



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OPTIMALIZACE SPME PŘI STANOVENÍ
AROMATICKÝCH LÁTEK VE TŘTINOVÝCH
RUMECH**

THE OPTIMIZATION OF SPME FOR THE DETERMINATION OF AROMA COMPOUNDS IN
SUGAR CANE RUMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Libuše Sychrová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1725/2021

Akademický rok: 2021/22

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií

Studentka: **Bc. Libuše Sychrová**

Studijní program: Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Renata Mikulíková,
Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace SPME při stanovení aromatických látek ve třtinových rumech

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše na téma:

a) charakterizace třtinových rumů a jejich výroba,

b) možnosti extrakce a stanovení aromatických látek.

2. Optimalizace stanovení aromatických látek ve třtinových rumech metodou GC/SPME.

3. Analýza vybraných vzorků třtinových rumů z obchodní sítě.

4. Zpracování výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.

Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Libuše Sychrová
studentka

doc. RNDr. Renata Mikulíková,
PhD.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací SPME při stanovení aromatických látek ve třtinových rumech. Pro měření byl využit plynový chromatograf s hmotnostním detektorem. Optimalizace byla provedena na různých SPME vláknech. Metoda byla použita pro identifikaci a následnou kvantifikaci aromatických látek ve vybraných vzorcích třtinových rumů zakoupených v obchodní síti.

Abstract

This master's thesis deals the optimization of SPME for the determination of aroma compounds in sugar cane rums. The gas chromatograph with mass detector was used for the measurement. The optimization was performed on different type of SPME fibers. This method was used for the identification and the quantification of compounds in selected samples of sugar cane rums purchased from the commercial network.

Klíčová slova

Třtinové rumy, estery karboxylových kyselin, optimalizace metody, HS-SPME, GC/MS

Key words

Sugar cane rums, carboxylic acid esters, method optimization, HS-SPME, GC/MS

SYCHROVÁ, Libuše. *Optimalizace SPME při stanovení aromatických látek ve třtinových rumech* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138469>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Renata Mikulíková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce doc. RNDr. Renatě Mikulíkové, Ph.D. za ochotu, odborné vedení, konzultace při zpracování výsledků a řešení všech problémů spojených s prací. Dále bych chtěla poděkovat naší vedoucí oddělení Analytical Research Group v Synthonu Blansko za umožnění realizace experimentální části v práci a především svému kolegovi Ing. Jiřímu Pryčkovi, Ph.D. za veškerou spolupráci spojenou s GC/MS.

Obsah

1 Úvod	7
2 Rum	8
2.1 Výroba destilátu	8
2.1.1 Fermentace	8
2.1.2 Destilace	9
2.1.3 Zrání	12
2.2 Charakterizace chuti rumů	12
3 Chromatografie.....	14
4 Plynová chromatografie	14
4.1 Historie	15
4.2 Instrumentace	15
4.2.1 Mobilní fáze	16
4.2.2 Injektor	16
4.2.3 Kolona	17
4.2.4 Detektory	18
4.3 Plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (GC-MS).....	18
5 Mikroextrakce tuhou fází SPME	19
6 Experimentální část	22
6.1 Materiál	22
6.2 Chemikálie	22
6.3 Laboratorní vybavení	22
6.4 Výběr analytů	22
6.5 Příprava standardů.....	23
6.6 Příprava vzorků	23
6.7 Optimalizace extrakčních podmínek	23
6.7.1 Volba SPME vlákna	24
6.7.2 Volba extrakční doby	24
6.7.3 Volba teploty extrakce	24
6.8 Optimalizace separačních podmínek.....	25
6.8.1 Volba GC kolony	25
6.8.2 Podmínky GC/MS pro kolonu VF-5MS	27
6.9 Validace metody.....	27
6.9.1 Aritmetický průměr	28
6.9.2 Směrodatná odchylka	28
6.9.3 Relativní směrodatná odchylka	28
6.9.4 Limit detekce a kvantifikace	28
6.9.5 Opakovatelnost.....	28
6.9.6 Linearita	28
6.10 Analýza hlavních komponent PCA	29
7 Výsledky a diskuse	30
7.1 Optimalizace experimentálních podmínek.....	30
7.1.1 Volba typu SPME vlákna	31

