). Tato metoda se používá především pro izolaci analytů z kapalné matrice, nebo pro přečištění extraktů. Principem SPE je dělení látek mezi dvě nemísitelné fáze pevnou a kapalnou. Dnes je k dispozici velké množství sorbentů, mezi ty nejčastěji používané patří silikagel, chemicky modifikovaný silikagel, polymerní sorbenty, grafitizovaný nebo porézní uhlík. Volba sorbentu závisí na mechanismu interakce mezi sorbentem a sledovaným analytem. Nejběžnější retenční mechanismy v SPE jsou založeny na van der Waalových silách, vodíkových vazbách, dipól-dipólových interakcích

a interakcích kation-anion. Pro extrakci tuhou fází je k dispozici široká škála rozpouštědel různé polarity, vhodnou volbou rozpouštědla je možné oddělit balastní látky od analytu. Pro izolaci vinného laktonu z extraktu vína byla použita extrakce tuhou fází, jako vhodný sorbent byl zvolen silikagel. Jelikož se při analýze samotného extraktu vína současně eluoval pravděpodobný vinný lakton a další dvě složky matrice (ethylester kyseliny dekanové a kyselina dekanová), bylo nutné od sebe tyto tři látky oddělit. Vhodným řešením by mohla být frakcionace, která při správné volbě rozpouštědel umožní vymýt složky extraktu ze silikagelové kolonky, aby frakce s analytem neobsahovala balastní látky se stejným nebo podobným retenčním časem, jako má analyt. [11, 35, 38]

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Laktony

Laktony jsou cyklické intramolekulární estery hydroxykyselin. Dělí se dle počtu atomů uhlíku přítomných mezi karboxylovou skupinou a uhlíkem, na který je vázána hydroxylová skupina. Nejrozšířenějšími skupinami jsou γ -laktony, δ -laktony a makrocyclické laktony, přičemž γ -laktony a δ -laktony vznikají dehydratací příslušných hydroxykyselin, zatímco dehydratací β -hydroxykyselin nevznikají β -laktony, ale α , β -nenasycené kyseliny. Mnoho laktonů obsahuje ve své struktuře alespoň jedno chirální centrum, takže se tyto látky vyskytují ve formě izomerů. Jednotlivé optické izomery se mohou lišit jak chutí a vůní, tak biologickou aktivitou. [6,13]

Převážně γ -laktony, δ -laktony a makrocyclické laktony mají obrovský význam v potravinářském průmyslu a také v průmyslu vonných a chuťových látek. Například γ -butyrolakton má nasládlou vůni připomínající máslo, γ -nonalakton má chuť podobnou kokosovému ořechu, γ -dekalakton má ovocnou vůni a δ -dekalakton připomíná broskve a je složkou aromatu malin a kokosu. [6,13]

2.2 Výskyt laktonů v alkoholických nápojích

Velmi významné jsou laktony odvozené od větvených alifatických hydroxykyselin. Důležitou složkou aromatu některých vín a také destilátů, které zrají v dubových sudech je tzv. whisky lakton, někdy nazývaný jako koňakový či dubový lakton. Ve vínech se také vyskytuje 3a,4,5,7a-tetrahydro-3,6-dimethylbenzofuran-2-on (vinný lakton) a γ -lakton 5-oxohexano-4-lakton (soleron), jehož vůně víno připomíná. Vína typu sherry obsahují 5-hydroxyhexano-4-lakton (sherylakton) a významnou složkou aromatu těchto vín je 3-hydroxy-4,5-dimethyl-(5H)-furan-2-on (sotolon). [13]

2.2.1 Víno

Není možné zcela určit, kdy bylo víno poprvé vyrobeno, neboť na rozdíl od tvrdého alkoholu může vzniknout i přirozeně. Hrozny obsahují cukr, kyseliny a aromatické látky. Aby se cukr přeměnil na alkohol, jsou zde potřebné kvasinky. Po spadnutí zralého hroznu na zem a prasknutí slupky vyteče šťáva ven a dostane se do styku s kvasinkami ve vzduchu,

tím vznikne něco, co by se dalo nazývat vínem. Už staří Řekové považovali víno za základ jejich kultury a stalo se součástí jejich každodenního života. [19,20]

Na jakost a celkový styl vína mají nepochybně vliv fyzikální vlastnosti půdy. Kvalitní vína dávají keře, které rostou na poměrně chudých půdách, jež podporují růst kořenů. Důležitá je také vláha, révové keře potřebují odvodněné půdy, které jsou zároveň schopny zadržet vodu v hloubce, aby z ní mohly čerpat vodu. [21]

Rozhodující je doba sběru hroznů, ty musí být vyzrálé, stupeň zralosti se liší víno od vína. Zralost hroznů lze zjistit stanovením obsahu cukru, který v nich vzniká vlivem fotosyntézy, a jeho množství se obvykle zjistí pomocí refraktometru. Sklizené hrozny se v podniku nejdříve jemně pomelou, aby se uvolnila šťáva, ale nepoškodila se semena, která obsahují hořké silice. Po drcení následuje lisování, mošt z prvního lisování je nejkvalitnější a má také nejjemnější chuť, při dalším lisování vzniká mošt s hořkou chutí. Ještě před samotným lisováním vyteče volně velká část, tzv. samotok. K výrobě těch nejkvalitnějších vín se používá samotok a mošt z prvního lisování. Poté následuje čištění nebo číření této sladké šťávy, která se běžně nechává usadit přes noc v tancích. Po čištění následuje kvašení. Přírodní kvasinky, tedy přirozená mikroflóra vinic, dodávají vínu část svého charakteru, zatímco vyšlechtěné kvasné kultury nabízejí větší spolehlivost. Při kvašení jsou důležité dva faktory, které ovlivňují chuť vína – teplota a druh použité nádoby. Nízká teplota pomáhá zachovávat aromatické látky v hroznech, zatímco vyšší teplota urychluje biochemické reakce a fermentaci. Většina vín kvasí v inertních nádržích, v tancích z nerezové oceli, dřeva nebo betonu. Pokud chce vinař vyrobit sladké víno, musí použít speciální technologii. Kvasinky umírají, když obsahu alkoholu dosáhne asi 15 %, proto se při výrobě některých sladkých vín se kvašení zastavuje umělým zvýšením hladiny alkoholu, například při přípravě portského vína se přilije vinný líh. Levnější sladká vína bývají doslazena koncentrovaným hroznovým moštem. Po kvašení se víno nechává zrát v dřevěných sudech či ocelových tancích, dokud se vinař nerozhodne, že je připraveno k lahvování. Víno vhodné ke stárnutí většinou zraje v dubových sudech 18 měsíců až 2 roky. Sudy se používají především kvůli pomalé oxidaci, jež spolu s aromatickými látkami a tříslovinami z dubu dává vínu exkluzivní komplexnost. Výrobci červeného vína se musí soustředit na extrakci barvy ze slupek, zatímco u bílého vína je důležité zachovat jemné primární aromatické látky. [19, 20]

Technologie fortifikovaných neboli dolihovaných vín u nás není velmi rozšířena, ale je všeobecně známá po celém světě. Do této kategorie patří například portugalské portské a madeira, španělské sherry či sicilská marsala. Spadají sem všechna vína s přídavkem alkoholu, ať už sladké, suché, bílé či červené. Existují tři metody dolihování, a to tzv.

mutage, časně a pozdní dolihování. Při první z uvedených metod se alkohol přidává do čerstvě vylisovaného moštu, tím se úplně zabrání kvašení a výsledkem je sladký silně alkoholický nápoj. U časného dolihování se alkohol do moštu přidává až po začátku kvašení, např. v případě portského se alkohol přidává během fermentace, když víno dosáhne 6–8 % obj. alkoholu. Pozdní dolihování se provádí přidavkem alkoholu až po ukončení fermentace, tímto způsobem je vyráběno např. víno typu sherry. Běžná tichá vína obsahují 8,5–15 % obj. alkoholu, zatímco fortifikovaná vína 16–24 %. Příčinou vzniku těchto vín byly nedokonalé podmínky při lodní přepravě vína do zemí spotřeby. Vína v dřevěných sudech se často při převozu kazila, proto bylo potřeba je dolihovat, zvýšením obsahu alkoholu došlo k zakonzervování vína proti nežádoucímu druhotnému kvašení. [29]

Konečnou kvalitu vína určuje bezesporu vinohrad. Pro dané typy vín jsou vhodné odlišné hrozny. Například pro svěží bílá vína neutrální chuti jsou vhodné sotva zralé, ale zdravé hrozny, zatímco sladká vína (např. Sauternes) vyžadují scvrklé „shnilé“ hrozny napadené ušlechtilou plísní šedou. Bílé hrozny potřebují k dozrání méně slunce než modré, proto pocházejí nejlepší bílá vína z chladnějších oblastí. [19]

2.2.2 Whisky

Tento destilát vyrobený z obilí podle irské a skotské tradice se dnes vyrábí i v jiných koutech světa, například v Severní Americe, kde se k výrobě používá třeba i rýže či kukuřice. Pro všechny whisky je charakteristická chuť po obilí, zatímco ostatní destiláty, které jsou také připravené z obilí, mají téměř neutrální chuť.

Whisky pouze z jedné palírny se označuje jako single nebo sladová, zatímco termín míchaná (blended) whisky, naznačuje, že jde o produkt z více sladových palíren. Sladová (malt) whisky se destiluje ze stoprocentního sladového ječmene a poté zraje v dubových sudech, konečný obsah alkoholu činí minimálně 40 %. Klasická whisky se vyrábí v přístroji tvaru kotle přerušovanou destilací. Díky periodicky pracujícímu destilačnímu přístroji se získává whisky s výraznějším aroma a chutí, než je tomu u nepřetržitě pracující kolonové destilace používané na výrobu obilné whisky. Obilná whisky se vyrábí z různých druhů obilí, například z kukuřice, pšenice nebo ječmene. [14,15]

Hlavními ingrediencemi pro výrobu whisky jsou voda, obiloviny a kvasinky. Skotské palírny používají převážně měkkou vodu, která je pro namáčení ječmene vhodnější, než voda tvrdá a také je v ní obsaženo méně minerálů. Názor na nejlepší obilovinu pro výrobu whisky se různí podle toho, v jaké části světa byla vyrobena. Ve Skotsku a Irsku se na slad zpracovává ječmen. Této obilovině se daří i na neúrodné, na dusík chudé půdě, což z ní činí

vhodnou plodinu pro přípravu sladu. Kromě stoprocentní žitné whisky nalezneme ječmen v různém množství v každém typu whisky a to z více důvodů, jednak chuťových, jednak fermentačních. Při výrobě whisky z nesladové pšenice nebo kukuřice postačuje pouhých 10 % ječmene k tomu, aby se rozběhla fermentace.

Žito se k výrobě whisky používá buď ve sladové či nesladové podobě v Severní Americe. Čistá žitná whisky se vyrábí například v Kentucky a podíl žita musí být alespoň 51 %. Aroma kvašeného žita je nejostřejší a nejpronikavější ze všech typů zápar a jeho barva je tmavší.

V minulosti se kukuřice používala velmi často ve všech palírnách světa, poté ji v některých palírnách vystřídala levnější pšenice, ale dnes už se obě suroviny cenou prakticky neliší. Kukuřice se nepoužívá jen k výrobě bourbonu, který ji musí podle zákona obsahovat minimálně 51 %, ale také při výrobě jemné, kontinuálně destilované whisky ve Skotsku a Irsku, která se přidává do míchaných whisky. Pšenice je při výrobě whisky druhořadou surovinou, která soupeří s rýží a kukuřicí o pozici hlavní přísady. Na počátku 19. století byl oves v amerických palírnách velmi oblíbený, to už je ale dávno minulostí. Výrobci whisky z ovsa museli být neustále ve střehu, neboť lepkavý charakter obiloviny s sebou přinášel nebezpečí, že se kotle ucpou a explodují.

Poslední nutnou ingrediencí pro výrobu whisky jsou kvasinky. Jedná se o katalyzátor, který přemění řídkou kaši v kotli překypující alkoholem. Kvasinky také dodávají whisky její typický charakter, např. hořký, sladký, mléčný či ovocný. Používají se levnější pivovarské a dražší palírenské kvasinky, které se míchají v různém poměru. Ty pivovarské se sbírají z povrchu kvasícího piva, přičemž kromě spuštění fermentace dodávají whisky další chutě.

Všechny postupy, kterými se vyrábí whisky (irské, bourbon, skotské, kanadské atd.), jsou si velmi podobné a zahrnují sladování, sušení, mletí, přípravu zápar, fermentaci, destilaci a zrání. Čerstvě sklizená zrna ječmene či jiné obiloviny obsahují vysoké množství škrobu, klíčením se škrob přeměňuje na cukry, které jsou klíčové k výrobě alkoholu. Zrna se nechávají po dobu 48–60 hodin ve studené, pravidelně vyměňované vodě, tímto procesem zrna bobtnají a zvětšují svůj objem. Podle délky klíčku usoudí sladovník, že obsah cukru v zrně dosáhl optimální hodnoty. Následuje sušení sladu, čímž se zamezí dalšímu růstu, který by vedl ke snížení obsahu cukru. Při sušení stoupá skrze rošt se zrnem horký kouř z ohně pod ním, tím se zrno nejen vysuší, ale i lehce opraží. Po sušení následuje mletí, které zajistí, aby se získalo co největší množství zkvasitelných substancí ze sladových i nesladových obilovin. Poté se zrna zalijí horkou vodou, do které se vyluhují všechny

fermentovatelné složky, tím vzniká tekutina s vysokým obsahem cukru, tzv. zápara. Při fermentaci, která trvá 40–72 hodin a někdy i déle, se k záparaře přidávají kvasinky a vzniká tzv. břečka. Aby se zjistilo, v jakém stadiu kvašení se tekutina nachází, provádí se její ochutnávání přímo z kádě. Sladká chuť naznačuje, že kvašení právě začalo a ještě nedošlo ke štěpení cukrů. Naopak pokud břečka zhořkne, blíží se fermentace ke konci, neboť kvasinky již veškerý cukr spotřebovaly. Následně se břečka napumpuje do destilačního zařízení. Velmi důležité je, aby destilátér při destilaci oddělil tu nejlepší část lihoviny, která vytéká z destilačního přístroje. Nejdříve teče z přístroje lihovina s nežádoucí příměsí, která by zkazila kvalitu whisky. Stejně tak je nevhodná i lihovina z konce destilace. Tento tzv. úkap a dokap se znovu predestilují, zatímco střední část je stočena do sudů, kde zraje. Proces zrání a jeho rychlost ovlivňuje i podnebí, v teplejších oblastech probíhá vše rychleji. Výsledná chuť lihoviny je ovlivněna i místem, kde se skladuje, ve vlhkých a větru vystavených budovách u moře získá whisky slaný charakter. Neopomenutelný vliv na chuť a barvu nápoje má také charakter dřeva, ve kterém whisky zraje. [16]

2.2.3 Koňak

Jedná se o nápoj s bohatou historií, je symbolem Francie a jejího životního stylu. Již ve 3. stol. nařídil císař Probus zakládání vinohradů v Galii. Na přelomu 12. a 13. století se vinohrady začaly rozšiřovat i do vnitrozemních regionů Saintonge a Angoumois. Už v této době bylo město Cognac známé pro svůj trh s vínem. Začala se vyrábět taková množství vína, že nebylo možné jej prodat. Navíc dlouhá cesta po moři snižovala kvalitu a chuť vína, proto se holandské obchodníky rozhodli jej destilovat. Přeměnili jej na tzv. brandwijn, čili pálené víno, odtud pochází již známý název brandy. Holandské pálené víno naředili vodou, čímž vytvořili původní víno. Na začátku 17. století se zavedla dvojitá destilace, která umožňovala, aby byl tento nápoj přepravován v neměnné kvalitě. Díky náhodě, která nastala při zdržení přepravy překládáním sudů z lodi na loď se zjistilo, že destilát získá plnější chuť zráním v dubových sudech. Brandy se prodávala buď jako „hnědý koňak“ (oslazený hnědým sirupem z melasy), nebo jako „světlý“ (bez přísad). Dnes se koňak vyváží do více než 150 zemí a pokládá se za nápoj velmi vysoké kvality. [17,18]

Výroba koňaku je složena z několika kroků – sběr hroznů, kvašení a destilace. Dnes se většina vinic sklízí pomocí strojů, přičemž se hrozny lisují. Během kvašení, které trvá zhruba 3 týdny, se nesmí přidávat cukr ani přísady zvyšující aciditu. Výsledkem je víno bez výrazné chuti s obsahem 8–9 % alkoholu, které je vhodné pro destilaci. Koňak je dvakrát destilován v destilačních kotlích, které se používají i k výrobě sladové whisky. Při pálení se obvykle

používají měděné destilátory. Nefiltrované víno se naleje do baňaté nádoby, která je zahřívána nejčastěji zemním plynem. Alkoholové výpary stoupají nahoru do kopule, poté procházejí chlazenou nádobou do sběrné kádě. Po první destilaci je kapalina jemně zakalená s obsahem alkoholu 27–30 % a říká se jí brouillis neboli „předek“. Při druhé destilaci se malé množství destilátu ze začátku (tzv. hlava) odstraňuje. Druhá destilace trvá okolo dvanácti hodin a o celý proces se stará destilátér. Ten musí zastavit shromažďování brandy, když se dostane pod 60 % alkoholu a zbytek neboli ocas se odstraní. Dvě oddělené části nazývané hlava a ocas se destilují znovu s další dávkou vína, aby se zamezilo plýtvání. Všichni výrobci se shodují na tom, že pečlivé rozdělení jednotlivých frakcí je velmi důležité a spočívá v tom pravé umění destilátérů, tedy ochránit tu nejjemnější a nejčistší část procesu.

Délka zrání koňaku je velmi důležitá. Pomalá oxidace v kádi umožní rozvinutí jemných tónů. Velký vliv na výslednou chuť destilátu mají i prostory, ve kterých zraje, například v sušších skladech vzniká brandy ostřejší chuti. Šikovní sklep mistr bude tedy pečlivě sledovat proces zrání a bude přesouvat sudy z jedné místnosti do druhé, aby zajistil optimální rozvoj chutě i vůně. Důležitý je i výběr dřeva, tradičně se používají duby zvané limousinské a troncaiské. Limousinské duby obsahují více taninu, ale méně ligninu, což je zpevňující materiál s vanilkovým aroma. Koňak může v sudu zůstat jen omezenou dobu, jinak by získal silnou pachut' dřeva. 15–20letý koňak získává plnější a chutnější charakter. Vrchol přichází mezi 40–50 lety stárnutí, po 60 letech nemá už koňak ze dřeva co získat a jeho kvalita by se mohla začít zhoršovat, pokud by byl vystaven účinku vzduchu. [18]

2.3 Přehled zkoumaných laktonů

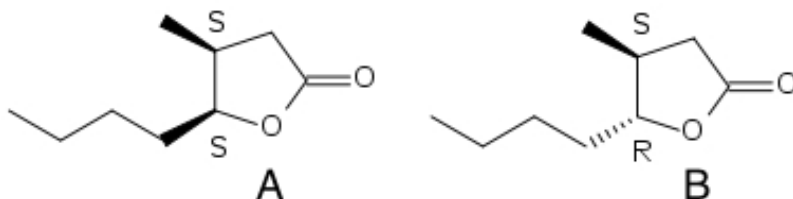
2.3.1 Whisky lakton

Whisky lakton (**Obr. 1**) (5-butyl-4-methyl-4,5-dihydro-2(3H)-furanon), dříve označovaný jako dubový lakton, poprvé identifikovali Suomalainen a Nykanen v roce 1970. Tento lakton byl identifikován jako esenciální chuťová komponenta alkoholických nápojů zrajících v sudech z dubového dřeva, odtud pochází název dubový lakton. Dnes používanější označení whisky lakton se uchytilo díky izolaci této látky ze staré whisky. Kromě koňaku a whisky se dále vyskytuje také ve sladkostech, chlebu, víně, tabáku a pečivu. [1]

Whisky lakton ve své struktuře obsahuje dva chirální uhlíky, díky přítomnosti těchto chirálních center se vyskytuje ve formě dvou izomerů a jejich optických antipodů. Aroma těchto izomerů připomíná vůni kokosu, cis-izomer je spíše zemitý a dřevitý, zatímco

trans-izomer se podobá celeru. V dubovém dřevě je obsažen pouze (4S, 5S)-cis a (4S, 5R)-trans izomer. Whisky lakton je těkává sloučenina, často používanou metodou pro její stanovení je plynová chromatografie. [4]

Množství whisky laktonu v alkoholických nápojích se různí. Autoři se v publikaci [28] věnují stanovení množství whisky laktonu ve vzorcích španělských a australských vín. V bílých vínech se koncentrace trans whisky laktonu pohybovala od 9 do 475 $\mu\text{g/l}$ a cis izomeru od 15 do 231 $\mu\text{g/l}$. V případě červených vín bylo množství trans izomeru nižší než u bílých vín, konkrétně 4–202 $\mu\text{g/l}$, zato koncentrace cis izomeru byla o trochu vyšší a pohybovala se od 9 do 277 $\mu\text{g/l}$. Vliv na koncentraci tohoto laktonu v alkoholických nápojích může mít i druh použitého dubu pro výrobu sudů, zpracování dřeva a jeho geografický původ. Například ve studii [23] se autoři věnují stanovení cis a trans izomeru ve vzorcích whisky, rumu a brandy plynovou chromatografií. Ve všech vzorcích bylo vždy větší množství trans izomeru. Také byl zkoumán vliv doby zrání destilátů na množství laktonu. Jak bylo předpokládáno, s rostoucí dobou zrání nápojů se zvýšila celková koncentrace whisky laktonu. [35]



Obr. 1: Struktura A – cis, B – trans whisky laktonu [36]

2.3.2 Sotolon

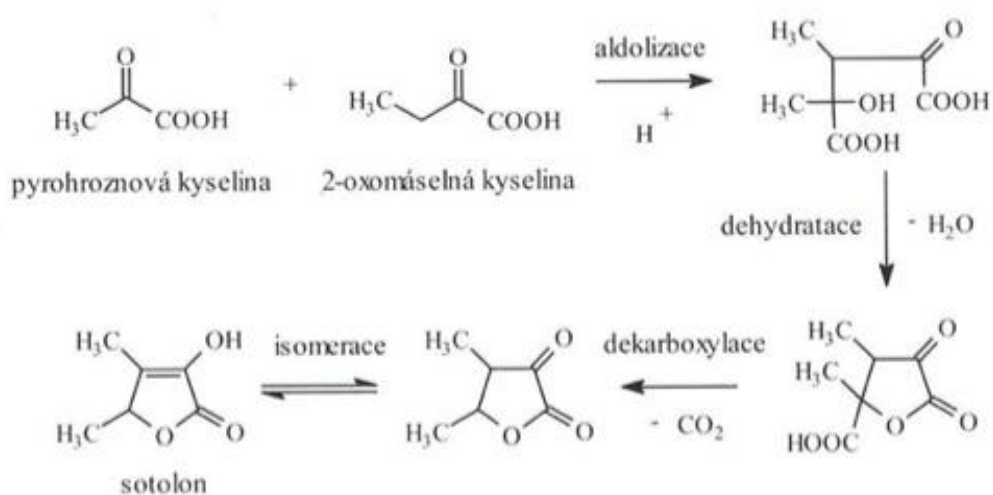
Sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon) je aromatická sloučenina, která se nachází v mnoha potravinách a koření. Vyniká svou sladkou / ořechovou / medovou / kořenitou / kari chutí v závislosti na koncentraci. Vyskytuje se např. ve třtinovém cukru, pražené kávě, sójové omáčce nebo rýžovém víně. Je důležitou součástí aroma botrytizovaných vín jako např. Tokay, Sauternes, Scheurebe a fortifikovaných vín jako je portské, Madeira nebo Sherry. Množství sotolonu ve víně je různé, u bílého suchého vína 8 $\mu\text{g/l}$, v portském víně 19 $\mu\text{g/l}$ a v Madeiře až 2000 $\mu\text{g/l}$. [9]