7.1.2 Volba extrakční doby	32
7.1.3 Volba teploty extrakce	33
7.1.4 Volba GC kolony	35
7.3 Validace metody.....	35
7.4 Analýza vzorků	39
7.5 Kvantifikace vybraných analytů.....	46
7.5.1 Zpracování kvantifikovaných dat	48
8 Závěr.....	51
9 Zdroje	52
10 Seznam zkratk	55
11 Přílohy	56

1 Úvod

Rum byl oblíbeným nápojem nejen pirátů, ale i mnohých konzumentů alkoholických nápojů. Začal se vyrábět v průběhu 16. století především v karibských státech. Nejlepší rumy světa pocházejí právě z Kuby, Jamajky nebo Portorika. V posledních letech se tento alkohol na český trh dodává z různých koutů světa. Tato diplomová práce se zabývá rozdíly mezi zahraničními rumy, které jsou vyrobeny z cukrové třtiny a „naším“ tuzemským rumem, který je vyroben z potravinářského lihu a dochucen rumovou esencí. Tyto rumy si u spousty lidí našly zalíbení nejen pro svoji osobitou chuť a vůni, ale i pro cenovou dostupnost a široké využití v kuchyni. Čím dál větší skupina lidí začíná rumy také sbírat a považuje je za své klenoty. Nejvíce se na ceně a hodnotě rumu podepisuje proces destilace, a hlavně doba zrání v sudech, ze kterých si rumy čerpají výslednou chuť, barvu a aroma. Zrání některých rumů může trvat až 30 let.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu a optimalizovat SPME (mikroextrakce tuhou fází) při stanovení aromatických látek ve třtinových rumech. Měření se provádělo na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí. Dalším cílem bylo identifikovat a kvantifikovat vybrané vzorky třtinových rumů z obchodní sítě. Na základě porovnání vzorků se zjišťovala jejich podobnost. Celkem bylo touto metodou analyzováno 30 vzorků tmavých a 3 vzorky bílých třtinových rumů. Všechny vzorky byly vybrány napříč různými výrobci tak, aby bylo dosaženo širokého výběru zemí původu a také různě dlouhých dob zrání v dřevěných sudech.

V této práci byla vyvinuta metoda, která by mohla sloužit pro měření různých druhů třtinových rumů. Byly stanoveny látky, které se vyskytují ve všech vybraných vzorcích, jako jsou estery vyšších karboxylových kyselin a alkoholy. Identifikace aromatických látek byla provedena porovnáním s knihovnou spekter NIST. Vybrané identifikované analyty byly poté kvantifikovány pomocí standardů.

2 Rum

Rum je destilovaný alkoholický nápoj s obsahem alkoholu 38–54 % [1]. Vyrábí se z fermentovaných produktů cukrové třtiny, především z melasy nebo přímo ze šťávy z cukrové třtiny, takovýto produkt se nazývá cachaça. Šťáva zraje v dubových nebo jiných dřevěných sudech. Původně rum pochází ze zemí, kde se pěstuje cukrová třtina, ze subtropického podnebí můžeme zařadit Brazílii a bývalé francouzské kolonie zemí, obklopující Karibské moře. Většina rumů se vyrábí v Austrálii, Fidži, Indii, Indonésii a na Srí Lance. V České republice se vyrábí destilát z potravinářského lihu, známý jako tuzemák nebo tuzemský rum. [2, 3, 4, 5]

2.1 Výroba destilátu

Destilované nápoje lze připravit s různým obsahem ethanolu. Nápoje jsou klasifikovány buď podle výchozí suroviny, nebo typu destilátu. Nejčastěji používanou surovinou na výrobu rumů je cukrová třtina, třtinová šťáva nebo melasa.

Třtinová šťáva je nejvhodnější pro produkci lehkých rumů a připravuje se lisováním z jemně mleté cukrové třtiny. Šťávu lze fermentovat bez dalšího zpracování nebo ji lze zahřát pro zvýšení kvality rumu. Alternativně může být z třtinové šťávy vyroben sirup.

Melasa se používá pro produkci těžkých rumů. Jedná se o matečný louh zbývající po oddělení cukru od třtiny opakovanou krystalizací. Cena tohoto produktu je relativně nízká a udržuje si dobrou kvalitu. V závislosti na odrůdě třtiny a klimatu obsahuje melasa 50–60 % cukru [5]. Kvalita melasy je ovlivněna řadou faktorů, jako jsou sulfátový popel, sloučeniny dusíku, gumy a nezkvasitelné cukry. Obsahuje velkou řadu sloučenin, které přispívají k aroma rumu. Mezi inhibiční látky patří mastné kyseliny a v přehřáté melase se může objevovat hydroxymethylfurfural.

Aby bylo dosaženo lepší fermentace, vyžaduje melasa, podle použitého druhu, předběžnou úpravu před samotným kvašením.

Teplota šťávy se upraví na 30 °C, protože dodávaná melasa pocházející přímo z cukrovaru je horká a musí se zchladit. V lihovarech se doporučuje, aby skladovaná teplota nikdy nepřekročila 45 °C a zabránilo se tak nežádoucím Maillardovým reakcím a občasnému samovznícení. [1]

Pomocí kyseliny sírové se snižuje pH na hodnotu 5,5–4,5 [1, 3, 5] a používají se živiny na podporu fermentace. V některých případech lze aplikovat i dezinfekční prostředky a antibiotika, aby se eliminovaly nežádoucí mikroorganismy. Zředěná a okyselená melasa se přenesení do usazovací nádrže a supernatant, přečištěná melasa, se dekantuje z kalu. Následně se zředí vodou, aby se dal při výsledné viskozitě určit obsah cukru na 10–12 g/100 ml [5], tzv. standardizace. Po přečerpání do fermentoru, je obohacena živinami, používá se síran amonný nebo močovina, a nakonec se přidají kvasnice.

2.1.1 Fermentace

Ve staré tradiční technice výroby rumu je fermentace proces, který vzniká přirozeně působením kvasinek a bakterií přítomných ve vzduchu. Jedná se o spontánní kvašení, čímž vznikají rumy s charakteristickou a individuální chutí. Dnes se kromě této tradiční techniky

používají čisté nebo smíšené kultury kvasinek. Kvasinky pro kvašení rumu musí být schopny produkovat vysoký obsah ethanolu a příslušné aroma.

Pro lehké rumy jsou používány *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces bayanus*, pro těžké rumy *Schizosaccharomyces pombe*. Melasa je nejlepším zdrojem kvasnic, které obsahují širokou škálu rodů včetně *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* a *Torulopsis*.

Pro kvašení jsou také důležité bakterie, a to hlavně bakterie kyseliny máselné jako jsou *Clostridium butyricum*, *Cl. psateurianum* a *Cl. saccharobutylicum*, které jsou významné při vzniku těkavých kyselin a které jsou charakteristickým aroma v těžkých rumech. Mezi kvasinkami a bakteriemi mohou existovat synergické vztahy. *Clostridie* produkující kyselinu máselnou jsou nejučinnější, pokud se přidávají jako čisté kultury. Do fermentace se přidávají až když je obsah ethanolu okolo 4 % a koncentrace cukru je pod 6g/100ml [5].

Dominantními bakteriemi mléčného kvašení jsou druhy *Leuconostoc*, které mohou způsobovat problémy v důsledku tvorby slizu. Mohou také ovlivnit hodnotu pH pod optimálních 5,5 – 5,8 [5]. Také se využívají bakterie bohaté na kyselinu octovou *Acetobacter*. Tyto bakterie jsou typické spíše pro lehké rumy a jsou obvykle příčinou znehodnocení alkoholických nápojů, kdy ovlivňují při výrobě konečnou chuť a výtěžek ethanolu.

Fermentační proces se obvykle provádí v cylindrokónických fermentorech s kopulovitým víkem nebo ve válcových nádobách s otevřeným vrškem se šikmými podstavami. Doba a teplota kvašení se značně liší. Pro lehké rumy probíhá fermentace pomocí *Sacch. cerevisiae* obvykle při 28–33 °C po dobu 28–36 hodin. Těžké rumy jsou zkvašovány *Schizosacch. pombe* a mají teplotu 30–33 °C, i když se teplota může vyšplhat až k 37 °C, kde hrají důležitou roli bakterie, a proto by teplota při kvašení neměla překročit 30 °C. Fermentace se *Scizosacchem. pombe* bývají relativně pomalé a často mohou trvat 72 hodin a déle. Romy, u kterých trvá fermentace až 12 dní, jsou bohaté na estery, vyšší alkoholy a mohou mít vysoký obsah dunderu¹ a glukózy. [5] Nádoby jsou převážně vyrobené z nerezové oceli, ale také se používají fermentory z dřeva, měkké oceli a dalších materiálů.