Typickou, a ne velmi známou rostlinou obsahující sotolon je pískavice řecké seno, která je pěstována především ve Středomoří. Její semena jsou základní složkou kari, ale také se

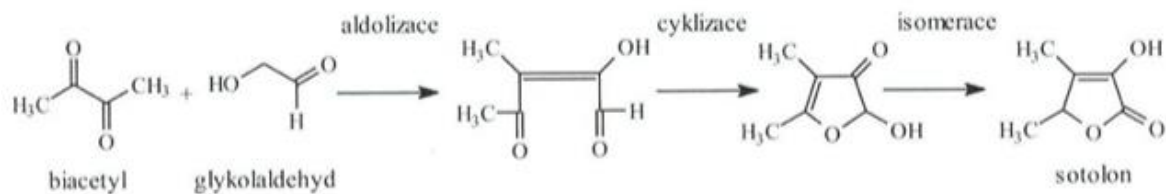
používají jako koření pro řadu potravin např. kyselé okurky, vanilkový extrakt či javorový sirup. [7]

V kyselém prostředí se sotolon tvoří z pyrohroznové a 2-oxomáselné kyseliny (**Obr. 2**). Další možností jeho vzniku je z biacetylu a glykolaldehydu (**Obr. 3**). [13]

Hlavním problémem při kvantifikaci sotolonu ve víně je jeho relativně nízká koncentrace, proto je ve většině případů žádoucím krokem prekoncentrace. Vysoká teplota varu sotolonu (184 °C) ztěžuje headspace analýzu a mikroextrakci na pevné fázi. V literatuře, věnující se analýze sotolonu, jsou nejčastěji uváděny klasické metody jako extrakce kapalina-kapalina či extrakce na pevné fázi spojené s kapalinovou či plynovou chromatografií s hmotnostním nebo UV/VIS detektorem. [9]



Obr. 2: Vznik sotolonu z 2-oxokyselín [13]

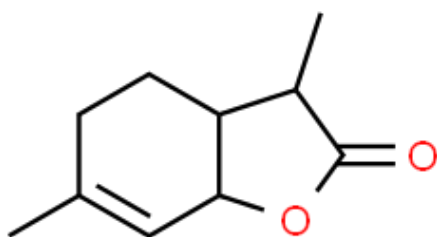


Obr. 3: Vznik sotolonu z biacetylu a glykolaldehydu [13]

2.3.3 Vinný lakton

Vinný lakton (**Obr. 4**) (3a,4,5,7a-tetrahydro-3,6-dimethylbenzofuran-2-on) poprvé identifikoval Southwell v roce 1975. Southwell objevil tuto látku při studiu močových metabolitů koaly po pozření listů eukalyptu. O více než 20 let později identifikoval tento monoterpen v bílém víně Guth a nazval jej vinným laktonem. Tento lakton vyniká svou nasládlou a kokosovou chutí. Nenachází se pouze ve víně, ale také v černém a bílém pepři, pomerančovém džusu, jablcích, grepu a pomerančovém esenciálním oleji. Ve všech těchto potravinách je obsažen ve velmi malém množství. [2,3]

Koncentrace vinného laktonu ve víně je závislá na podmínkách zrání vína. V publikaci [5] srovnávali autoři koncentraci vinného laktonu ve víně zrajícím v dubovém sudu a nerezovém tanku. U vína, které zrál v sudu, byla koncentrace laktonu dvojnásobná.



Obr. 4: Struktura vinného laktonu [37]

2.4 Chemická separace a analýza laktonů v alkoholických nápojích

2.4.1 Derivatizace

Derivatizací se rozumí proces zavedení vhodných atomů či funkčních skupin do molekuly. Vzniklý derivát má oproti původní molekule odlišné vlastnosti a je tak usnadněna jeho detekce či stanovení. Takto přeměněný analyt je následně stanoven některou z detekčních technik. Derivatizace je používána hned z několika důvodů, například kvůli zvýšení citlivosti, rozlišení a účinnosti, umožnění detekce a separace. [24, 25]

Derivatizační reakce lze rozdělit podle místa, kde k nim dochází:

Předkolonová derivatizace – k reakci dojde před vstupem vzorku na chromatografickou kolonu

Postkolonová derivatizace – chemická reakce proběhne až za kolonou

Derivatizace na koloně – chemická reakce se uskuteční přímo na koloně.

Všechny uvedené způsoby derivatizace mají vliv na účinnost separace, selektivitu a dobu analýzy. [24]

Derivatizační techniky se řadí do reakční chromatografie, protože využitím specifických reakcí probíhajících před chromatografickou separací, nebo až po rozdělení látek před vstupem do detektoru získáme kvalitativně nové vlastnosti separovaných látek. [25]

Ze struktury vinného laktonu, whisky laktonu a sotolonu je patrné, že vhodným kandidátem pro derivatizační reakci by mohl být sotolon. Tento lakton totiž obsahuje polární skupinu s aktivním vodíkem (-OH), která nabízí hned několik vhodných derivatizačních reakcí (např. silylaci, acylaci, alkylaci).

2.4.1.1 Derivatizace v kapalinové chromatografii

V kapalinové chromatografii se využívá reaktivity analyzovaných látek hlavně kvůli zvýšení citlivosti detekce nebo jejího umožnění vůbec. Předkolonová derivatizace v kapalinové chromatografii má tu výhodu, že nemusí probíhat rychle. Na tuto formu derivatizace jsou kladeny následující požadavky – reakce by měla probíhat kvantitativně a měla by být selektivní, neměly by vznikat vedlejší produkty a měla by probíhat za mírných reakčních podmínek. Nevýhodou postkolonové derivatizace je zařazení mimokolonového objemu do chromatografického systému, neboť reakce probíhá v průtočném reaktoru, který je umístěn za chromatografickou kolonou. Dále převažují spíše výhody této techniky – derivatizační reakce nemusí poskytovat stabilní chemické individuuum, nemusí probíhat kvantitativně, reakce musí probíhat rychle, ale může probíhat i za extrémních podmínek, vedlejší produkty nejsou na závadu.

Derivatizace v kapalinové chromatografii může probíhat různými způsoby. Může dojít ke tvorbě derivátů reakcí s činidly v kapalně fázi. Tato technika je nejrozšířenější a dochází k ní v derivatizačním reaktoru. Mobilní fáze vycházející z kolony se mísí s činidlem ve směšovací komůrce a následně v reaktoru. Zásadní nevýhodou je technická náročnost zařízení a velké mrtvé objemy za chromatografickou kolonou. Nejčastěji je využita při stanovení aminokyselin či kyseliny pantotenové.

K derivatizační reakci může dojít i v systému kapalina-tuhá látka. Reakce probíhá na povrchu tuhé fáze, která může sloužit jako reagent, katalyzátor nebo jako nosič vázané látky. Velkou výhodou této techniky je, že nedochází ke zředování mobilní fáze činidlem. Využívá se např. při stanovení nízkých koncentrací vitamínu K s fluorescenční detekcí, kdy je vitamín K redukován na hydronaftochinon pomocí kovového zinku.

Pro vznik derivátů je možno využít také elektrochemických reakcí. Mezi kolonu a detektor se umístí coulometrická či amperometrická cela, která slouží jako elektrochemický derivatizační reaktor. Vzniklé deriváty je pak možné detekovat pomocí UV nebo fluorescenčních detektorů. Takto lze detekovat např. katecholaminy, které mohou být oxidovány na vysoce fluoreskující oxidační produkty.

Ke znatelnému snížení meze stanovitelnosti či ke zvýšení citlivosti detekce může dojít i změnou pH před vstupem do detektoru. V tomto případě nevznikají nové deriváty, ale změnou pH dojde k výrazné změně absorbance v oblasti UV. Tento způsob postkolonové derivatizace může být aplikován např. při separaci barbiturátů. Deprotonizací barbiturátů v přítomnosti borátového pufru o pH 10,4 dojde k posunutí absorpčního maxima z 220 nm na 240 nm a ke zvýšení citlivosti detekce asi 20×. [24]

2.4.1.2 Derivatizace v plynové chromatografii

Důvodů použití derivatizačních reakcí v plynové chromatografii je několik. Mnoho organických látek nelze převést do plynného stavu, nebo se při pokusu o zplynění rozkládají, proto je možné využít derivatizaci a zvýšit tak stabilitu analyzovaných látek. Mnohé funkční skupiny, jako např. hydroxylová skupina na aromátu, mohou způsobovat sorpci na povrchu stacionární fáze. Pro zamezení této nežádoucí interakce se také využívá derivatizačních reakcí. Dalším důležitým důvodem je zvýšení selektivity, citlivosti a snížení meze detekce. Jde o to, že do molekuly separované látky se při derivatizaci zavádějí takové elementy, které vykazují selektivitu při určitém způsobu detekce, např. halogeny při použití detektoru elektronového záchytu. Často používané derivatizační reakce v plynové chromatografii vedou ke tvorbě acylderivátů, esterů a silylderivátů. [25]

Silylace je jednou z derivatizačních metod používaných v plynové chromatografii k přípravě vysoce těkavých a tepelně stabilních derivátů. Spočívá v působení silylačního činidla na sloučeniny obsahující polární skupinu s aktivním vodíkem (OH, COOH, NH, SH). Nejčastěji se jedná o reakce trimethylsilylační, kdy je aktivní vodík nahrazen trimethylsilylovou skupinou $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Existuje široká škála silylačních činidel, mezi nejpoužívanější patří hexamethyldisilazan (HMDS), t-butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl) a trimethylchlorsilan (TMCS). [11]

Acylační reakce, při kterých je aktivní vodík polární skupiny zaměněn za acylovou skupinu, se využívají při přípravě derivátů alkoholů, fenolů, aminů a thiolů. Dochází k blokaci protonu, který již nemůže reagovat s okolními molekulami a zamezí se tak disociačním reakcím a tvorbě vodíkových můstků. Vzniklé deriváty mají nižší polaritu, než

původní látky a díky ztrátě možnosti tvorby vodíkové vazby vykazují vyšší těkavost. Často se do struktury derivátů zavádějí halogeny. Používanými derivatizačními činidly jsou anhydrid kyseliny octové (AA), anhydrid kyseliny trifluoroctové (TFAA) nebo heptafluormásečné (HFBA), acetylchlorid, a N-methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA). Další činidla, která vedou k tvorbě acylačních produktů, jsou např. alkylchlorformiáty.

Esterifikace má zásadní význam pro analýzu karboxylových kyselin plynovou chromatografií, protože estery nemohou tvořit vodíkové můstky, disociovat ani dimerovat. Vyšší mastné kyseliny a polykarboxylové alifatické i aromatické kyseliny nelze plynovou chromatografií vůbec analyzovat bez použití derivatizace. Nejčastěji se připravují methylestery, a to hned z několika důvodů. Oproti vyšším esterům jsou těkavější, vykazují velkou reakční rychlost a také vysoké výtěžky. Pro kvantitativní průběh esterifikace je potřeba reakci kyseliny katalyzovat. Často používanými katalyzátory jsou chlorovodík, thionylchlorid nebo kyselina sírová. Nejčastěji se esterifikace provádí reakcí s diazomethanem, methanolem za katalytického působení silnými Lewisovými kyselinami (BF_3 , BCl_3), koncentrovanou kyselinou sírovou nebo chlorovodíkovou. [11,25]

Autorka Petra Nováková se ve své diplomové práci na téma Derivatizace v plynové chromatografii [11] zabývá derivatizací sotolonu. V experimentální části se věnuje stanovením sotolonu ve víně s využitím jeho silylace. Pro derivatizaci použila silylaci pomocí N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu (BSTFA), který vyniká svou jednoduchostí a rychlostí reakce. Také byla vyzkoušena derivatizační reakce s činidlem t-butyldimethylsilylchloridem (TBDMSCl), která oproti BSTFA poskytovala hydrolyticky stabilnější deriváty. Analýzou vzorků vín oběma metodami bylo dosaženo podobných výsledků. Při porovnání výsledků analýz derivátu sotolonu a nederivatizovaného laktonu bylo zjištěno, že derivatizací je dosaženo mnohonásobně vyšší symetrie píku, vyšší citlivosti stanovení a účinnosti chromatografické separace. Zjištěné koncentrace sotolonu se pohybovaly v rozmezí 18,99–82,59 $\mu\text{g/l}$.

2.4.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě nemísitelné fáze – stacionární a mobilní. Stacionární fází může být pevná látka nebo kapalina zakotvená na nosiči, mobilní fází je kapalina. Nejčastěji se jedná o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, kdy je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. Mobilní fáze protéká chromatografickým ložem

a dochází k distribuci složek mezi stacionární a mobilní fází. Při separaci látek pak dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi oběma fázemi. [24]

2.4.2.1 Analýza sotolonu

Vanda Pereira a kolektiv [9] se ve své studii zabývali stanovením sotolonu ve fortifikovaných vínech pomocí extrakce kapalina-kapalina s následnou kapalinovou chromatografií na obrácených fázích. Pro analýzu byla použita kolona C18 termostatovaná na 40 °C, detekce byla provedena hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem a elektrosprejem. Pro extrakci byla zvolena dvě rozpouštědla, acetonitril a ethylacetát. Ethylacetát byl zvolen jako vhodnější extrakční činidlo pro stanovení sotolonu ve víně, neboť vykazoval lepší poměr signál/šum než acetonitril. Dále byl zkoumán vliv přídavku soli na výtěžek extrakce. Bylo zjištěno, že přídavek soli snižuje extrakční výtěžek sotolonu, proto se v konečném postupu sůl nepřidávala a extrakční postup se tak stal levnější a jednodušší. Celkem bylo analyzováno 44 fortifikovaných vín. Množství sotolonu ve vzorcích se pohybovalo od $6,3 \pm 0,4$ do 810 ± 20 $\mu\text{g/l}$. Dále byla pozorována souvislost mezi stářím vína a množstvím sotolonu. Sladší vína, která byla starší než 10 let, obsahovala v průměru 505 $\mu\text{g/l}$ sotolonu, zatímco suchá vína obsahovala téměř polovinu (282 $\mu\text{g/l}$). Kvantifikace sotolonu byla provedena metodou kalibrační křivky. Cílem této studie bylo navrhnout jednoduchou, rychlou, spolehlivou, účinnou a ekologickou metodu pro kvantifikaci sotolonu ve fortifikovaných vínech.

Další práce [10] se taktéž věnuje kvantifikaci sotolonu ve víně, tentokrát pomocí UHPLC s UV detekcí. Sotolon byl ze vzorku extrahován chloroformem, dichlormethanem a heptanem. Dichlormethan byl zvolen jako nejvhodnější rozpouštědlo, jeho extrakční účinnost byla o 32 % vyšší než při extrakci chloroformem. Při extrakci heptanem nebyl sotolon detekován vůbec, což bylo pravděpodobně způsobeno nepolárním charakterem rozpouštědla. Vyšší výtěžnost extrakce lze získat zvýšením iontové síly roztoku, proto byl při zpracování vzorku vína přidán chlorid sodný. Pro přečištění extraktu byla použita SPE kolonka obsahující 50 mg polyvinylpolypyrrolidonu. Sotolon byl detekován při vlnové délce 235 nm. Kvantifikace sotolonu ve vzorcích vína byla provedena metodou vnějšího standardu. Celkem bylo analyzováno 30 vín, přítomnost sotolonu byla potvrzena ve čtyřech z nich. Dva vzorky šumivých vín obsahovaly 6,4 a 13,4 $\mu\text{g/l}$, v bílých suchých vínech byla koncentrace sotolonu nižší a pohybovala se okolo 3 $\mu\text{g/l}$. Navržená analytická metoda poskytuje rychlé a snadné stanovení koncentrace sotolonu ve vínech.

2.4.3 Plynová chromatografie

Jedná se o další separační metodou. Jako mobilní fáze se zde používá plyn, stacionární fáze může být pevná či kapalná. Tato technika se používá k separaci plynů, kapalin i pevných látek. Existují však jistá omezení, která by měl analyt splňovat. Stanovovaná látka se musí snadno převést do plynného stavu bez toho, aniž by se rozložila či reagovala se složkami mobilní a stacionární fáze nebo jinými složkami ve vzorku. Mnoho molekul však není těkavých, proto se často využívá příprava těkavějších a pro analýzu plynovou chromatografií vhodnějších derivátů pomocí derivatizace (viz předchozí text). Vzhledem ke spotřebě malého množství vzorku k analýze se tato technika stala velmi oblíbenou v oblastech kontroly kvality životního prostředí, ropy, chemického průmyslu či potravin. Velké množství stacionárních fází a detektorů s různou specifickou citlivostí a vysokým rozlišením umožňují spolehlivou analýzu. [26]

2.4.3.1 Analýza whisky laktonu

Ve své práci [28] se autoři zabývají kvantifikací whisky laktonu ve vínech zrajících v dřevěných sudech. Zpracování vzorku zahrnovalo extrakci dichlormethanem, následně byl k extraktu přidán bezvodý síran sodný a vnitřní standard (hexadekan). Extrakt byl zakoncentrován na vakuové rotační odparce. Zakoncentrované extrakty byly analyzovány plynovou chromatografií s plamenoionizačním detektorem. Jako nosný plyn bylo použito helium. Ve všech čtrnácti vínech byl whisky lakton kvantifikován. Celková koncentrace laktonu se v bílých vínech pohybovala od 24 do 538 $\mu\text{g/l}$ a v červených vínech od 13 do 470 $\mu\text{g/l}$. Autoři zjistili, že ve všech analyzovaných vzorcích bylo znatelně větší množství cis whisky laktonu než trans izomeru. Poměr cis a trans izomerů závisí na historii a ošetření sudu a také na druhu dřeva.

2.4.3.2 Analýza sotolonu

Cílem studie [27] bylo vyhodnotit vliv doby zrání a obsahu cukru na množství sotolonu ve vínech Madeira. Zpracování vzorku bylo velmi rychlé a zahrnovalo přidávek vnitřního standardu (3-oktanolu v hydroalkoholickém roztoku 1 : 1, v/v) ke vzorku vína a bezvodého síranu sodného pro zvýšení iontové síly. Extrakce byla provedena 2× dichlormethanem a následně byl oddělený organický podíl zakoncentrován pod proudem dusíku. Analýza byla provedena plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. K analýze bylo vybráno celkem 86 fortifikovaných vín Madeira. Byla zjištěna souvislost mezi dobou zrání vína v sudech

a množstvím sotolonu v nápoji. Koncentrace sotolonu se zvyšovala s rostoucí dobou zrání, a to od 100 µg/l ve vínech 6 let starých do 1000 µg/l ve vínech starých 25 let. Byl také zaznamenán vztah mezi množstvím sotolonu a obsahem cukru ve víně. Průměrné množství sotolonu v suchých vínech bylo 258 µg/l zatímco ve sladkých vínech 825 µg/l, přičemž dané vzorky zrály při stejných podmínkách.

2.4.3.3 Analýza vinného laktonu

Ve své vědecké práci se autoři Jagella a Grosch [12] zabývají stanovením klíčových komponent způsobujících typickou vůni pepře. Jednou z látek, kterou v pepři objevili byl vinný lakton. Zpracování vzorku pepře se skládalo z několika kroků, a to extrakce pepře a oddělení od netěkavých složek destilací. Extrakčním činidlem byla směs vody : CH₂Cl₂ : methanolu (4 : 5 : 10, v/v, 190 ml), poté byla směs zhomogenizována a zfiltrována. Po separaci na neutrální/bazické a kyselé těkavé látky byla každá z frakcí podrobena AEDA (aroma extraction dilution analysis). Bazické a neutrální těkavé látky byly ještě předem separovány sloupcovou chromatografií na silikagelu. Postupná eluce byla prováděna směsí pentan (frakce A), pentan : diethylether (v/v): 99 : 1 (frakce B), 90 : 10 (frakce C), 70 : 30 (frakce D), 50 : 50 (frakce E) a diethylether (frakce F). Následně byly frakce analyzovány plynovou chromatografií s vysokým rozlišením (HRGC) za použití helia jako nosného plynu a plamenoionizačního detektoru. Výše uvedeným postupem byla prokázána přítomnost vinného laktonu v pepři.

2.4.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je separační metoda založená na elektromigraci látky v kapiláře. Mezi výhody této metody patří rychlost analýzy, citlivost, vysoké rozlišení a spotřeba malého množství vzorku. Tato metoda je vhodná i pro analýzu směsí obsahujících jak těkavé, tak netěkavé látky, soli nebo velké molekuly. [8]

2.4.4.1 Analýza sotolonu

V práci publikované Atsushi Taga a kolektiv [8] bylo analyzováno množství sotolonu v potravinových aditivech s javorovou příchutí. K analýze byl použit elektroforetický systém s automatickým dávkováním, křemennou kapilární kolonou a UV detektorem s fotodiodovým polem. Základní elektrolyt o pH 10,5 byl připraven smísením vodného roztoku hydroxidu draselného s kyselinou boritou. Mezi oba konce kapiláry bylo vloženo

napětí o hodnotě 20 kV. Detekce byla provedena při vlnové délce 265 nm. Vzorek k analýze byl ve formě oleje. Sotolon a další látky příchutě javoru byly extrahovány z oleje destilovanou vodou. Extrakt byl následně analyzován kapilární elektroforézou. Takto získané píky byly relativně široké, proto byl extrakt před nadávkováním 20× zředěn vodou. Zředění mělo velmi pozitivní vliv na tvar i rozlišení píků. Množství sotolonu v testovaném vzorku činilo 5,71 ppm. Stanovení bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Výsledkem této práce bylo navržení jednoduché, pohodlné a ekonomické metody ke stanovení sotolonu v přídatných látkách s příchutí javoru.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové pomůcky a vybavení

- Plynový chromatograf – Agilent 7890A (Agilent, Santa Clara, USA)
- Hmotnostní spektrometr – Agilent 5975C Inert (Agilent, Santa Clara, USA)
- Autosampler – Agilent G4513A (Agilent, Santa Clara, USA)
- Kolona – HP-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Agilent Santa Clara, USA)
- Nosný plyn – Helium 5.5 (Siad, Bergamo, Itálie)
- Analytické váhy – Mettler Toledo XSE205 (Mettler Toledo, Columbus, USA)
- Ultrazvuková lázeň – Elmasonic S40H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Německo)
- Automatické pipety
- Kuderna–Danishův aparát
- Laboratorní sklo, eppendorfky, vialky, plastové špičky, plastové zkumavky, víčka, krimpovací kleště

3.2 Chemikálie

3.2.1 Derivatizační činidla

- Acetanhydrid, p.a., Sigma–Aldrich, Praha, ČR
- N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, p.a., Sigma–Aldrich, Praha, ČR

3.2.2 Standardy

- Sotolon, SAFC, Sigma–Aldrich, Praha, ČR
- Whisky lakton, Sigma–Aldrich, Praha, ČR

3.2.3 Rozpouštědla

- Aceton, p.a., Penta, ČR
- Ethylacetát, p.a., BC – CHEMSERVIS, ČR
- Tetrahydrofuran, p.a., Sigma–Aldrich, Praha, ČR
- Diethylether, p.a., BC – CHEMSERVIS, ČR
- Ethylformiát, p.a., Sigma–Aldrich, Praha, ČR
- Dichlormethan, p.a., Penta, ČR
- Terc-butyl(methyl)ether, p.a., Acros – Organics, Sigma–Aldrich, Praha, ČR

- Pentan, p.a., Lach–Ner, ČR
- Hexan, p.a., VWR International, ČR
- Heptan, p.a., Lach–Ner, ČR
- Chloroform, p.a., Lach–Ner, ČR
- Tetrachlorethylen, p.a., Lach–Ner, ČR
- 1,2-dichlorethan, p.a., Lachema, Brno
- Methylisobutylketon, p.a., LOBA Feinchemie GmbH, Rakousko
- Tetrachlormethan, p.a., LOBA Feinchemie GmbH, Rakousko
- Methylacetát, p.a., Merck, Praha
- Isooktan, p.a., Sigma–Aldrich, Praha, ČR

3.2.4 Analyzované vzorky

- Bílé víno Rulandské šedé, sudové Naše vinotéka Olomouc
- Bílé víno polosuché Sauvignon, sudové Naše vinotéka Olomouc
- Bílé víno Ryzlink vlašský, sudové Naše vinotéka Olomouc
- Sladké likérové víno Sherry medium, vinařství Osborne
- Polosuché likérové víno Sherry cream, vinařství Osborne
- Suché červené víno Dornfelder, pozdní sběr 2018, Břeclav
- Červené víno Medvědí krev, Logodaj Winery Ltd, Bulharsko
- Červené likérové víno Ruby Port, Quinta and Vineyard Bottlers Vinhos S.A. Vila Nova de Gaia, Portugalsko
- Sladké červené likérové víno Tawny Porto Monteiro, Quinta and Vineyard Bottlers Vinhos S.A. Vila Nova de Gaia, Portugalsko
- Whisky Islay Mist, Blended Scotch Whisky, palírna Macduff, Skotsko
- Whisky Kilchoman Sanaig, Islay single malt scotch whisky, palírna Kilchoman, Skotsko
- Cognac Claude Chatelier XO, palírna Cognac Ferrand, Francie
- De Luze cognac VSOP, palírna De Luze, Francie
- Bisquit Cognac XO, Bisquit Dubouché & Cie, Francie
- Dos Maderas Triple aged rum 5 + 5, Williams & Humbert, Barbados
- Červené víno Merlot Barrique 2016 pozdní sběr, Víno Rakvice
- Bílé víno Chardonnay Barrique 2018 pozdní sběr, Réva Rakvice

3.2.5 Ostatní chemikálie

- Hydrogenuhličitan sodný, Lach–Ner, ČR
- Chlorid sodný, Sigma–Aldrich, Praha, ČR
- Tyrosol, Sigma–Aldrich, Praha, ČR
- Phenylethanol, Fluka, Buchs, Sigma–Aldrich, Praha, ČR
- Diethylester kyseliny jantarové, LOBA Feinchemie GmbH, Rakousko
- Silikagel (0,015 – 0,040 mm), Merck, Praha

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Příprava roztoků standardů

Následujícím způsobem byly připraveny roztoky jednotlivých standardů o koncentraci 3 mg/ml. Do vialky byly naváženy 3 mg standardu whisky laktonu nebo sotolonu a byl k nim přidán 1 ml acetonu.

3.3.2 Stanovení whisky laktonu

Tento lakton byl analyzován ve vzorcích klasických vín, fortifikovaných vín, rumu, whisky a koňaků. Podle struktury whisky laktonu (**Obr. 1**) je patrné, že při stanovení tohoto analytu plynovou chromatografií nebylo potřeba použít derivatizaci. Zpracování vzorků vyžadovalo pouze extrakci analytu do organického rozpouštěla.

Smísením 1 ml vzorku vína či destilátu s 1 μ l standardního roztoku whisky laktonu (3mg/ml v acetonu) byly připraveny roztoky s přídavkem 3 μ g/ml. Do jedné eppendorfky bylo odpipetováno 0,5 ml výše připraveného roztoku vzorku s přídavkem standardu o koncentraci 3 μ g/ml, do druhé bylo odpipetováno 50 μ l téhož roztoku a 450 μ l samotného vzorku nápoje a do třetí eppendorfky bylo odpipetováno 0,5 ml samotného vzorku vína či destilátu. Do všech eppendorfek bylo přidáno 0,5 ml nasyceného roztoku chloridu sodného. Whisky lakton byl ze vzorku extrahován 400 μ l tetrahydrofuranu. Obsah eppendorfky byl v průběhu 15 minut opakovaně protřepán a centrifugován. Nakonec byla organická fáze odebrána do vialek a analyzována GC/MS.

3.3.3 Stanovení sotolonu

Při stanovení sotolonu plynovou chromatografií je výhodné použít derivatizaci, která usnadní přechod analytu do plynné fáze. Přítomnost hydroxylové skupiny v molekule

sotolonu nabízí například acylaci jako vhodnou derivatizační techniku. Sotolon byl stanoven ve vzorcích klasických vín, fortifikovaných vín, whisky a koňaků. Z důvodu vyššího obsahu alkoholu ve whisky a koňacích byl vzorek nápoje zředěn 2,5×.

3.3.3.1 Klasická a fortifikovaná vína

Do tří plastových zkumavek bylo naváženo 100 mg hydrogenuhličitanu sodného, poté bylo přidáno 10 ml vína. Do jedné zkumavky bylo odpipetováno 20 µl roztoku standardu sotolonu (3 mg/ml v acetonu; přídavek 6 µg/ml), zkumavka byla protřepána a bylo z ní odebráno 100 µl do další zkumavky (přídavek 0,06 µg/ml). Do všech zkumavek bylo přidáno 100 µl acetanhydridu, obsah zkumavek byl řádně protřepán a ponechán k proběhnutí acetylace. Konec derivatizace se projevil ukončením vývoje oxidu uhličitého (zhruba po 20 minutách). Poté byl do všech zkumavek navážen 1 g chloridu sodného. Extrakce byla provedena nejdříve s 1,5 ml ethylacetátu, po protřepání obsahu zkumavky a centrifugaci byla organická fáze odebrána do vialek. Extrakce byla zopakována s 0,5 ml ethylacetátu a po centrifugaci byla organická fáze znovu odebrána do vialek.

3.3.2.2 Koňak a whisky

Do tří plastových zkumavek bylo naváženo 50 mg hydrogenuhličitanu sodného, k nim byly přidány 4 ml koňaku/whisky a 6 ml destilované vody. Do jedné zkumavky bylo přidáno 20 µl roztoku standardu sotolonu (3 mg/ml v acetonu; přídavek 15 µg/ml), obsah zkumavky byl protřepán a bylo z něj odebráno 100 µl do druhé zkumavky (přídavek 0,15 µg/ml). Do všech zkumavek bylo přidáno 50 µl acetanhydridu, obsah zkumavek byl důkladně protřepán. Po ukončení vývoje oxidu uhličitého (asi po 20 minutách) byl do zkumavek přidán 1 g chloridu sodného. Extrakce byla provedena s 1,5 ml ethylacetátu, po protřepání a centrifugaci byla odebrána organická fáze do vialek. Poté byla extrakce zopakována, tentokrát s 0,5 ml ethylacetátu, organická fáze byla opět odebrána do vialek. Vzorky samotných destilátů a destilátů s přídavkem sotolonu byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

3.3.4 Stanovení vinného laktonu

Stanovení vinného laktonu v analyzovaných vzorcích nebylo možné provést totožně jako v případě dvou předchozích laktonů, neboť nešlo standard vinného laktonu koupit. Byla vyzkoušena izolace vinného laktonu ze vzorku bílého vína extrakcí dichlormethanem. Takto

připravený extrakt byl analyzován plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, získaný chromatogram obsahoval velké množství signálů. Pro přečištění extraktu byla vyzkoušena frakcionace na silikagelové koloně.

Směs 800 ml Ryzlinku vlašského a 50 ml dichlormethanu byla míchána na magnetické míchače po dobu dvou dnů. Organická fáze byla odebrána, zcentrifugována a zakoncentrována pomocí Kuderna–Danishova aparátu na objem 3 ml, ze kterého se odebíral 1 ml extraktu pro analýzu. Do plastové kolonky byl navážen 1 g silikagelu, poté byla kolonka promyta 2 ml methanolu, 2 ml acetonu a 2 ml pentanu. Na promytou kolonku byl nanesen 1 ml dichlormethanového extraktu. Postupně bylo do 4ml vialek sbíráno celkem 6 frakcí, přičemž každá frakce byla vždy získána promytím kolonky 3 ml rozpouštědla či směsi rozpouštědel. První frakce byla získána elucí 3 ml pentanu. Pro získání dalších frakcí byla kolonka promyta směsí rozpouštědel v poměrech diethylether : pentan, 1 : 9 (druhá frakce); diethylether : pentan, 3 : 7 (třetí frakce); diethylether : pentan, 1 : 1 (čtvrtá frakce); při páté frakci byla kolonka promyta 3 ml diethyletheru a při poslední frakci 5 ml acetonu. Z každé frakce byly získány zhruba 2–3 ml roztoku, které byly zahříváním při 40–50 °C a odfoukáním pomocí dusíku zakoncentrovány na 1 ml a analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotností detekcí.

3.4 Experimentální podmínky

Analýzy všech stanovovaných laktonů byly provedeny na plynovém chromatografu Agilent 7890A s hmotnostním detektorem Agilent 5975C Inert. Přímé dávkování kapalných vzorků bylo provedeno prostřednictvím autosampleru Agilent G4513A. Vždy byl dávkován 1 µl vzorku. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium s průtokovou rychlostí 0,9 ml/min. Separace byla provedena na kapilární koloně HP-5ms o délce 30 m, s vnitřním průměrem 0,25 mm a tloušťkou filmu 0,25 µm.

V případě cis a trans whisky laktonu byl sledován záznam celkového iontového proudu (TIC) a selektivního iontu 99 m/z v módu SIM s retenčními časy 11,75 a 12,20 min. Teplota nástřiku byla pro všechny vzorky nastavena na 280 °C a teplota kolony na začátku analýzy na 50 °C.

Sběr dat při analýze sotolonu byl realizován v záznamu celkového iontového proudu (TIC) a monitorování selektivních iontů (SIM). Pro analýzu v SIM módu byl zvolen selektivní ion 128 m/z. Při analýzách klasických vín a destilátů byl zvolen teplotní program totožný jako v případě whisky laktonu. V portských vínech byl sotolon analyzován při

vyšších teplotních podmínkách, a to při teplotě nástříku 300 °C a teplotě kolony na začátku analýzy 70 °C.

Pro stanovení vinného laktonu ve víně byla sbírána data celkového iontového proudu a selektivních iontů 151 a 166 m/z. Teplotní program byl v tomto případě stejný jako u whisky laktonu.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Whisky lakton

4.1.1 Určení cis a trans izomerů whisky laktonu

Jak již bylo zmíněno výše, whisky lakton se vyskytuje v potravinách ve formě dvou izomerů cis a trans. Nejjednodušší cestou, jak správně přiřadit cis a trans konfiguraci dvěma píkům, je s využitím Kovatsových retenčních indexů (RI). Hodnoty tohoto indexu se liší dle použité stacionární fáze (**Tab. I**).

Ze vzorce $RI = 100 \cdot \frac{\log t'(x) - \log t'(n)}{\log t'(n+1) - \log t'(n)} + 100 n$, kde $t'(x)$ je redukovaný retenční čas analytu, $t'(n)$ redukovaný retenční čas nejbližšího nižšího n-alkanu a $t'(n+1)$ redukovaný retenční čas nejbližšího vyššího n-alkanu, je patrné, že s rostoucím retenčním časem analytu se zvyšuje hodnota Kovatsova retenčního indexu a je tak možné určit retenční pořadí daných látek.

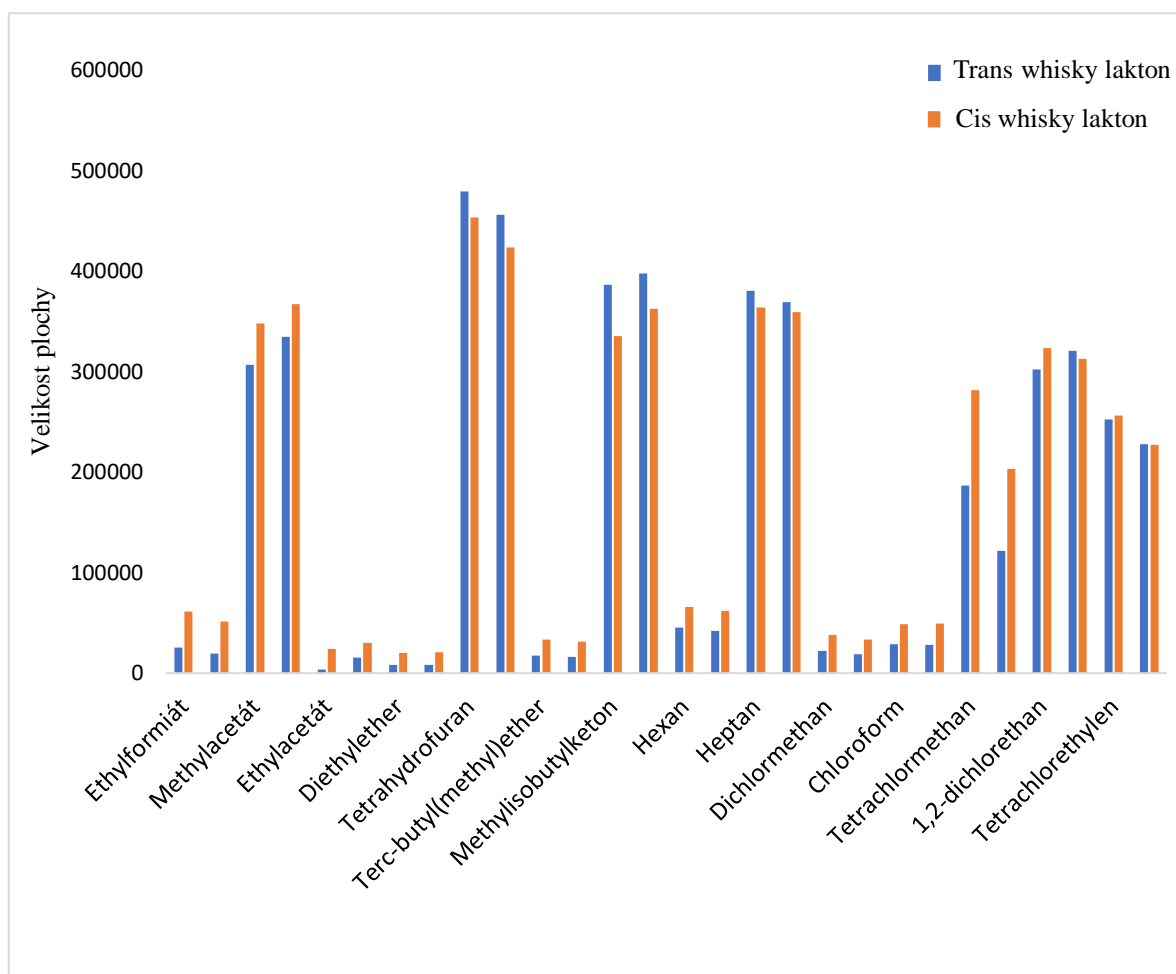
V experimentech prováděných pro tuto diplomovou práci byla použita nepolární kolona HP-5ms, která má podobnou stacionární fázi jako kolona SE 54. Proto byly brány v úvahu hodnoty Kovatsových retenčních indexů whisky laktonu právě pro kolonu SE 54, tedy 1325 pro cis whisky lakton a 1292 pro trans whisky lakton. Podle výše uvedeného vzorce bylo zjištěno, že pík s retenčním časem 11,75 minut odpovídá trans izomeru a pík s retenčním časem 12,25 minut je cis izomer. Pro ověření správnosti nalezených retenčních indexů byly analyzovány tři standardy n-alkanů a whisky laktonu plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Z naměřených hodnot retenčních časů dodekanu, tetradekan, tridekanu a obou izomerů whisky laktonu, které činily 10,27; 11,70; 13,04; 11,65 a 12,10 min, byly vypočítány redukované retenční časy, přičemž mrtvý čas byl 1,43 min. Pomocí výše uvedeného vzorce byly vypočítány retenční indexy pro oba izomery whisky laktonu, jejichž hodnoty byly 1298 a 1330. Výsledky Kovatsových retenčních indexů se dobře shodují s hodnotami pro kolonu SE 54. [31]

Tab. I: Přehled hodnot Kovatsových retenčních indexů pro cis a trans whisky lakton

Stacionární fáze	Kovatsův retenční index trans whisky lakton	Kovatsův retenční index cis whisky lakton	Zdroj
CP-Sil 5	1281	-	[40]
SE 54	1292	1325	[30]
OV101	1612	1620	[31]
OV17	1720	1728	[31]
FFAP	1830	1920	[30]
C20M	1977	1985	[31]

4.1.2 Volba extrakčních činidel

Pro extrakci whisky laktonu z alkoholických nápojů byly provedeny experimenty se čtrnácti různými rozpouštědly – diethyletherem, ethylacetátem, ethylformiátem, dichlormethanem, terc-butyl(methyl)etherem, hexanem, heptanem, chloroformem, tetrachlorethylenem, tetrahydrofuranem, 1,2-dichlorethanem, methylisobutylketonem, tetrachlormethanem a methylacetátem. Účinnost extrakce výše uvedenými rozpouštědly byla vyzkoušena na vzorku whisky Islay Mist s přidavkem 9 µg/ml standardního roztoku whisky laktonu (3 mg/ml v acetonu). Každý extrakt byl analyzován na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí dvakrát. V **Grafu 1** jsou zobrazeny velikosti ploch cis i trans izomerů při použití uvedených extrakčních činidel, přičemž modře jsou vždy znázorněna data pro trans whisky lakton a oranžově pro cis izomer. Jak je patrné z **Grafu 1**, chlorovaná rozpouštědla vykazovala malé extrakční výtěžky. Velmi nízké extrakční účinky měl i ethylformiát, diethylether, terc-butyl(methyl)ether a hexan. Methylisobutylketon poskytoval dostatečně vysoké extrakční výtěžky, nicméně chromatogram jeho extraktu byl velmi znečištěný a zašuměný. Mezi organická rozpouštědla, která vykazovala dobré výtěžky extrakce a současně poskytovala symetrické píky cis i trans whisky laktonu, patřil tetrahydrofuran, methylacetát a heptan. Velmi zvláštní byl rozdíl ve velikosti ploch analytu při extrakci methylacetátem a ethylacetátem. Při extrakci prvním uvedeným rozpouštědlem byla plocha trans i cis whisky laktonu téměř desetkrát větší než v případě ethylacetátu. Podobný rozdíl v plochách píků whisky laktonu byl pozorován při extrakci hexanem a heptanem. V tomto případě by mohl být rozdíl vysvětlen nižší vzájemnou mísitelností heptanu, vody a alkoholu a tím i menším vlivem obou polárních rozpouštědel na rozpouštěcí schopnost heptanové extrakční fáze. Za nejvhodnější rozpouštědlo pro extrakci whisky laktonu ze vzorků alkoholických nápojů byl zvolen tetrahydrofuran, neboť vykazoval nejvyšší extrakční výtěžnost ze všech použitých rozpouštědel.



Graf 1: Velikosti ploch píků obou izomerů whisky laktonu při extrakci různými rozpouštědly

4.1.3 Ověření opakovatelnosti whisky laktonu ve vzorku Claude Chatelier

V případě whisky laktonu byl pro ověření dobré opakovatelnosti nástřiků použit samotný vzorek Claude Chatelier a vzorek koňaku s přidavkem standardního roztoku whisky laktonu (3 mg/ml). Celkem bylo připraveno pět vzorků koňaku a pět vzorků koňaku s přidavkem 0,3 µg/ml, přičemž každý vzorek byl analyzován pětkrát. Velikosti ploch whisky laktonu pro opakované nástřiky jsou si velmi blízké (**Tab. II**), čemuž odpovídají i poměrně nízké hodnoty relativních směrodatných odchylek (RSD) obou izomerů laktonu, které se pohybují od 0,62 do 1,39 %.

Tab. II: Plochy píkú whisky laktonu při opakovaných nástřicích vzorku Claude Chatelier a vzorku se standardem sotolonu (STD), směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka (RSD)

Vzorek	Plocha trans izomeru	Plocha cis izomeru	Konc. přidaného STD (µg/ml)	Směr. odch. trans izomeru	Směr. odch. cis izomeru	RSD trans izomeru (%)	RSD cis izomeru (%)
1	3493	4657	0	47,22	60,91	1,38	1,32
1	3391	4659	0				
1	3369	4650	0				
1	3405	4515	0				
1	3422	4626	0				
1 + STD	14871	13758	0,3	156,58	187,70	1,07	1,39
1 + STD	14477	13474	0,3				
1 + STD	14527	13608	0,3				
1 + STD	14681	13317	0,3				
1 + STD	14707	13331	0,3				
2	3272	3772	0	37,09	44,52	1,13	1,20
2	3332	3683	0				
2	3304	3684	0				
2	3233	3731	0				
2	3294	3662	0				
2 + STD	14292	10896	0,3	155,59	133,97	1,08	1,26
2 + STD	14491	10566	0,3				
2 + STD	14685	10626	0,3				
2 + STD	14331	10641	0,3				
2 + STD	14418	10584	0,3				
3	3371	3670	0	21,58	32,38	0,65	0,88
3	3347	3646	0				
3	3315	3730	0				
3	3330	3703	0				
3	3328	3675	0				
3 + STD	14812	10818	0,3	128,31	80,69	0,87	0,75
3 + STD	14795	10672	0,3				
3 + STD	14622	10836	0,3				
3 + STD	14512	10871	0,3				
3 + STD	14617	10738	0,3				
4	3255	3271	0	29,55	32,48	0,91	1,00
4	3219	3263	0				
4	3250	3229	0				
4	3261	3192	0				
4	3191	3219	0				

4 + STD	14490	9804	0,3	138,88	125,83	0,97	1,29
4 + STD	14207	9976	0,3				
4 + STD	14370	9773	0,3				
4 + STD	14419	9694	0,3				
4 + STD	14166	9650	0,3				
5	3466	4392	0	34,20	27,62	0,99	0,62
5	3386	4418	0				
5	3473	4442	0				
5	3443	4466	0				
5	3440	4435	0				
5 + STD	15024	13111	0,3	142,13	171,61	0,94	1,29
5 + STD	14918	13161	0,3				
5 + STD	15174	13367	0,3				
5 + STD	15058	13376	0,3				
5 + STD	15287	13530	0,3				

4.1.4 Vyhodnocení množství whisky laktonu v analyzovaných vzorcích

Kvantitativní vyhodnocení se v plynové chromatografii provádí z hodnoty plochy píku, která vyjadřuje množství analytu ve vzorku. K určení správné koncentrace analytu ve vzorku je nutné získat co nejpřesnější hodnotu plochy píku. Běžnými analytickými metodami kvantitativní analýzy jsou metoda vnějšího a vnitřního standardu, metoda standardního přídatku a metoda vnitřní normalizace.

Metoda standardního přídatku vyžaduje provedení analýzy samotného vzorku a vzorku s přídatkem známého množství téhož analytu, který stanovujeme. Tato metoda je velmi spolehlivá, neboť standard přidáváme přímo k matici a reaguje tak za totožných podmínek jako analyt. Mezi nevýhody této metody patří nutnost provést nejméně dvě analýzy pro každý vzorek a potřeba obstarat standard, který není pro všechny látky vždy dostupný.

Pro stanovení koncentrace whisky laktonu v reálných vzorcích byla zvolena metoda standardního přídatku. Vždy byl analyzován samotný vzorek, vzorek s menším přídatkem 0,3 µg/ml a větším přídatkem 3 µg/ml standardního roztoku whisky laktonu o koncentraci 3 mg/ml v acetonu. Samotný vzorek i vzorek s přídatkem standardu byl vždy analyzován dvakrát. Plochy píků obou izomerů v naměřených chromatogramech byly zintegrovány a hodnoty byly zpracovány v tabulkovém procesoru Microsoft Excel (**Tab. III**). Množství analytu ve vzorcích bylo zjištěno pomocí rovnice kalibrační křivky, přičemž byly k výpočtu použity vždy jen plochy samotného vzorku a vzorku s menším přídatkem standardu, neboť

přídavek 0,3 µg/ml standardního roztoku whisky laktonu lépe odpovídal koncentraci analytu v samotném vzorku. Pokud byla do výpočtu zahrnuta i velikost plochy vzorku s větším přídavkem 3 µg/ml a kalibrační křivka tak byla tvořena z šesti bodů (dva pro samotný vzorek, dva pro vzorek s menším přídavkem a dva pro vzorek s větším přídavkem), pak byl výsledek zatížen velkou chybou.

Tab. III: Hodnoty ploch whisky laktonu a vypočítaná koncentrace obou izomerů ve vzorcích

Vzorek	Přídavek whisky laktonu (µg/ml)	Plocha trans whisky laktonu	Plocha cis whisky laktonu	Koncentrace trans whisky laktonu (µg/ml)	Koncentrace cis whisky laktonu (µg/ml)
Claude Chatelier	0	5142	7396	0,105	0,141
	0	4876	6036		
	0,3	13586	12266		
	0,3	13525	12741		
	3	133080	108152		
	3	128129	103083		
Bisquit	0	11269	12703	0,283	0,320
	0	11354	12915		
	0,3	18147	18624		
	0,3	17473	17996		
	3	189338	148477		
	3	165787	131282		
Islay Mist	0	8012	60979	0,120	0,943
	0	7061	57720		
	0,3	20140	71985		
	0,3	18879	60540		
	3	130270	153152		
	3	142615	163174		
Dos Maderas	0	4425	21906	0,061	0,324
	0	3796	21438		
	0,3	12714	29242		
	0,3	17446	32348		
	3	125214	116003		
	3	131309	122016		
Kilchoman	0	10144	71323	0,127	0,900
	0	10181	72530		
	0,3	22866	84114		
	0,3	22024	83117		

	3	159943	185144		
	3	160336	187782		
De Luze	0	2715	3731	0,036	0,051
	0	2639	3727		
	0,3	14473	14332		
	0,3	14124	13929		
	3	111059	86702		
	3	110996	84676		
Sauvignon	0	ND	ND	ND	ND
	0	ND	ND		
	0,3	18661	15853		
	0,3	15129	13163		
	3	174400	140727		
	3	158420	130882		
Rulandské šedé	0	ND	ND	ND	ND
	0	ND	ND		
	0,3	14021	11940		
	0,3	15353	13291		
	3	168858	144109		
	3	168902	139239		
Sherry Cream	0	5058	24235	0,040	0,185
	0	5604	25771		
	0,3	26664	43996		
	0,3	26892	44064		
	3	186329	160442		
	3	203712	180558		
Sherry Medium	0	2791	7065	0,033	0,085
	0	2699	7068		
	0,3	16842	18249		
	0,3	16579	17931		
	3	144650	120053		
	3	147505	118789		
Dornfelder	0	3606	4511	0,044	0,055
	0	3549	4418		
	0,3	15793	14137		
	0,3	17028	17592		
	3	122838	98595		
	3	143202	127852		
Medvědí krev	0	1060	ND	0,025	ND

	0	633	ND		
	0,3	11072	7511		
	0,3	10583	6936		
	3	97713	79045		
	3	136397	119612		
Ruby Port	0	ND	ND	ND	ND
	0	ND	ND		
	0,3	9792	5922		
	0,3	10029	6034		
	3	84111	61505		
	3	85344	61474		
Tawny Porto	0	ND	ND	ND	ND
	0	ND	ND		
	0,3	9573	6086		
	0,3	9762	6176		
	3	78965	59759		
	3	77955	57791		
Chardonnay	0	1135	1193	0,011	0,012
	0	1194	1252		
	0,3	17609	14425		
	0,3	18231	15329		
	3	171829	151971		
	3	174836	150310		
Merlot	0	13606	13876	0,136	0,139
	0	13116	13318		
	0,3	29882	26701		
	0,3	29862	26340		
	3	178330	146338		
	3	186939	149436		

4.2 Sotolon

4.2.1 Volba derivatizačních činidel

Z důvodu přítomnosti kyselého vodíku v molekule sotolonu byl lakton převeden na vhodný silylderivát a acetát sotolonu. Pro derivatizaci sotolonu byla vybrána dvě činidla, a to acetanhydrid a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA). Pro porovnání velikosti odezvy silylderivátu, acetátu a nederivatizovaného sotolonu v reálném vzorku byly provedeny experimenty s vínem Sauvignon. Příprava silylderivátu sotolonu byla provedena následovně a výsledný derivát byl extrahován dichlormethanem a ethylacetátem. Podnětem k vyzkoušení dichlormethanu jako extrakčního činidla byla studie [11], ve které autorka použila právě toto rozpouštědlo pro extrakci silylderivátu sotolonu. K 10 ml Sauvignonu bylo přidáno 60 μ l standardního roztoku sotolonu o koncentraci 3 mg/ml. Extrakce byla provedena s 1 ml ethylacetátu/dichlormethanu, následovala centrifugace a odběr organické fáze do eppendorfky. Poté byla extrakce zopakována opět s 1 ml rozpouštědla, po centrifugaci byl organický podíl opět odebrán do eppendorfky. Obsah eppendorfek byl centrifugován a následně převeden do vialek. Pod proudem dusíku byl obsah vialek opatrně odfoukán do sucha, odparek byl rozpuštěn v 60 μ l N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu a 60 μ l pyridinu. Derivatizace probíhala po dobu 30 minut při teplotě 80 °C. Nakonec byl obsah ve vialkách doplněn do 1 ml hexanem.

Při přípravě acetylovaného sotolonu bylo k 10 ml Sauvignonu a 60 μ l standardního roztoku sotolonu o koncentraci 3 mg/ml přidáno 100 mg NaHCO₃ a 100 μ l acetanhydridu. Po proběhnutí derivatizace, jejíž konec se projevil ukončením vývoje oxidu uhličitého, byl do zkumavky přidán 1 g NaCl. Extrakce byla nejdříve provedena s 1,5 ml ethylacetátu, po centrifugaci byla organická fáze odebrána do vialky. Poté byla extrakce zopakována s 0,5 ml ethylacetátu, následovala centrifugace a odběr organické fáze do vialky.

Příprava extraktu vína bez derivatizace analytu zahrnovala pouze extrakci 10 ml vína s 60 μ l standardu sotolonu o koncentraci 3 mg/ml, 1,5 ml ethylacetátu, po centrifugaci byl organický podíl odebrán do vialky. Extrakce byla zopakována s 0,5 ml ethylacetátu, poté následovala centrifugace a odběr organické fáze do téže vialky.

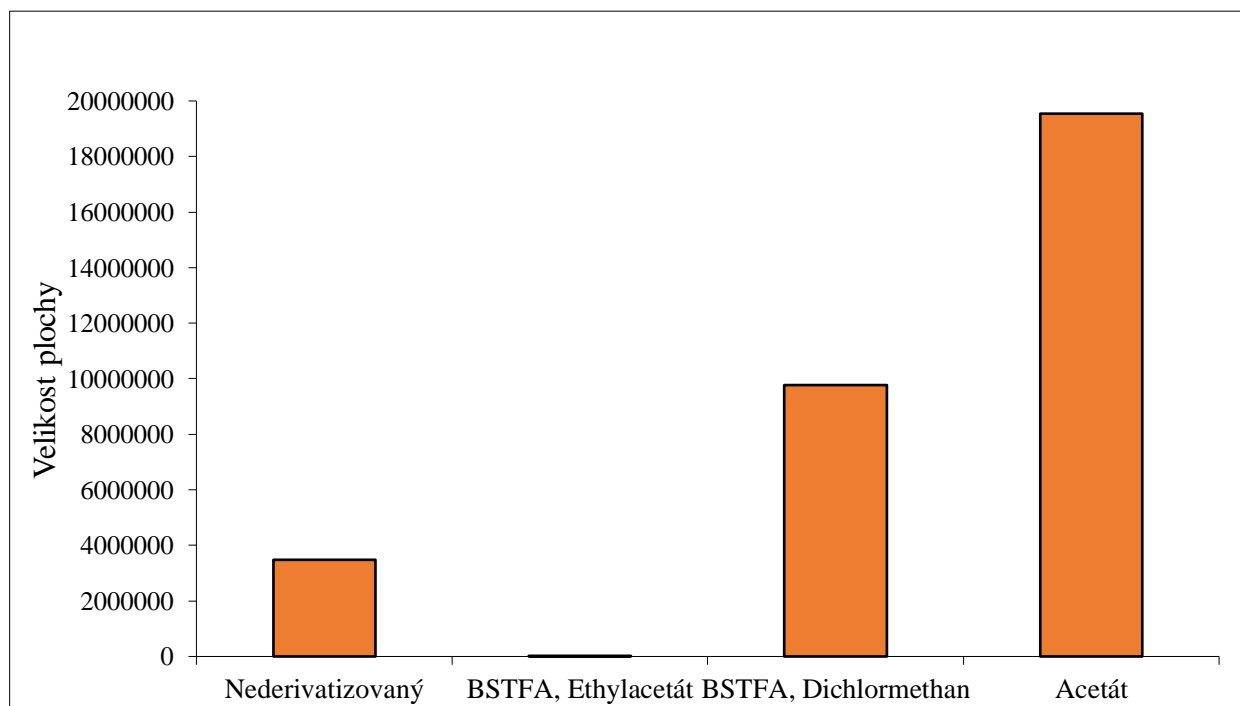
Všechny vzorky byly analyzovány na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem v módu TIC. Pro kvantifikaci nederivatizovaného a acetylovaného sotolonu byl získán rekonstruovaný chromatogram pro ion 128 m/z, pro silylderivát ion 185 m/z. Pro porovnání vlivu teploty na odezvu derivatizovaného a nederivatizovaného sotolonu byly provedeny analýzy při teplotě nástřiku 50 °C resp. 70 °C a teplotě na začátku analýzy 280 °C

resp. 300 °C. Píky odpovídající sotolonu byly zintegrovány a velikosti ploch byly zapsány do **Tab. IV**. Z uvedené tabulky je patrné, že v případě nederivatizovaného sotolonu, acetátu i silylderivátu je ve víně Sauvignon dosaženo větší odezvy při teplotě nástřiku 50 °C a teplotě kolony na začátku analýzy 280 °C.

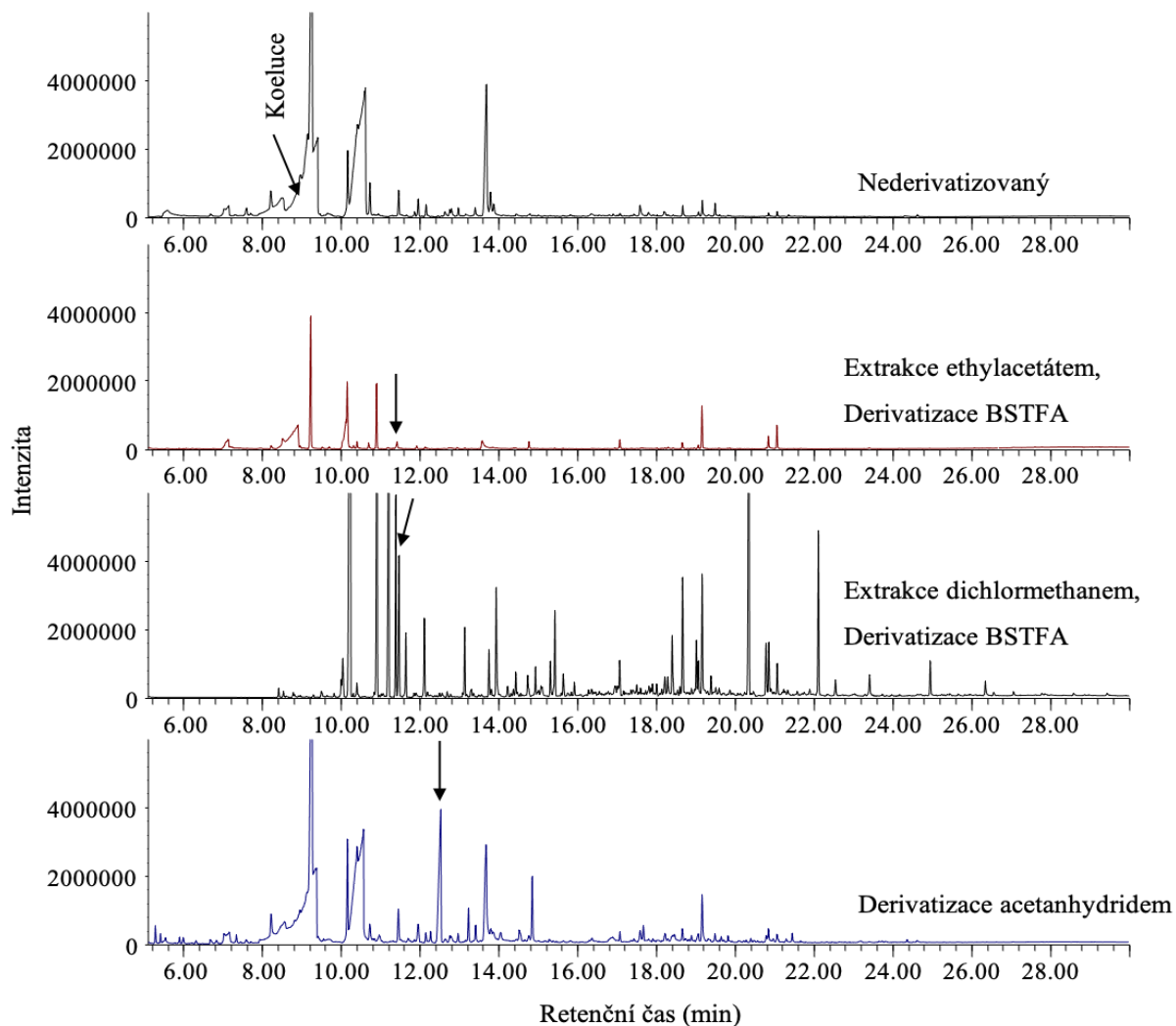
Na **Obr. 5** jsou zaznamenány chromatogramy extraktu vína v módu TIC při teplotách 50 a 280 °C. Jak je patrné z tohoto obrázku, provedení derivatizace sotolonu, konkrétně acetylace a silylace s extrakcí dichlormethanem, je velmi přínosná, neboť analýzou nederivatizovaného sotolonu byl získán chromatogram, kde byl pík sotolonu v koeluci s dalšími složkami z extraktu vína. Veškeré analýzy byly provedeny třikrát, průměrné velikosti ploch píků sotolonu byly zaznamenány do **Grafu 2**, ze kterého je zřejmé, že největší odezvu analytu poskytuje acetát sotolonu. Při extrakci dichlormethanem a následné silanizaci byla získána poloviční odezva v porovnání s acetátem sotolonu. Jak je z **Grafu 2** dobře vidět, nejmenší plochy píku sotolonu byly získány při extrakci ethylacetátem a následné silanizaci. Výše uvedenými experimenty byla ověřena výhoda acetylace sotolonu oproti silanizaci, a to ta, že acetylace probíhá před samotnou extrakcí analytu, zatímco N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid musí být přidán až k vyextrahovanému sotolonu kvůli nízké hydrolytické stabilitě činidla. Silanizací tedy nedojde ke zvýšení výtěžku extrakce, zatímco reakcí sotolonu s acetanhydridem dochází k nahrazení aktivního vodíku hydroxyskupiny a vytvořený derivát sotolonu vykazuje nižší polaritu, proto se lépe extrahuje do ethylacetátu. Pro stanovení sotolonu v analyzovaných vzorcích byla za nejvhodnější metodu derivatizace zvolena acetylace.

Tab. IV: Přehled retenčních časů a ploch píků nederivatizovaného, silylderivátu a acetátu sotolonu při teplotách 50, 280 °C a 70, 300 °C

	Retenční čas sotolonu (50 a 280 °C) (min)	Plocha píku sotolonu (50 a 280 °C)	Retenční čas sotolonu (70 a 300 °C) (min)	Plocha píku sotolonu (70 a 300 °C)
Nederivatizovaný sotolon	9,15	3703211	6,93	266988
		4404861		277619
		2343767		246005
Acetát sotolonu	12,50	21078997	10,31	8721242
		17197277		7964721
		20337118		8508793
Silylderivát sotolonu (ethylacetát)	11,47	24451	9,29	515
		33676		436
		40863		529
Silylderivát sotolonu (dichlormethan)	11,47	9907282	9,29	203076
		9571581		174097
		9813245		213018



Graf 2: Velikosti průměrných ploch píků nederivatizovaného, silylderivátu a acetátu sotolonu ze tří měření

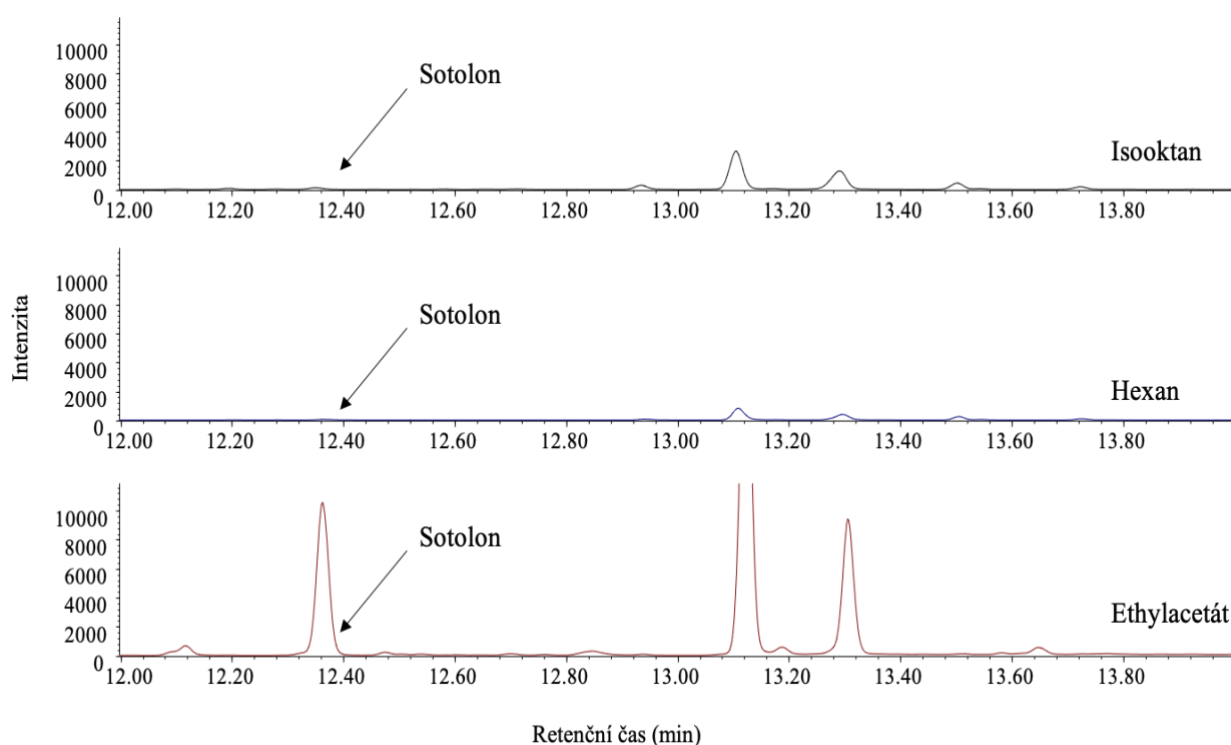


Obr. 5: Chromatogramy extraktu vína s nederivatizovaným sotolonem, silylderivátem a acetátem sotolonu v módu TIC (50 a 280 °C)

4.2.2 Volba extrakčních činidel

Byly provedeny experimenty s různými rozpouštědly, a to s ethylacetátem, dichlormethanem, chloroformem, methylisobutylketonem, hexanem, heptanem, tetrahydrofuranem, tetrachlorethylenem a isooktanem, pro extrakci sotolonu ze vzorků. Při volbě nejvhodnějšího extrakčního činidla pro extrakci acetylovaného sotolonu bylo ve všech experimentech jako vzorek použito fortifikované víno Tawny Porto Monteiro s nebo bez přídavku standardního roztoku sotolonu o koncentraci 3 mg/ml. Při analýze sotolonu za použití dichlormethanu, chloroformu a heptanu jako extrakčních činidel nebyl ve spektru detekován pík derivátu sotolonu. Tetrahydrofuran a tetrachlorethylen extrahovaly pouze nepatrné množství analytu ze vzorku. Extrakcí vzorku methylisobutylketonem byl získán

velmi zašuměný chromatogram a v místě, kde byl očekáván pík derivátu sotolonu, bylo velké množství deformovaných píků. Pro ethylacetát, hexan a isooktan byly technikou vícenásobné extrakce určeny extrakční výtěžky jednotlivých kroků, které jsou uvedeny v **Tab. V**. Použitím těchto tří rozpouštědel pro extrakci sotolonu ze vzorku portského vína s přidavkem 20 μl standardního roztoku sotolonu (3 mg/ml; přidavek 6 $\mu\text{g/ml}$) a porovnáním ploch píku analytu bylo zjištěno, že hexan a isooktan vykazují mnohem nižší extrakční účinnost než ethylacetát (**Tab. V** a **Obr. 6**). V případě, že byl sotolon extrahován hexanem, isooktanem a ethylacetátem ze samotného vzorku vína Tawny Porto Monteiro bez přidavku standardu, bylo zjištěno, že malé množství derivátu sotolonu obsažené ve vzorku vína není hexanem ani isooktanem extrahováno, zatímco ethylacetátem ano. Retenční čas acetylovaného sotolonu byl při použitých podmínkách 12,35 min. Z **Obr. 7** a **8** je patrné, že se v chromatogramech hexanových a isooktanových extraktů vína v čase 12,35 min žádný pík neobjevil. Z uvedených experimentů vyplývá, že nejvhodnějším rozpouštědlem pro extrakci sotolonu z reálných vzorků je ethylacetát.



Obr. 6: Chromatogram extraktu Tawny Porto Monteiro s přidavkem 6 $\mu\text{g/ml}$ sotolonu v módu SIM 128 m/z a s nástřikem 1 μl

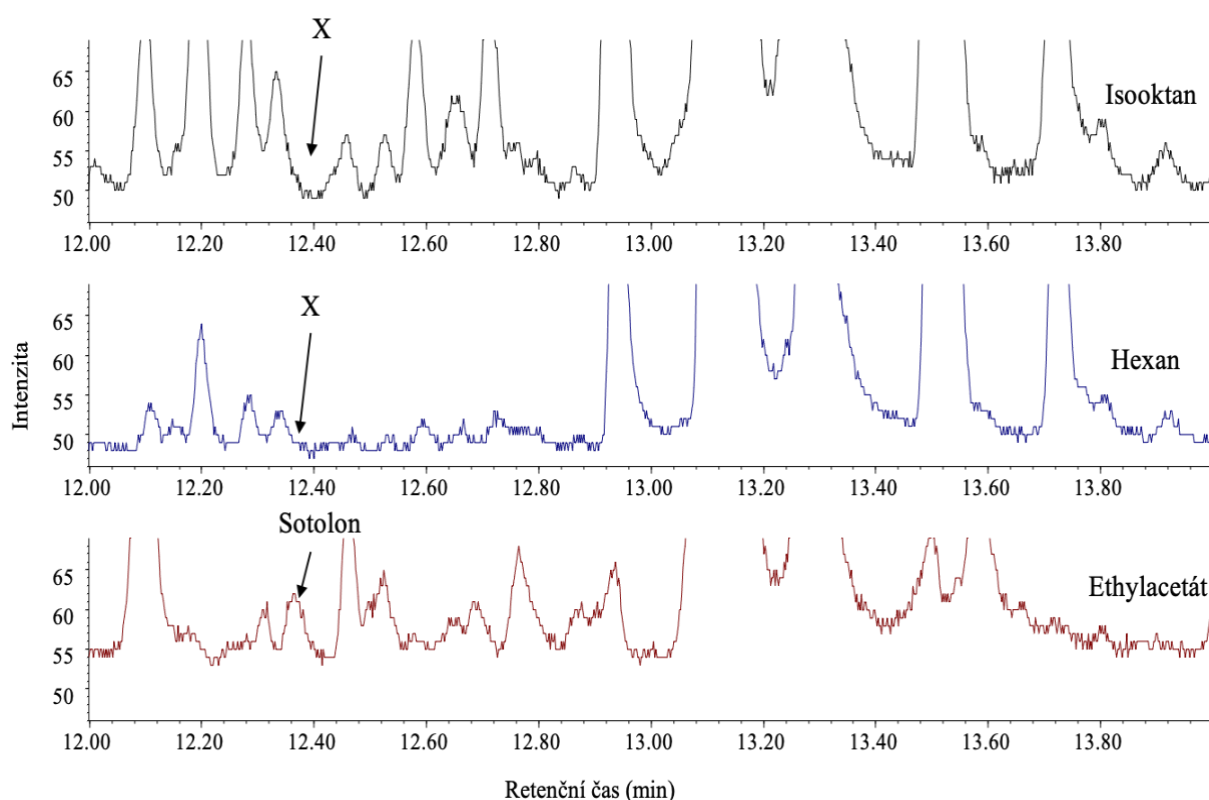
Tab. V: Výtěžnost několikanásobné extrakce sotolonu ze vzorku Tawny Porto Monteiro s přidavkem 20 µl standardu při extrakci isooktanem, hexanem a ethylacetátem

Rozpouštědlo	Přídavek sotolonu (µg/ml)	Plocha píku sotolonu 128 m/z	Výtěžnost extrakce (%)
Isooktan 1.extrakce	6	2505	53,47
Isooktan 1.extrakce	6	2773	
Isooktan 2.extrakce	6	1292	5,70
Isooktan 2.extrakce	6	1164	
Isooktan 3.extrakce	6	1249	11,57
Isooktan 3.extrakce	6	1067	
Isooktan 4.extrakce	6	1222	
Isooktan 4.extrakce	6	826	
Hexan 1.extrakce	6	1163	35,72
Hexan 1.extrakce	6	1116	
Hexan 2.extrakce	6	774	35,49
Hexan 2.extrakce	6	691	
Hexan 3.extrakce	6	487	35,24
Hexan 3.extrakce	6	458	
Hexan 4.extrakce	6	331	
Hexan 4.extrakce	6	281	
Ethylacetát 1.extrakce	6	164559	62,04
Ethylacetát 1.extrakce	6	-	
Ethylacetát 2.extrakce	6	64156	66,30
Ethylacetát 2.extrakce	6	60784	
Ethylacetát 3.extrakce	6	21934	71,16
Ethylacetát 3.extrakce	6	20174	
Ethylacetát 4.extrakce	6	6083	
Ethylacetát 4.extrakce	6	6063	

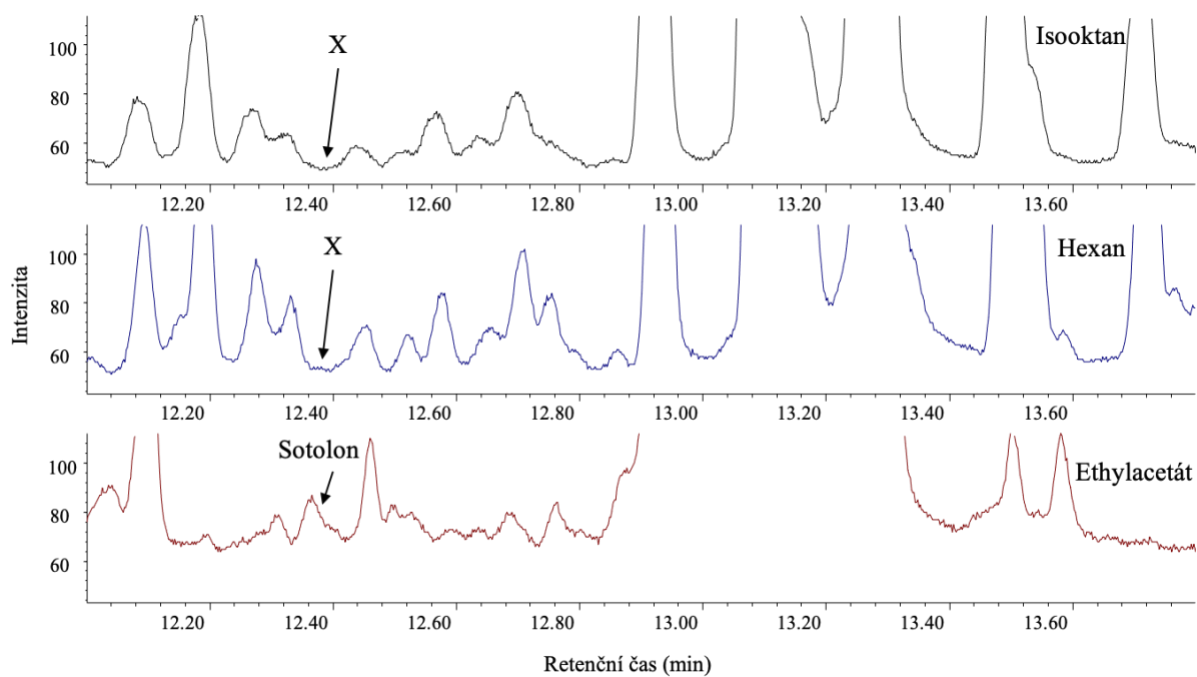
4.2.3 Vliv velikosti nástřiku vzorku na tvar píků

Na vzorcích portského vína Tawny Porto Monteiro s přidavkem 20 µl standardního roztoku sotolonu (3 mg/ml; přídavek 6 µg/ml) i bez přidavku extrahovaných ethylacetátem, hexanem a isooktanem bylo vyzkoušeno dávkování 1, 2 a 4 µl extraktu do plynového chromatografu při tlaku 30 psi. Pík sotolonu s retenčním časem 12,35 minut byl sledován v módu SIM 128 m/z. Všechna tři zmíněná činidla poskytovala při vyšších nástřicích extraktu vína s přidavkem standardu velmi široké asymetrické píky s posunutými retenčními časy. Při analýze samotného vzorku vína bez přidavku standardu extrahovaného hexanem a isooktanem nebyl acetát sotolonu detekován při žádném ze tří uvedených objemů

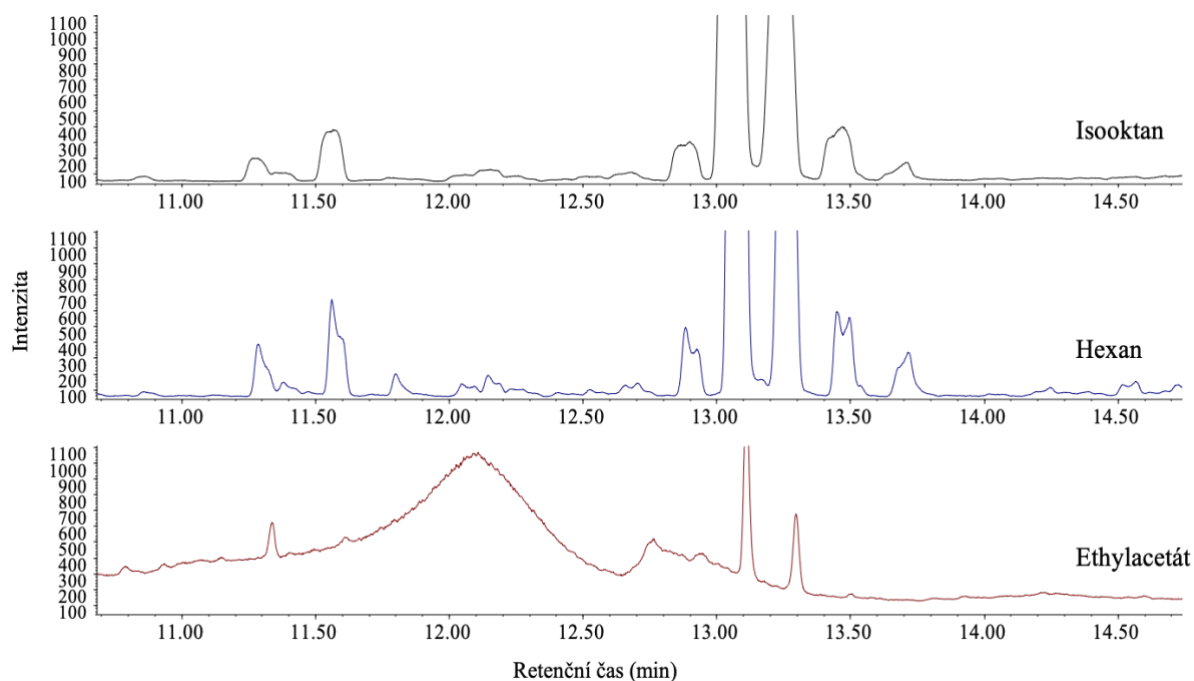
dávkování (**Obr. 7, 8, 9**). V případě dávkování 4 μl samotného vzorku vína extrahovaného ethylacetátem se v chromatogramu, v místě kde byl očekáván pík sotolonu, objevil velmi široký rozmytý pík, který pravděpodobně vznikl koelucí sotolonu s dalšími látkami (**Obr. 9**). Při nástřiku 2 μl téhož extraktu se situace značně zlepšila a pík sotolonu byl pouze mírně rozšířený. Požadovaný symetrický a úzký pík sotolonu byl získán dávkováním 1 μl extraktu do plynového chromatografu.



Obr. 7: Chromatogram derivatizovaného sotolonu extrahovaného ze vzorku Tawny Porto Monteiro (bez přidavku standardu) ethylacetátem, hexanem a isooktanem v módu SIM 128 m/z při nástřiku 1 μl



Obr. 8: Chromatogram sotolonu extrahovaného ze vzorku Tawny Porto Monteiro (bez přídavku standardu) ethylacetátem, hexanem a isooktanem v módu SIM 128 m/z při nástřiku 2 μ l



Obr. 9: Chromatogram sotolonu extrahovaného ze vzorku Tawny Porto Monteiro (bez přídavku standardu) ethylacetátem, hexanem a isooktanem v módu SIM 128 m/z při nástřiku 4 μ l

4.2.4 Vliv vysolení na výtěžnost extrakce

Zvýšením iontové síly roztoku přidáním soli obvykle vzroste výtěžek extrakce především organických látek. Vliv přidavku 1 g chloridu sodného na výtěžnost extrakce ethylacetátem byl vyzkoušen v experimentu se vzorkem Tawny Porto Monteiro s přidavkem 20 µl standardního roztoku sotolonu (3mg/ml; přídavek 6 µg/ml). Hodnoty ploch píků sotolonu byly zintegrovány a zapsány do **Tab. VI**. Jak je patrné, při vysolení bylo dosaženo vyšších extrakčních výtěžků než bez použití soli, a to o téměř 7 %.

Tab. VI: Výtěžnost extrakce derivátu sotolonu ze vzorku s přidavkem bez a s použitím soli

	Přídavek sotolonu (µg/ml)	Plocha píku sotolonu 128 m/z	Výtěžnost extrakce (%)
1. Extrakce bez soli	6	240202	54,95
1. Extrakce bez soli	6	214723	
2. Extrakce bez soli	6	108885	
2. Extrakce bez soli	6	96064	
1. Extrakce se solí	6	164559	62,04
1. Extrakce se solí	6	-	
2. Extrakce se solí	6	64156	
2. Extrakce se solí	6	60784	

4.2.5 Vliv počáteční teploty kolony a teploty nástřiku na opakovatelnost

Byly připraveny čtyři vzorky portského vína Tawny Porto Monteiro bez přidavku a čtyři vzorky s přidavkem 0,06 µg/ml standardního roztoku sotolonu (3 mg/ml). Všechny vzorky byly extrahovány ethylacetátem a každý z nich byl analyzován na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem třikrát. Velikosti ploch píků acetylovaného sotolonu byly zintegrovány a zapsány do **Tab. VII**. Při teplotě nástřiku 280 °C a teplotě kolony na začátku programu 50 °C byla opakovatelnost velmi nízká, jak ukazuje **Tab. VII** a **Obr. 10**. U vzorků s nižším obsahem matricových komponent, než je obsaženo v portském víně, jako jsou klasická vína, whisky či koňak, byly naměřené hodnoty pro opakované nástřiky při teplotě nástřiku 50 °C a počáteční teplotě kolony 280 °C vyhovující.

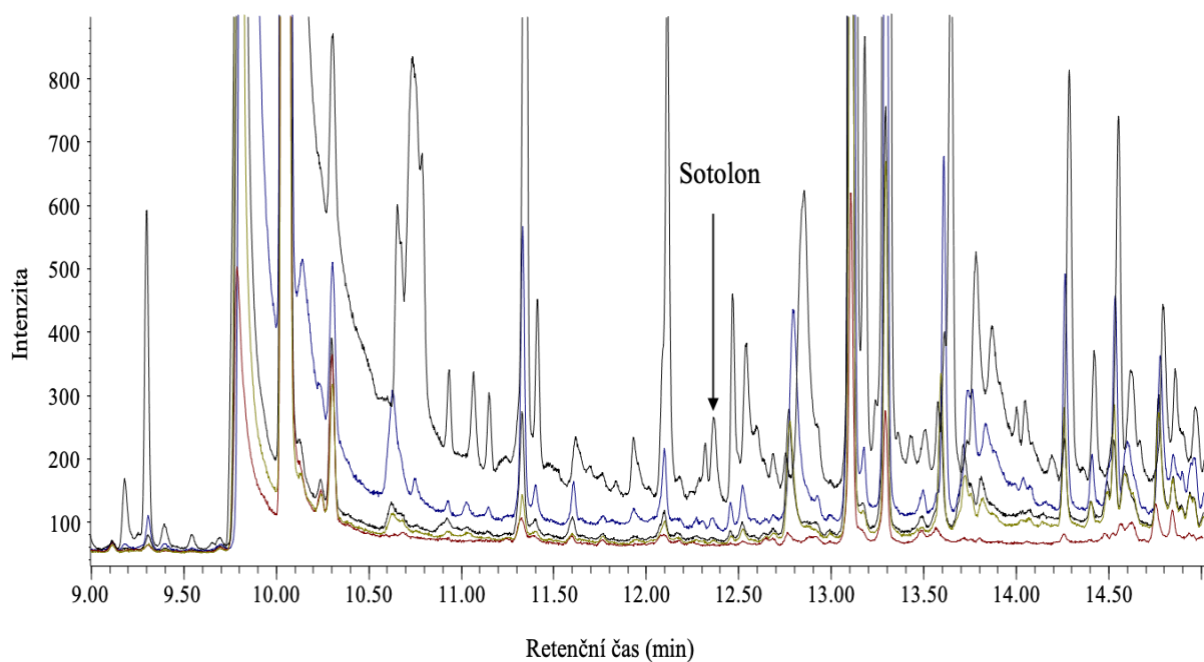
Důvodem nízké opakovatelnosti v případě portského vína může být velké množství balastních látek ve vzorku, tyto látky kondenzují a tvoří tlustý film na začátku kolony, který

na sebe může vázat sotolon. Proto byl vyzkoušen experiment, při kterém byl vzorek portského vína 2,5× ředěn, aby se snížilo množství balastních látek v extraktu a takto zředěný vzorek byl analyzován při teplotě nástřiku 280 °C a teplotě kolony na začátku analýzy 50 °C. Ředěním vzorku vína se zlepšila opakovatelnost, ale zároveň také došlo ke zhoršení meze detekce.

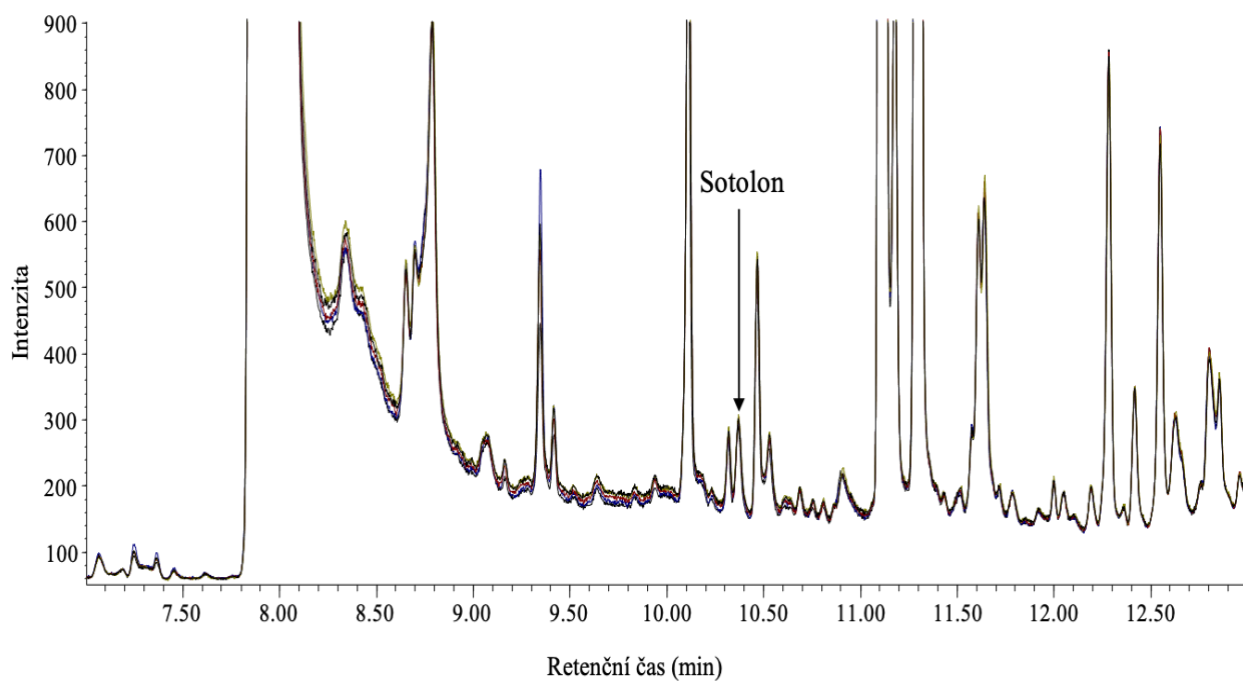
Dalším možným řešením je zvýšení teploty nástřiku a teploty kolony na začátku programu tak, aby balastní látky vytvořily lépe reprodukovatelný homogenní film. Teplota nástřiku i počáteční teplota kolony byla zvýšena o 20 °C, resp. na 300 °C a 70 °C, a každý vzorek byl analyzován 5×. Zvýšením teplot došlo k mnohonásobnému zlepšení opakovatelnosti, jak je patrné z **Tab. VIII** a **Obr. 11**. Z **Obr. 12** je vidět, že zvýšením teploty nástřiku na 300 °C a ponecháním počáteční teploty kolony na 50 °C došlo jen k malému zvýšení odezvy sotolonu, zatímco při zvýšení teploty nástřiku i teploty kolony na začátku analýzy o 20 °C se odezva sotolonu několikanásobně zvýšila. Zvýšením teploty se také zkrátil retenční čas analytu z původních 12,35 minut na 10,35 minut. Těmito experimenty bylo zjištěno, že v případě stanovení sotolonu ve vzorcích s vysokým obsahem balastních látek je výhodné pro dosažení větší fokusace sotolonu a tím i lepší odezvy zvýšit teplotu nástřiku a teplotu kolony na začátku analýzy.

Tab. VII: Plochy acetátu sotolonu při opakovaných nástřících vzorku Tawny Porto Monteiro a vzorku se standardem (STD) při teplotách 280 °C a 50 °C, relativní směrodatná odchylka (RSD)

Vzorek	Plocha píku	Přídavek sotolonu (µg/ml)	Směrodatná odchylka	RSD (%)
1	2353	0	1145,70	73,19
1	2092	0		
1	251	0		
1 + STD	1927	0,06	829,49	59,33
1 + STD	442	0,06		
1 + STD	1825	0,06		
2	1428	0	411,00	23,45
2	2215	0		
2	1616	0		
2 + STD	2158	0,06	635,17	24,70
2 + STD	3303	0,06		
2 + STD	2254	0,06		
3	221	0	206,66	45,06
3	559	0		
3	596	0		
3 + STD	1512	0,06	732,38	38,89
3 + STD	2727	0,06		
3 + STD	1411	0,06		
4	875	0	320,44	32,48
4	1348	0		
4	737	0		
4 + STD	794	0,06	507,48	44,27
4 + STD	917	0,06		
4 + STD	1728	0,06		



Obr. 10: Překrývající se chromatogramy opakovaných nástřiků vzorku Tawny Porto Monteiro při teplotách 280 °C a 50 °C

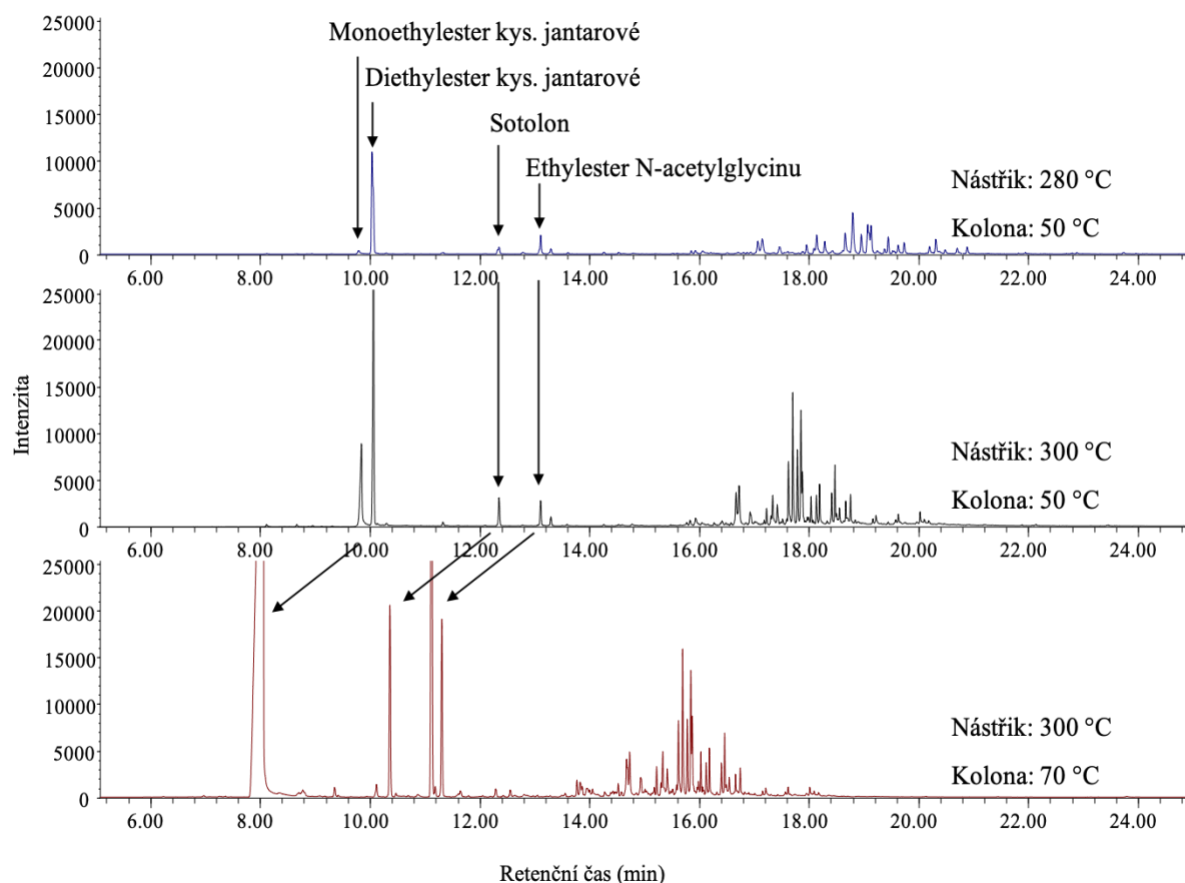


Obr. 11: Překrývající se chromatogramy opakovaných nástřiků vzorku Tawny Porto Monteiro při teplotách 300 °C a 70 °C

Tab. VIII: Plochy acetátu sotolonu při opakovaných nástřicích vzorku Tawny Porto Monteiro a vzorku se standardem (STD) při teplotách 300 °C a 70 °C, relativní směrodatná odchylka (RSD)

Vzorek	Plocha	Přídavek standardu sotolonu (µg/ml)	Směrodatná odchylka	RSD (%)
1	2725	0	41,11	1,52
1	2668	0		
1	2663	0		
1	2700	0		
1	2775	0		
1 + STD	3700	0,06	121,63	3,32
1 + STD	3612	0,06		
1 + STD	3784	0,06		
1 + STD	3786	0,06		
1 + STD	3462	0,06		
2	3452	0	131,56	3,88
2	3526	0		
2	3514	0		
2	3215	0		
2	3255	0		
2 + STD	4340	0,06	166,51	3,68
2 + STD	4814	0,06		
2 + STD	4409	0,06		
2 + STD	4455	0,06		
2 + STD	4577	0,06		
3	2934	0	48,53	1,62
3	3001	0		
3	2986	0		
3	3085	0		
3	3004	0		
3 + STD	4092	0,06	43,84	1,09
3 + STD	4036	0,06		
3 + STD	3956	0,06		
3 + STD	4018	0,06		
3 + STD	4041	0,06		
4	3880	0	43,94	1,15
4	3858	0		
4	3766	0		
4	3780	0		
4	3810	0		
4 + STD	5642	0,06	61,03	1,07

4 + STD	5707	0,06		
4 + STD	5744	0,06		
4 + STD	5781	0,06		
4 + STD	5618	0,06		



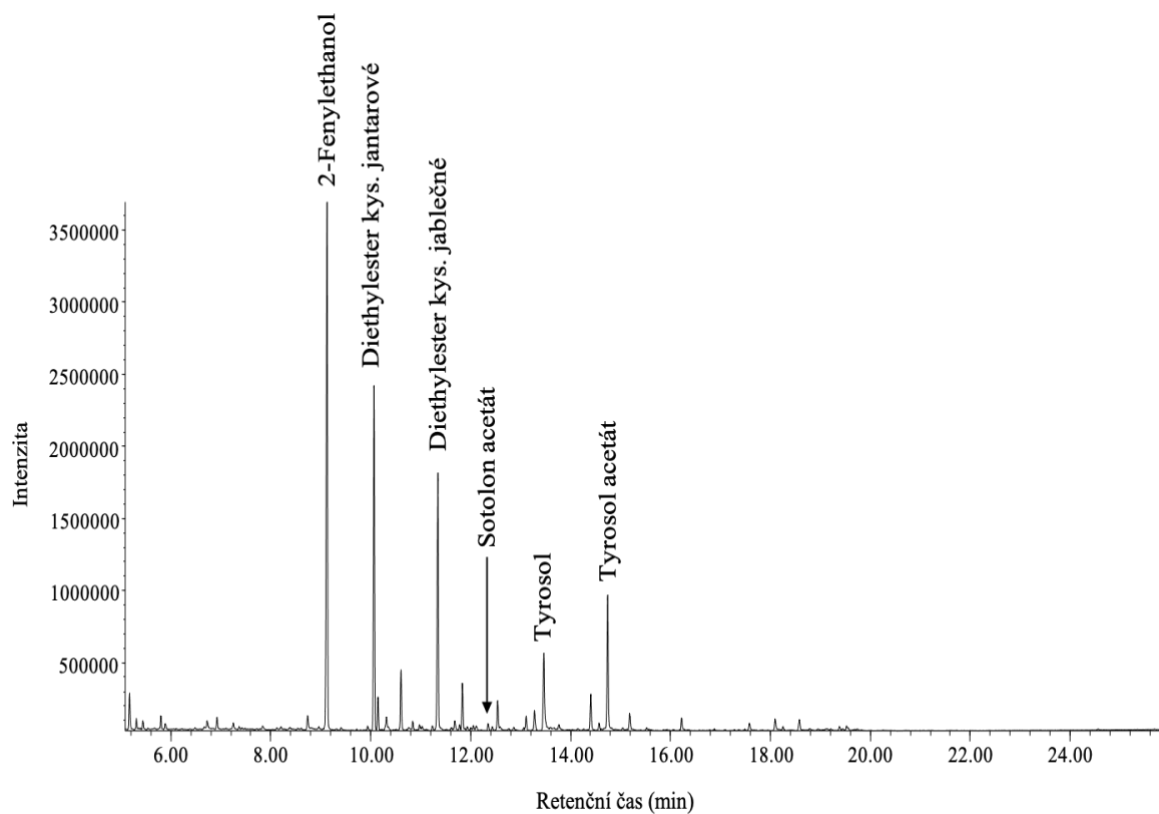
Obř. 12: Chromatogramy vzorku Tawny Porto Monteiro extrahovaného ethylacetátem při různých teplotách nástřiku a teplotách kolony na začátku analýzy

4.2.6 Vliv přídavku balastních látek na velikost odezvy sotolonu

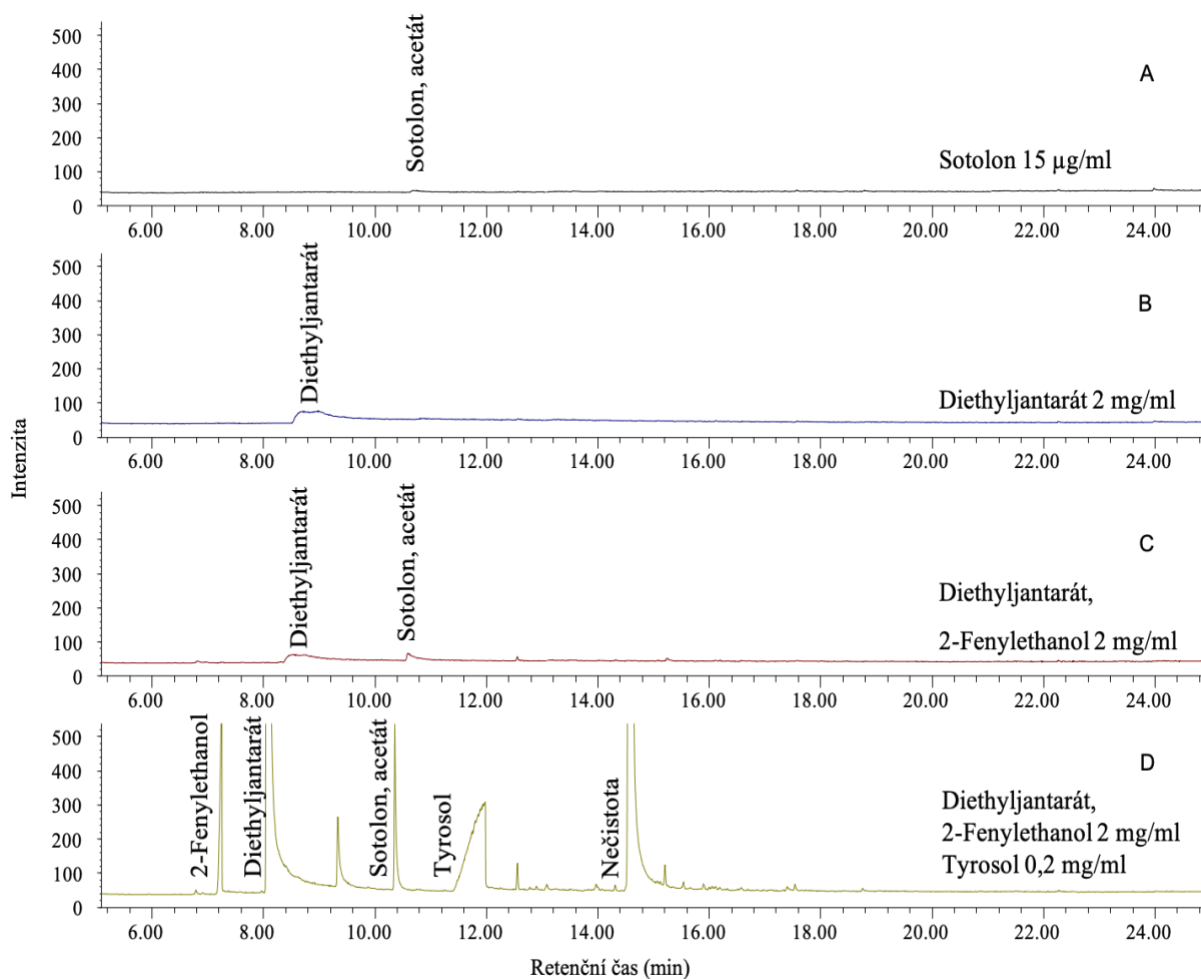
Jak již bylo výše zmíněno, při analýze vína Tawny Porto Monteiro bylo zjištěno, že toto portské víno obsahuje velké množství balastních látek, které mohou při vhodném teplotním programu účinně fokusovat analyt. Velkou odezvu v chromatogramu vykazovaly především tři látky, a to 2-fenylethanol, diethylester kyseliny jantarové a tyrosol (2-(4-hydroxyfenyl)ethanol). 2-fenylethanol a diethylester kyseliny jantarové měl kratší retenční čas než analyt, zatímco pík tyrosolu se v chromatogramu objevil až za sotolonem

(**Obr. 13**). Nejdříve byly vyzkoušeny experimenty s postupným přidáváním zmíněných balastních látek do modelového vzorku 10% ethanolického roztoku s přídavkem 20 μ l standardního roztoku sotolonu (3 mg/ml) extrahovaného ethylacetátem a byla sledována velikost odezvy sotolonu v závislosti na koncentraci a charakteru přidaných látek. Výsledné chromatogramy získané z těchto experimentů jsou uvedeny na **Obr. 14**. Nejdříve byl analyzován samotný modelový vzorek s přídavkem 15 μ g/ml sotolonu, který byl extrahován ethylacetátem. Výsledek této analýzy je uveden na **Obr. 14 A**, v získaném chromatogramu je pouze nepatrný pík derivatizovaného sotolonu v čase 10,8 min. Po přídavku 1 μ l diethylesteru kyseliny jantarové do téhož ethanolického roztoku, který byl již analyzován v předešlém kroku, nedošlo ke změně odezvy sotolonu (**Obr. 14 B**). Přidáním 1 μ l 2-fenylethanolu do ethanolického roztoku se sotolonem a diethylesterem kyseliny jantarové se pík derivátu sotolonu mírně zvětšil, jak ukazuje **Obr. 14 C**. Z chromatogramu **D** na **Obr. 14** je patrné, že se odezva derivatizovaného sotolonu mnohonásobně zvýšila až po přidání tyrosolu do ethanolického roztoku se sotolonem, diethyljantarátem a 2-fenylethanolem.

Veškeré modelové vzorky s přídavkem standardu a balastních látek byly proměřeny v módu SIM 128 m/z, proto jsou velikosti odezev balastních látek v chromatogramu **D** (**Obr. 14**) zkrácené. Vzhledem k tomu, že tyrosol obsahuje volnou hydroxylovou skupinu, může stejně jako sotolon podléhat derivatizaci a znemožňovat tak převádění sotolonu na derivát. Byla tudíž snaha najít jinou látku, která by nepodléhala acetylaci a současně by fokusovala pík sotolonu. Jedním z vhodných kandidátů by mohl být pentadekan. Ten neobsahuje funkční skupinu, která by měla tendenci se derivatizovat, a současně má na nepolární koloně větší retenční index než sotolon, takže se eluuje až za ním stejně jako tyrosol. Opět byl vliv přídavku pentadekanu na odezvu sotolonu pozorován na modelovém vzorku 10% ethanolického roztoku s přídavkem 15 μ g/ml sotolonu. Porovnáním výsledků analýz v módu SIM 128 m/z samotného modelového vzorku se sotolonem a modelového vzorku se sotolonem a 1 μ l pentadekanu bylo zjištěno, že samotný přídavek pentadekanu nemá na tvar a velikost píku laktonu žádný vliv. Pokud byl do ethanolického roztoku se sotolonem a pentadekanem přidán 1 μ l diethylesteru kyseliny jantarové a 1 μ l 2-fenylethanolu, pak se odezva sotolonu mírně zvýšila, nicméně pík analytu byl širší a menší než v případě použití směsi diethylesteru kyseliny jantarové, 2-fenylethanolu a tyrosolu.



Obr. 13: Chromatogram portského vína bez přídavku sotolonu a balastních látek



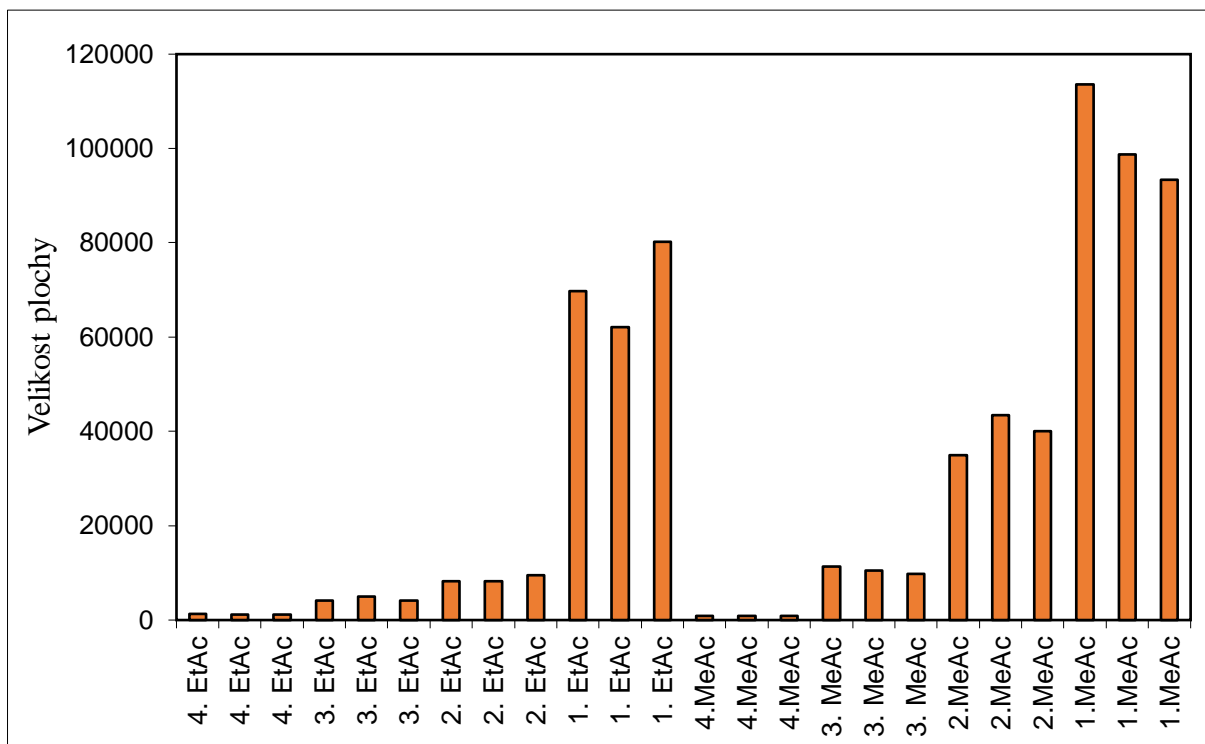
Obr. 14: Chromatogramy 10% ethanolického roztoku měřeného v módu SIM 128 m/z bez a s přidavky balastních látek (A – ethanolický roztok s přidavkem 15 $\mu\text{g/ml}$ sotolonu, B - ethanolický roztok s přidavkem 15 $\mu\text{g/ml}$ sotolonu a 2 mg/ml diethyljantarátu, C - ethanolický roztok s přidavkem 15 $\mu\text{g/ml}$ sotolonu, 2 mg/ml diethyljantarátu a 2-fenylethanolu, D - ethanolický roztok s přidavkem 15 $\mu\text{g/ml}$ sotolonu, 0,2 mg/ml tyrosolu, 2 mg/ml diethyljantarátu a 2-fenylethanolu)

Pro extrakci byl použit ethylacetát, který byl vyhodnocen jako nejlepší činidlo pro extrakci sotolonu. Nicméně při extrakci whisky laktonu ze vzorku Islay Mist methylacetátem a ethylacetátem bylo pozorováno, že extrakční výtěžky při použití methylacetátu byly až desetkrát větší než v případě ethylacetátu (**Graf 1**). Proto byly vyzkoušeny experimenty pro ověření, zda se takto rozdílné výtěžky projeví i v případě extrakce sotolonu. Účinnost několikanásobné extrakce derivátu sotolonu oběma rozpouštědly byla testována na vzorku Tawny Porto Monteiro a do výsledného extraktu byly přidány balastní látky (2-fenylethanol, diethylester kyseliny jantarové a tyrosol). Pokusy pro vyhodnocení účinnosti extrakce byly

provedeny následovně. Do zkumavky bylo k 10 ml portského vína přidáno 100 mg NaHCO₃, 20 µl standardního roztoku sotolonu (3 mg/ml, přídavek 6 µg/ml) a 100 µl acethydridu, po proběhnutí derivatizace, jejíž konec se projevil ukončením vývoje oxidu uhličitého (asi 20 minut), byl přidán 1 g NaCl. Připravený roztok byl extrahován 1,5 ml ethylacetátu respektive 2,5 ml methylacetátu, po protřepání a centrifugaci byla organická fáze odebrána do vialky. Větší objem methylacetátu byl zvolen kvůli jeho vysoké rozpustnosti v alkoholu, pokud byla extrakce provedena pouze s 1,5 ml methylacetátu, nedošlo ke vzniku fázového rozhraní. Druhý, třetí i čtvrtý podíl extrakce byl vždy proveden s 1 ml ethylacetátu/methylacetátu, po extrakci a centrifugaci byla organická fáze odebrána do nových vialek. Objem získaného extraktu byl ve všech vialkách upraven na 1 ml odfoukáním přebytečného rozpouštědla dusíkem. Následně bylo do všech vialek přidáno 50 µl roztoku obsahujícího 4 mg tyrosolu, 40 µl diethylesteru kyseliny jantarové, 40 µl 2-fenylethanolu a 920 µl ethylacetátu/methylacetátu. Tato směs balastních látek byla přidána do všech vialek s hotovými extrakty, aby byla zajištěna stejná koncentrace balastních látek ve všech čtyřech podílech extrakce. Výsledné extrakty byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí třikrát. Zintegrované plochy derivátu sotolonu byly zaznamenány do **Tab. IX** a byly z nich vypočteny výtěžky extrakce. Při pohledu na **Graf 3** znázorňující závislost velikosti ploch píků sotolonu na volbě extrakčního činidla při čtyřnásobné extrakci se může zdát, že lepší extrakční účinek má v tomto případě methylacetát, jelikož při extrakci tímto rozpouštědlem byly získány větší hodnoty ploch píků. Ale při porovnání výtěžků extrakce jednotlivých extrakčních kroků a kumulativní výtěžnosti po druhé extrakci (**Tab. IX**) bylo zjištěno, že lepší extrakční výtěžnost poskytuje ethylacetát, a to 93,73 %, zatímco methylacetát dává výtěžnost 89,64 %. Další výhodou při použití ethylacetátu je jeho menší rozpustnost v analyzovaných alkoholických vzorcích.

Tab. IX: Velikosti ploch píku sotolonu při čtyřnásobné extrakci a výtěžnost extrakce

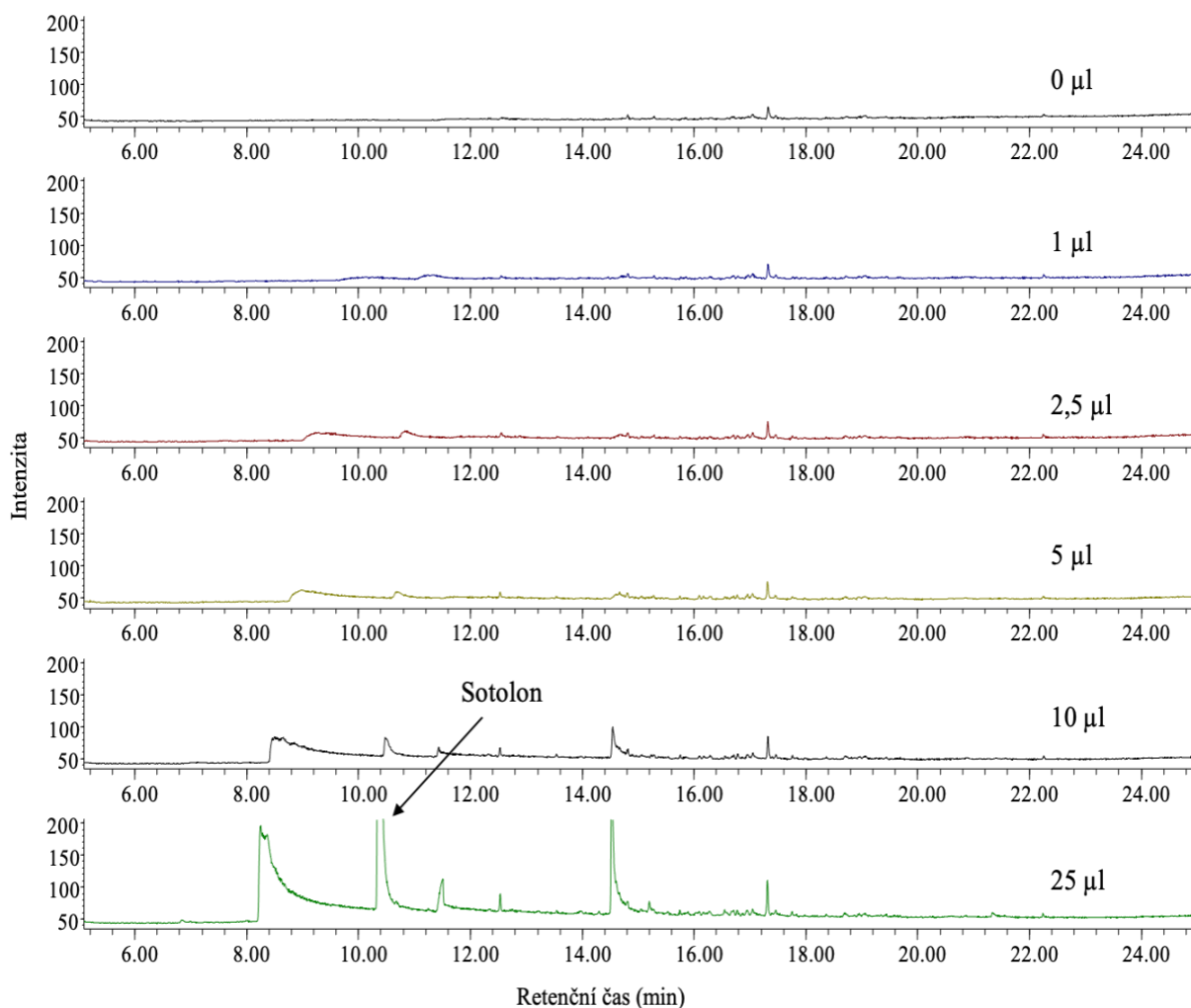
Rozpouštědlo	Přídavek sotolonu (µg/ml)	Plocha píku sotolonu	Výtěžnost extrakce (%)	Kumulativní výtěžnost extrakce (%)
Ethylacetát 1. extrakce	6	80154	87,76	
Ethylacetát 1. extrakce	6	62092		
Ethylacetát 1. extrakce	6	69804		
Ethylacetát 2. extrakce	6	9464	48,74	93,73
Ethylacetát 2. extrakce	6	8243		
Ethylacetát 2. extrakce	6	8238		
Ethylacetát 3. extrakce	6	4119	73,46	98,34
Ethylacetát 3. extrakce	6	4996		
Ethylacetát 3. extrakce	6	4184		
Ethylacetát 4. extrakce	6	1006		
Ethylacetát 4. extrakce	6	1189		
Ethylacetát 4. extrakce	6	1235		
Methylacetát 1. extrakce	6	93393	61,19	
Methylacetát 1. extrakce	6	98693		
Methylacetát 1. extrakce	6	113519		
Methylacetát 2. extrakce	6	40070	73,31	89,64
Methylacetát 2. extrakce	6	43515		
Methylacetát 2. extrakce	6	35021		
Methylacetát 3. extrakce	6	9792	91,65	99,14
Methylacetát 3. extrakce	6	10520		
Methylacetát 3. extrakce	6	11342		
Methylacetát 4. extrakce	6	910		
Methylacetát 4. extrakce	6	877		
Methylacetát 4. extrakce	6	856		



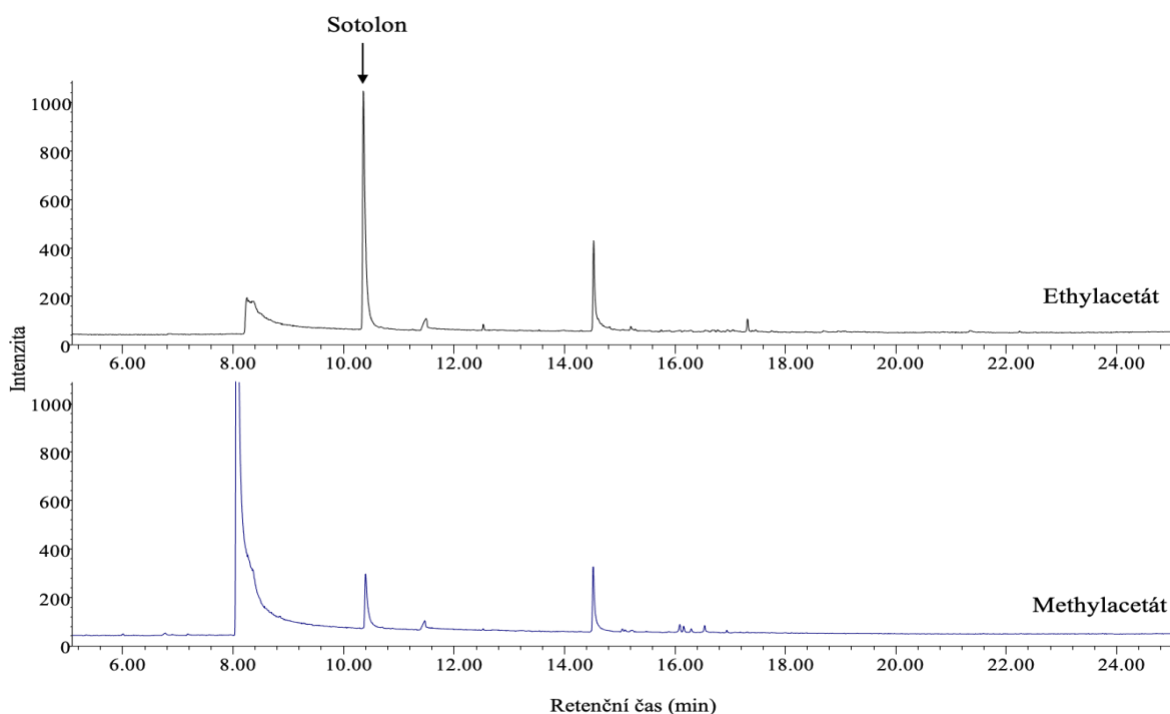
Graf 3: Grafické vyjádření velikosti ploch sotolonu při čtyřnásobné extrakci ethylacetátem (EtAc)/methylacetátem (MeAc) ze vzorku vína

Na modelových vzorcích 10% ethanolických roztoků extrahovaných ethylacetátem i methylacetátem byl také pozorován vliv koncentrace přidávaných balastních látek na tvar píku sotolonu a velikost odezvy. Všechny vzorky byly připraveny následujícím způsobem. Do vialek bylo odpipetováno 0,5 ml extraktu 10% ethanolického roztoku s přidavkem 20 μ l standardního roztoku sotolonu (3 mg/ml) extrahovaného ethylacetátem/methylacetátem. Poté byla do vialek přidána předem připravená směs 4 mg tyrosolu, 40 μ l diethylesteru kyseliny jantarové, 40 μ l 2-fenylethanolu a 920 μ l ethylacetátu/methylacetátu s rostoucí koncentrací odpovídající 0; 1; 2,5; 5; 10 a 25 μ l. Každá vialka pak byla doplněna na objem 550 μ l ethylacetátem/methylacetátem. Vzorky byly analyzovány v módu SIM 128 m/z. Na **Obr. 15** jsou zobrazeny chromatogramy s postupně se zvyšující koncentrací přidávaných balastních látek. Z obrázku je patrné, že s rostoucí koncentrací balastních látek v modelovém vzorku extrahovaném ethylacetátem se zvyšuje odezva analytu, stejný průběh byl pozorován i při použití methylacetátu jako extrakčního činidla. Bylo zjištěno, že k získání symetrického píku sotolonu s dostatečnou odezvou je vhodné přidat ke vzorku 25 μ l připravené směsi (4 mg tyrosolu, 40 μ l diethylesteru kyseliny jantarové, 40 μ l 2-fenylethanolu a 920 μ l ethylacetátu/methylacetátu). Na **Obr. 16** jsou chromatogramy extraktů

ethylacetátu/methylacetátu s přidavkem 25 μl směsi (4 mg tyrosolu, 40 μl diethylesteru kyseliny jantarové, 40 μl 2-fenylethanolu a 920 μl ethylacetátu/methylacetátu). Z tohoto obrázku je zřejmé, že sotolon (10,35 min) vykazuje mnohem větší odezvu ve vzorku extrahovaném ethylacetátem, kde lze vzhledem k vyšší teplotě varu (ethylacetát 77,1 $^{\circ}\text{C}$, methylacetát 57,3 $^{\circ}\text{C}$ [39]) očekávat lepší podmínky pro fokusaci analytu na začátku kolony.



Obr. 15: Chromatogramy ethanolického roztoku extrahovaného ethylacetátem s přidavky 0; 1; 2,5; 5; 10 a 25 μl směsi 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tyrosolu, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 2-fenylethanolu a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diethyljantarátu v módu SIM 128 m/z



Obr. 16: Chromatogramy ethanolického roztoku extrahovaného methylacetátem/ethylacetátem s přidavkem 25 μ l směsi (4 mg tyrosolu, 40 μ l diethylesteru kyseliny jantarové, 40 μ l 2-fenylethanolu a 920 μ l ethylacetátu/methylacetátu) v módu SIM 128 m/z

Výše uvedené informace o vhodném množství přidaných balastních látek a volbě extrakčního činidla mezi methylacetátem a ethylacetátem vyzkoušených na modelových vzorcích a portském víně byly použity pro ověření, zda lze tyto poznatky aplikovat i na další typ vzorků, a to klasické víno Sauvignon a whisky Kilchoman. Pro porovnání byl tento pokus znovu proveden i pro vzorek Tawny Porto Monteiro. Do zkumavek bylo ke 100 mg NaHCO_3 , respektive 50 mg NaHCO_3 pro whisky, přidáno 10 ml vína nebo 4 ml whisky a 6 ml destilované vody. Do zkumavek s přidavkem standardu bylo přidáno 100 μ l standardního roztoku sotolonu o koncentraci 6 $\mu\text{g/ml}$, po proběhnutí derivatizace, jejíž konec se projevil ukončením vývoje oxidu uhličitého, byl přidán 1 g NaCl. Extrakce byla provedena s 1,5 ml ethylacetátu, po centrifugaci a odebrání organické fáze do vialky byla extrakce zopakována ještě s 0,5 ml ethylacetátu, následovala centrifugace a odebrání organického podílu do týchž vialek. Do všech vialek s připravenými extrakty bylo přidáno 50 μ l připravené směsi balastních látek (4 mg tyrosolu, 40 μ l diethyljantarátu, 40 μ l 2-fenylethanolu a 920 μ l ethylacetátu). Všechny vzorky byly analyzovány pětkrát na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí. Sotolon byl detekován jak ve vzorcích

s přidavkem sotolonu, tak ve vzorcích bez přidavku. Píky odpovídající derivátu sotolonu (128 m/z, 10,35 min) byly zintegrovány, velikosti ploch a vypočítané koncentrace ve vzorcích byly zapsány do **Tab. X**.

Tab. X: Hodnoty ploch píku sotolonu ve vzorcích bez standardního přidavku a se standardem (STD) sotolonu s přidáním 50 µl směsi balastních látek

Vzorek	Přídavek sotolonu (µg/ml)	Plocha píku sotolonu	Koncentrace sotolonu (µg/ml)
Sauvignon	0	3079	0,008
	0	3119	
	0	3049	
	0	3103	
	0	3037	
Sauvignon + STD	0,06	25068	
	0,06	25425	
	0,06	25490	
	0,06	25410	
	0,06	25454	
Kilchoman	0	1243	0,117
	0	1262	
	0	1243	
	0	1252	
	0	1253	
Kilchoman + STD	0,15	2822	
	0,15	2867	
	0,15	2869	
	0,15	2864	
	0,15	2849	
Tawny Porto Monteiro	0	7435	0,291
	0	7475	
	0	7441	
	0	7408	
	0	7401	
	0	7418	
Tawny Porto Monteiro + STD	0,06	8945	
	0,06	8901	
	0,06	8987	
	0,06	9064	
	0,06	8956	
	0,06	8916	

4.2.7 Vyhodnocení množství sotolonu v analyzovaných vzorcích

Pro stanovení množství sotolonu ve vzorcích alkoholických nápojů byla zvolena metoda standardního přídávku stejně jako v případě whisky laktonu. Plochy píků analytu v naměřených chromatogramech byly zintegrovány a hodnoty byly zpracovány v tabulkovém procesoru Microsoft Excel. Vzorek bez a s přídávkem 0,06 µg/ml (u vín) a 0,15 µg/ml (u destilátů) sotolonu byl vždy analyzován dvakrát, ze čtyř získaných bodů byla sestrojena kalibrační křivka a z její rovnice byla vypočítána koncentrace sotolonu. Vypočítané množství sotolonu v analyzovaných vzorcích je uvedeno v **Tab. XI**.

Tab. XI: Hodnoty ploch sotolonu a vypočítaná koncentrace ve vzorcích

Vzorek	Přídavek sotolonu (µg/ml)	Plocha píku sotolonu	Koncentrace sotolonu (µg/ml)
Rulandské šedé	0	1877	0,008
	0	1850	
	0,06	15690	
	0,06	16350	
Sauvignon	0	7269	0,010
	0	7239	
	0,06	52692	
	0,06	51778	
Claude Chatelier XO	0	114	0,016
	0	113	
	0,15	1221	
	0,15	1262	
Dornfelder	0	1092	0,017
	0	1063	
	0,06	5050	
	0,06	4938	
De Luze	0	727	0,019
	0	713	
	0,15	5935	
	0,15	6636	
Sherry Medium	0	882	0,020
	0	893	
	0,06	3393	
	0,06	3683	
Islay Mist	0	464	0,021
	0	397	

	0,15	3390	
	0,15	3532	
Medvědí krev	0	854	0,028
	0	869	
	0,06	2768	
	0,06	2676	
Sherry Cream	0	3908	0,093
	0	3913	
	0,06	6587	
	0,06	6297	
Tawny Porto Monteiro	0	3990	0,128
	0	3391	
	0,06	5250	
	0,06	5592	
Kilchoman	0	301	0,147
	0	320	
	0,15	674	
	0,15	687	

4.3 Vinný lakton

4.3.1 Odhad retenčního času vinného laktonu pomocí retenčních indexů

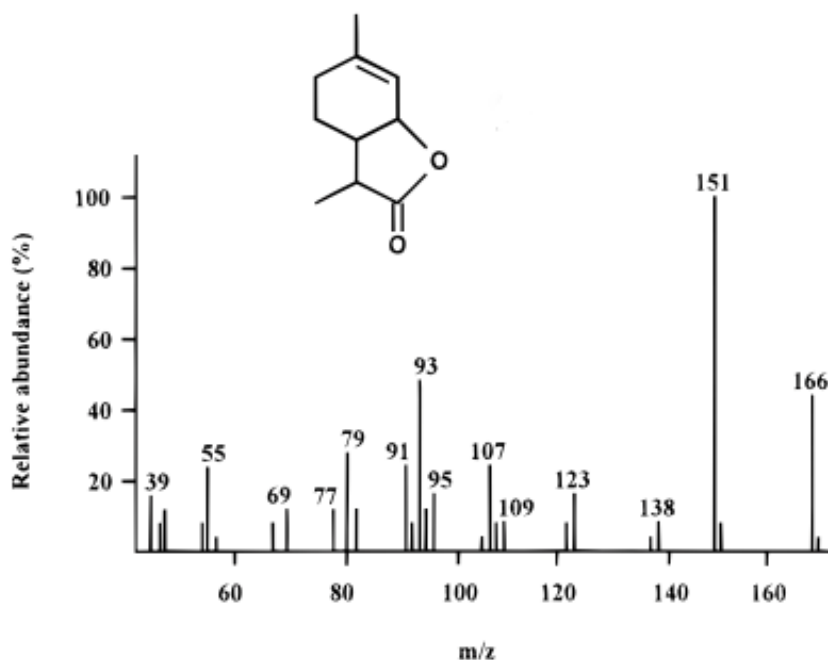
Jelikož se nepodařilo sehnat standard vinného laktonu, byly hledány další možnosti, jak zjistit přibližný retenční čas tohoto laktonu. Jednou z možností byla analýza n-alkanu pro určení retenčního času vinného laktonu. Vhodným uhlovodíkem by mohl být tetradekan, jehož Kovatsův retenční index na nepolární stacionární fázi má hodnotu blízkou retenčnímu indexu analytu. V experimentech prováděných pro tuto diplomovou práci byla použita nepolární kolona HP-5ms, která obsahuje stejnou stacionární fázi jako kolona BD-5. Proto byly při hledání retenčního času vinného laktonu brány v úvahu hodnoty Kovatsova retenčního indexu právě pro tuto stacionární fázi, tedy 1466 pro vinný lakton a 1400 pro tetradekan (**Tab. XII**). Analýzou roztoku tetradekanu v pentanu o koncentraci 1 mg/ml byl získán chromatogram, ve kterém byl pík tetradekanu detekován v čase 11,4 min. Z tohoto údaje bylo odhadnuto, že by se měl retenční čas vinného laktonu pohybovat okolo 11. až 12. minuty.

Tab. XII: Přehled Kovatsových retenčních indexů pro vinný lakton a tetradekan na kolonách různé polarity

Stacionární fáze	Kovatsův retenční index vinný lakton	Kovatsův retenční index tetradekan	Zdroj
DB-5	1466	1400	[32], [31]
FFAP	2206	-	[32]
OV101	1439	1400	[31]
C20M	2209	1400	[31]

4.3.2 Identifikace vinného laktonu dle poměru intenzit iontů 166, 151, 123, 93 m/z

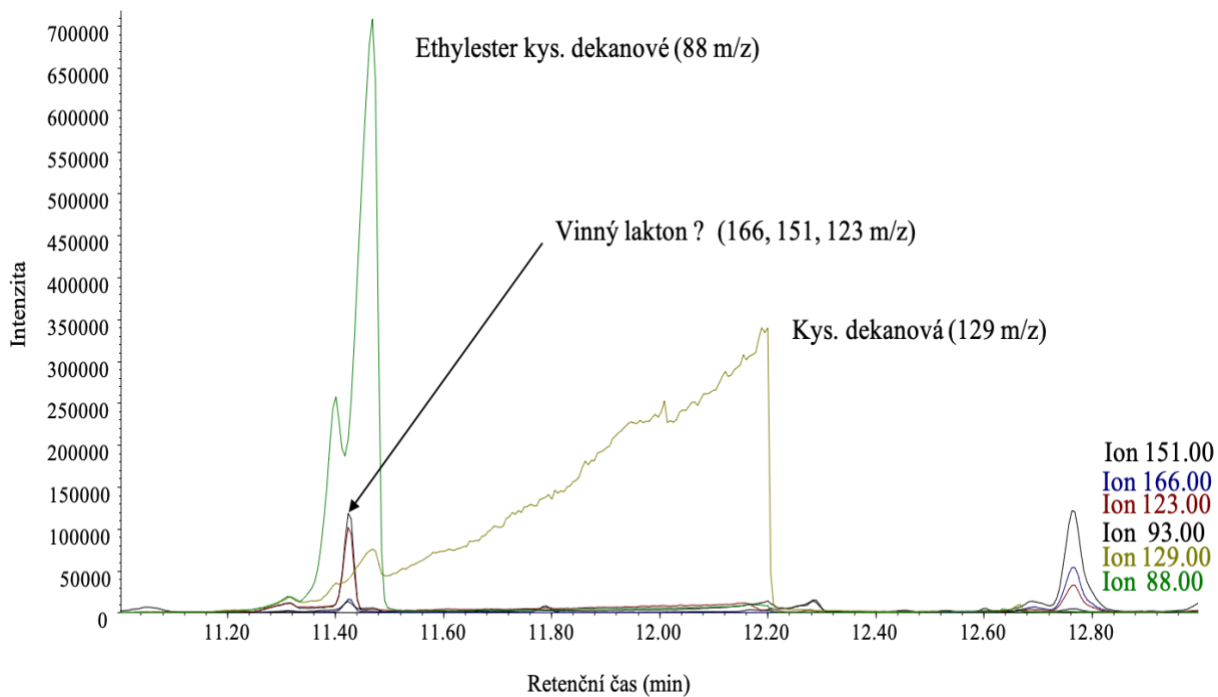
Při pokusu o identifikaci laktonu ve vzorcích vína byly využity informace o poměru intenzit iontů 166, 151, 123 a 93 m/z ze studie Gutha [33]. Hmotnostní spektrum získané z tohoto článku je ukázáno na **Obr. 17**. Při hledání vinného laktonu v chromatogramu extrahovaného vína byl nejdříve hledán pík s retenčním časem okolo 11. minuty a poté bylo sledováno hmotnostní spektrum tohoto píku a poměry intenzit iontů 166, 151, 123 a 93 m/z. V chromatogramu byl nalezen pík, který se eluoval v očekávaném čase a jeho spektrum obsahovalo sledované ionty. Vzhledem k vysokému chemickému šumu a přítomnosti dalších iontů ve spektru však vyhledávací algoritmus nebyl schopen spektrum rozpoznat a správně přiřadit spektrum z databáze, přestože knihovna NIST 14 spektrum vinného laktonu obsahuje.



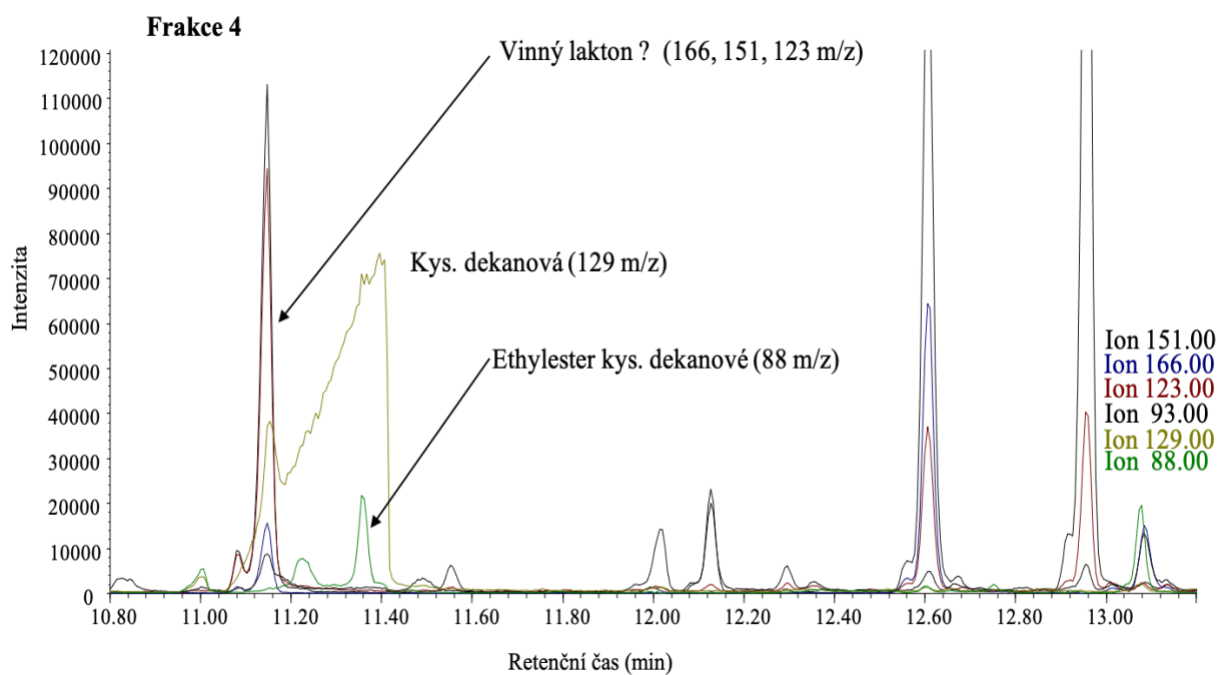
Obr. 17: Hmotnostní spektrum vinného laktonu [33]

4.3.3 Frakcionace na silikagelové koloně

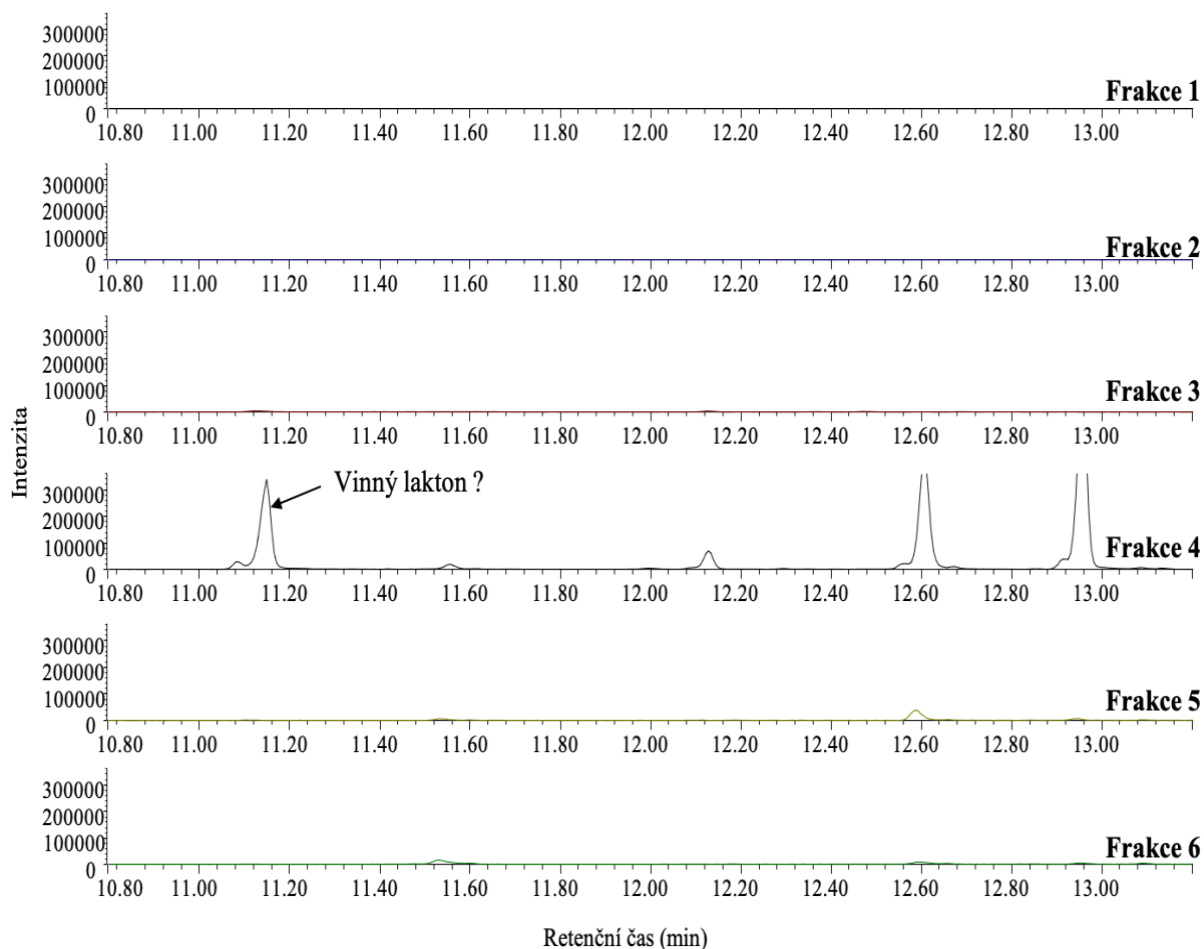
Analýzou zahuštěného dichlormethanového extraktu Ryzlinku vlašského na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí byl získán chromatogram s velmi širokými píky a vysokým pozadím. Eluce píku vinného laktonu byla podle výše uvedených údajů očekávána okolo 11. minuty, v tomto čase se ale v chromatogramu objevily i píky dalších látek, které byly přiřazeny kyselině dekanové (129 m/z) a ethylesteru kyseliny dekanové (88 m/z). Z **Obr. 18** je patrné, že pík ethylesteru kyseliny dekanové s retenčním časem 11,40 minut a částečně i kyselina dekanová překrývá pík eluovaný v čase 11,41 minut, který patří s velkou pravděpodobností vinnému laktonu. Jednou z možností, jak oddělit píky kyseliny dekanové, jejího esteru a pravděpodobného vinného laktonu byla frakcionace na silikagelové koloně. Při frakcionaci extraktu vína na silikagelové kolonce bylo získáno celkem 6 podílů (frakce 1: pentan; frakce 2: pentan : diethylether 9 : 1; frakce 3: pentan : diethylether 7 : 3; frakce 4: pentan : diethylether 1 : 1; frakce 5: diethylether; frakce 6: aceton), všechny podíly byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí a byly pro ně získány rekonstruované chromatogramy dominantního iontu vinného laktonu 151 m/z (**Obr. 20**). Při srovnání získaných rekonstruovaných chromatogramů pro ion 151 m/z je patrné, že by se hledaný lakton mohl nacházet právě ve 4. frakci. Podle výše uvedené úvahy by měl mít vinný lakton retenční čas na nepolární koloně zhruba 11 minut, což odpovídá píku ve 4. frakci, který se eluuje v čase 11,18 minut. Frakcionací bylo dosaženo rozdělení případného vinného laktonu, ethylesteru kyseliny dekanové a kyseliny dekanové mezi různé frakce, jak je patrné z **Obr. 19**. Ethylester kyseliny dekanové byl eluován převážně v prvním až třetím podílu, ve čtvrté frakci, kde se pravděpodobně nachází hledaný lakton, už bylo jen nepatrné množství tohoto esteru. Z chromatogramů na **Obr. 18** a **19** je patrné, že v důsledku frakcionace došlo k posunu retenčního času vinného laktonu, tento posun byl pravděpodobně způsoben nižší koncentrací esteru kyseliny dekanové ve čtvrté frakci, která již retenci vinného laktonu neovlivňovala. Podobně jako esteru kyseliny dekanové, i samotné kyseliny (129 m/z) bylo ve čtvrté frakci velmi málo, největší množství se jí nacházelo ve třetí frakci.



Obr. 18: Rekonstruované chromatogramy dichlormethanového extraktu vína bez frakcionace pro ionty 166, 151, 123, 93 a 88 m/z



Obr. 19: Rekonstruované chromatogramy dichlormethanového extraktu vína 4. frakce pentan : diethyletyher, 1 : 1 (celkem 6 frakcí) pro ionty 151, 166, 123, 93, 129 a 88 m/z

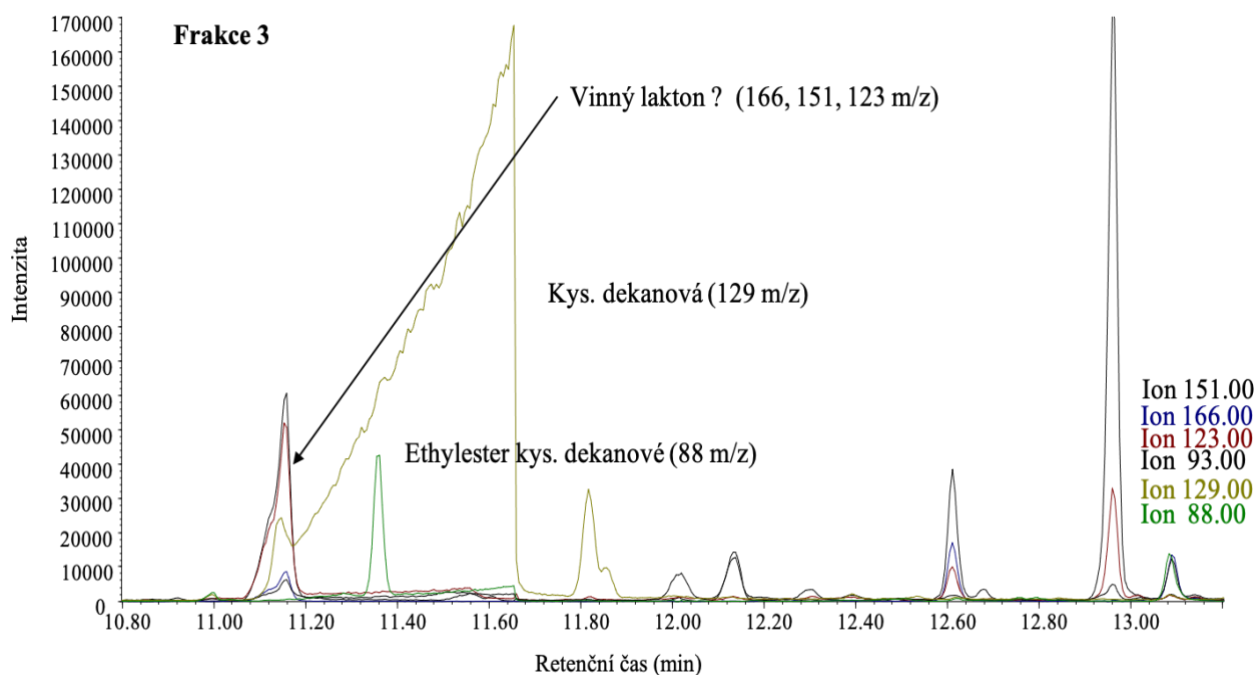


Obr. 20: Rekonstruované chromatogramy šesti frakčních podílů dichlormethanového extraktu vína pro ion 151 m/z (frakce 1: pentan, frakce 2: pentan : diethylether 9 : 1, frakce 3: pentan : diethylether 7 : 3, frakce 4: pentan : diethylether 1 : 1, frakce 5: diethylether, frakce 6: aceton)

4.3.4 Volba poměru rozpouštědel pro frakcionaci

V prvním experimentu bylo sbíráno celkem pět frakcí. Na silikagelovou kolonku byl nanesen 1 ml dichlormethanového extraktu Ryzlinku vlašského. Kolonka byla postupně promývána 2 ml pentanu a poté vždy 3 ml rozpouštědel v poměrech pentan : diethylether 9 : 1; pentan : diethylether 1 : 1; diethylether a aceton. Při použití těchto poměrů rozpouštědel pro eluci složek z extraktu se možný pík vinného laktonu objevil ve třetí frakci, ale byl částečně překryt kyselinou dekanovou (**Obr. 21**). Proto byl vyzkoušen experiment s přidáním dalšího podílu rozpouštědel pentan : diethylether. Na silikagelovou kolonku byl opět nanesen 1 ml dichlormethanového extraktu vína a celkem šest frakcí bylo sbíráno do vialek. Složky extraktu vína ze silikagelové kolonky byly postupně promývány rozpouštědly

v poměrech pentan, pentan : diethylether 9 : 1; pentan : diethylether 7 : 3; pentan : diethylether 1 : 1; diethylether, aceton. Porovnáním chromatogramů na **Obr. 19** a **21** je patrné, že v případě provedení frakcionace se sběrem 6 frakcí se vinný lakton nejspíše objevil ve čtvrté frakci, kde je malé množství kyseliny dekanové, zatímco sbíráním 5 frakcí se pravděpodobně vinný lakton nacházel ve třetí frakci, kde je významné množství kyseliny dekanové, která s hledaným laktonem částečně koeluje. Přidání směsi rozpouštědel pentan : diethylether 7 : 3 napomohlo lepší separaci kyseliny dekanové od vinného laktonu.



Obr. 21: Rekonstruované chromatogramy dichlormethanového extraktu vína 3. frakce pentan : diethylether, 1 : 1 (celkem 5 frakcí) pro ionty 151, 166, 123, 93, 129 a 88 m/z

5. ZÁVĚR

Cílem této studie bylo navrhnout vhodné analytické postupy pro stanovení whisky laktonu, sotolonu a vinného laktonu ve vzorcích alkoholických nápojů, konkrétně v klasických, barikových a fortifikovaných vínech, rumu, koňacích a whisky. Všechny vybrané látky byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Kvantifikace byla v případě sotolonu a whisky laktonu provedena metodou standardního přídatku. Podle chemické povahy a struktury analytů byly vyžadovány odlišné způsoby zpracování reálných vzorků.

Pro izolaci whisky laktonu ze vzorků nápojů byla použita jednoduchá extrakce. Ze čtrnácti různých rozpouštědel byl jako nejlepší extrakční činidlo zvolen tetrahydrofuran. Největší množství whisky laktonu bylo nalezeno ve vzorcích Islay Mist, Bisquit a Kilchoman, kde byla koncentrace trans izomeru 0,120–0,283 $\mu\text{g/ml}$ a cis izomeru 0,320 $\mu\text{g/ml}$ v případě koňaku a až 0,943 $\mu\text{g/ml}$ ve whisky. Naopak vzorky Sauvignonu, Rulandského šedého, Ruby Porta a Tawny Porto Monteiro neobsahovaly whisky lakton vůbec. Přítomnost tohoto laktonu byla očekávána ve vzorcích barikových vín, jelikož tato vína zrají v dubových sudech. Barikové víno Chardonnay obsahovalo jen 0,011 $\mu\text{g/ml}$ trans whisky laktonu a 0,012 cis izomeru, zatímco v Merlotu byl obsah tohoto laktonu v případě obou izomerů téměř desetkrát vyšší. Ve všech vzorcích, kromě Medvědí krve, kde byl detekován pouze obsah trans whisky laktonu, byl vždy větší podíl cis izomeru.

Pro stanovení sotolonu ve vzorcích alkoholických nápojů byla z důvodu přítomnosti hydroxylové skupiny ve struktuře laktonu vyžadována derivatizace, konkrétně acetylace. Pro praktické využití při analýze sotolonu je velmi výhodné volit teplotní program podle povahy analyzovaného vzorku. Teplota má vliv na velikost odezvy sotolonu ve vzorcích s větším obsahem balastních látek jako je portské víno. Při zvýšení teploty nástřiku a počáteční teploty kolony došlo ke zlepšení odezvy sotolonu a opakovatelnosti nástřiků. U klasických vín a destilátů neměla změna teploty vliv na odezvu laktonu. Pro získání lepší odezvy sotolonu je možné ke vzorku přidat směs balastních látek, které pomohou fokusovat analyt. Bylo zjištěno, že efekt zafokusování analytu pomocí směsi tyrosolu, diethylesteru kyseliny jantarové a 2-fenylethanolu je významný pouze při zvýšení teploty nástřiku a počáteční teploty kolony. Největší koncentrace sotolonu 0,128 a 0,147 $\mu\text{g/ml}$ byla naměřena ve vzorcích Tawny Porto Monteiro a Kilchoman. Významné množství laktonu 0,093 $\mu\text{g/ml}$ bylo obsaženo také v Sherry Cream. Velmi nízká koncentrace sotolonu

0,008-0,028 $\mu\text{g/ml}$ byla obsažena ve vzorcích De Luze, Claude Chatelier, Islay Mist, Dornfelder, Medvědí krev, Sherry Medium, Sauvignonu a Rulandského šedého.

Při zpracování vzorku pro pokus o identifikaci vinného laktonu ve vzorku vína bylo nutné získaný extrakt frakcionovat, jelikož v důsledku velmi podobných retenčních časů (okolo 11,4 minuty) pravděpodobného vinného laktonu, kyseliny dekanové a jejího esteru, docházelo ke koeluci píků. Následnou analýzou všech šesti frakcí plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií v módu SIM 151 m/z bylo zjištěno, že by se hledaný lakton mohl nacházet ve čtvrté frakci. Hlavní přínos frakcionace spočíval v oddělení píků kyseliny dekanové a jejího esteru od pravděpodobného píku vinného laktonu. Další možnosti pro potvrzení identity vinného laktonu v chromatogramu by mohlo být srovnání se standardem nebo vhodným izomerem, například menthalaktonem. Tyto úvahy mohou být předmětem dalšího bádání.

6. LITERATURA

- [1] F. Boratyński, M. Smuga, C. Wawrzeczyk, Lactones 42. Stereoselective enzymatic/microbial synthesis of optically active isomers of whisky lactone, *Food Chem.* 141 (2013) 419–427.
- [2] I. A. Southwell, Essential oil metabolism in the koala III novel urinary monoterpene lactones, *Tetrahedron Lett.* 24 (1975) 1885–1888.
- [3] J. Giaccio, Precursors to the Potent Odorant Wine Lactone, a thesis, The University of Adelaide, South Australia 2013.
- [4] E. Brenna, C. Fuganti, F. G. Gatti, S. Serra, Biocatalytic Methods for the Synthesis of Enantioenriched Odor Active Compounds, *Chem. Rev.* 111 (2011) 4036–4072.
- [5] H. Guth, Comparison of Different White Wine Varieties in Odor Profiles by Instrumental Analysis and Sensory Studies, v knize: A. L. Waterhouse, S. E. Ebeler (ed.), *Chemistry of Wine Flavor*, American Chemical Society, Washington, DC (1998) 39–52.
- [6] D. Francová, L. Červený, Syntéza vonných laktonů s využitím katalyzátorů hydrotalcitového typu, *Chem. Listy* 100 (2006) 954–958.
- [7] I. Blank, J. Lin, S. Devaud, R. Fumeaux, L. B. Fay, The Principal Flavor Components of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), v knize: S. J. Risch, Chi-Tang Ho (ed), *Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*, American Chemical Society, (1997) 12–28.
- [8] A. Taga, A. Sato, K. Suzuki, M. Takeda, S. Kodama, Simple Determination of a Strongly Aromatic Compound, Sotolon, by Capillary Electrophoresis, *J. Oleo Sci.* 61 (2012) 45–48.
- [9] V. Pereira, J. M. Leça, J. M. Gaspar, A. C. Pereira, J. C. Marques, Rapid Determination of Sotolon in Fortified Wines Using a Miniaturized Liquid-Liquid Extraction Followed by LC-MS/MS Analysis, *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2018 (2018) 1–7.
- [10] M. Gabrielli, D. Fracassetti, A. Tirelli, UHPLC Quantification of Sotolon in White Wine, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 4878–4883.

- [11] P. Nováková, Derivatizace v plynové chromatografii, diplomová práce, Palackého Univerzita, Olomouc 2011.
- [12] T. Jagella, W. Grosch, Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum L.*), Eur. Food Res. Technol. 209 (1999) 16–21.
- [13] J. Velíšek, J. Hajšlová, Chemie potravin II, OSSIS, Tábor 2009.
- [14] M. Jackson, WHISKY Kompletní průvodce světem whisky, OTTOVO NAKLADATELSTVÍ, Praha 2003.
- [15] D. Lerner, Skotská whisky, Slovart, Praha 1999.
- [16] J. Murray, Průvodce světem whisky, JOTA, Brno 2000.
- [17] <https://www.brandy.cz/clanky/historie-konaku.html>, staženo 27. 10. 2020.
- [18] C. R. Gregory, Koňak: Průvodce koňakem, Fortuna Print, Praha 2000.
- [19] G. Spence, Bílé víno – průvodce pro znalce, Slovart, Praha 2002.
- [20] M. Edwards, Červené víno – průvodce pro znalce, Slovart, Praha 2001.
- [21] J. Simonová, O víně, Slovart, Praha 2002.
- [22] C. Günther, A. Mosandl, Stereoisomeric flavour compounds. XII. 3-methyl-4-octanolide-quercuslactone, whiskey lactone – structure and properties of the stereoisomers, Liebigs Ann. Chem. (1986) 2112–2122.
- [23] K. Otsuka, Y. Zenibayashi, M. Itoh, A. Totsuka, Presence and Significance of Two Diastereomers of β -methyl- γ -octalactone in Aged Distilled Liquors, Agr. Biol. Chem. 38 (1974) 485–490.
- [24] L. Nováková, M. Douša a kol., Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Europrint, Praha 2013.
- [25] J. Churáček a kol., Analytická separace látek, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1990.

- [26] E. Forgács, T. Cserhádi, Gas chromatography, v knize: M. Lees (ed.), Food authenticity and traceability, Woodhead Publishing Limited, Cambridge (2003) 197–217.
- [27] J. S. Câmara, J. C. Marques, M. A. Alves, A. C. S. Ferreira, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone Levels in Fortified Madeira Wines: Relationship to Sugar Content, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6765–6769.
- [28] J. R. Piggott, J. M. Conner, J. L. Melvin, The contribution of oak lactone to the aroma of wood-aged wine, *Dev. Food Sci.* 37 (1995) 1695–1702.
- [29] J. Stávek, *Vinařský obzor* 99 (2006) 279–280.
- [30] A. Buettner, Investigation of Potent Odorants and Afterodor Development in Two Chardonnay Wines Using the Buccal odor Screening System (BOSS), *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2339–2346.
- [31] https://www.flavornet.org/f_kovats.html, staženo dne 28. února 2021.
- [32] H. Guth, Determination of the Configuration of Wine Lactone, *Helv. Chim. Acta* 79 (1996) 1559-1571.
- [33] H. Guth, Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3022–3026.
- [34] I. Labuda, Flavor Compounds, *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Moselio Schaechter (2009) 305–320.
- [35] S. J. Pérez-Olivero, M. I. Pérez-Pont, J. E. Conde, J. P. Pérez-Trujillo, Determination of Lactones in Wine by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry, *J. Anal. Methods Chem.* (2014) 1–10.
- [36] <https://waterhouse.ucdavis.edu/whats-in-wine/oak-lactones>, staženo dne 8. 3. 2021.
- [37] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4932494.html>, staženo dne 9.3. 2021.
- [38] A. Żwir-Ferenc, M. Biziuk, Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications, *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 15, No. 5 (2006) 677–690.

[39] M. Večeřa, Chemické tabulky organických sloučenin, SNTL, Praha 1975.

[40] S. Bailly, V. Jerkovic, A. Meurée, A. Timmermans, S. Collin, Fate of Key Odorants in Sauternes Wines through Aging, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 8557–8563.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AA	anhydrid kyseliny octové
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
EtAc	ethylacetát
GC	plynová chromatografie
HFBA	anhydrid kyseliny heptafluormásečné
HMDS	hexamethyldisilazan
HRGC	plynová chromatografie s vysokým rozlišením
MBTFA	N-methyl-bis(trifluoracetamid)
MeAc	methylacetát
MS	hmotnostní spektrometrie
RI	retenční index
RSD	relativní směrodatná odchylka
SIM	selektivní záznam iontu
STD	standard
SPE	extrakce tuhou fází
TBDMSCl	t-butyldimethylsilylchlorid
TFAA	anhydrid kyseliny trifluoroctové
TIC	celkový iontový proud
TMCS	trimethylchlorsilan