2.1.2 Destilace

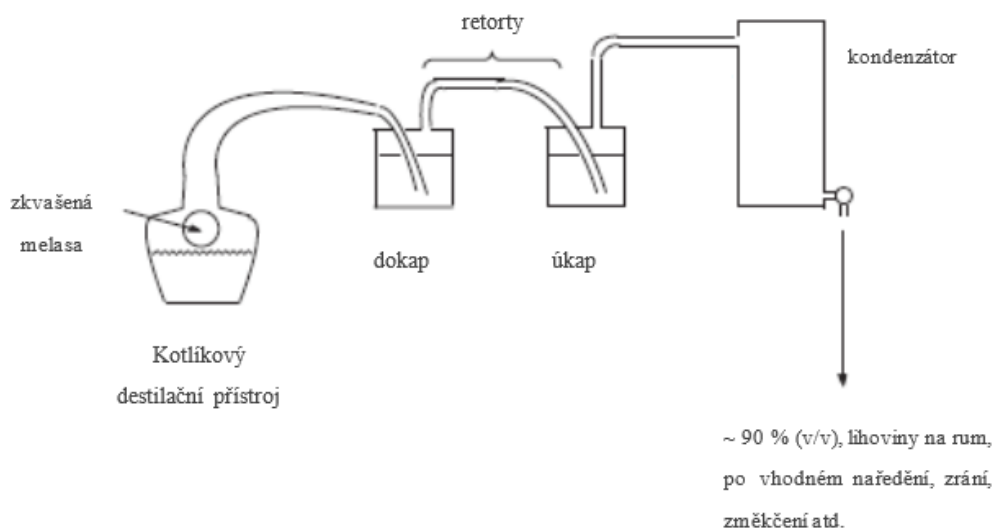
Destilační proces má velký význam při rozhodování o stylu nebo charakteru rumu, stejně jako u ostatních lihovin. Pro získání destilátu jemných sensorických vlastností z fermentované melasy se dříve používal tradiční postup dvojité destilace. Je to efektivní způsob odstranění nežádoucích složek a oživení obsahu alkoholu okolo 65 % (v/v). Stále se však vyvíjí nové systémy destilace, jako je kotel s dvojitým retortem², kde při jediné destilaci můžeme získat až 85 % (v/v) alkoholu. V komerčním měřítku se dnes více používá destilace ve třech po sobě jdoucích frakcích. [1]

Původní metoda dvojité destilace pochází z Jamajky, kde se využívají dva retorty, které jsou vzájemně propojené mezi krkem a kondenzátorem. Tento systém odstraní jeden ze dvou destilačních kroků potřebných pro dvojitou destilaci a ve skutečnosti odpovídá ekvivalentní trojnásobné destilaci. Zkvašená melasa, která obsahuje 8 % (v/v) alkoholu, se destiluje

¹ Dunder – kaly, zbytky kvasinek z předchozího kvašení, typické pro jamajské rumy, jsou nositeli chuti. [3]

² Retort – malý doplňkový kotlík, kde probíhá další destilace

z velkého kotle. Pára opouštějící destilační přístroj obsahuje přibližně 30 % alkoholu (v/v), prochází dokapem (ocas) z předchozí destilace v první nádobě, kde kondenzuje vodní pára. Tato kondenzace uvolňuje teplo do dokapu, což způsobuje odpařování a obohacené alkoholové páry opouštějí dno nádoby, které mají přibližně 60 % (v/v) alkoholu. Tyto páry následně procházejí přes úkap (hlava) v druhém retortu, kde se opakuje stejný postup, jako v prvním retortu, ale tentokrát opouštějící páry mohou obsahovat až 90 % (v/v) alkoholu. Všechny páry pak jdou do kondenzátoru. Směs z obou retortů se ředí vodou na požadovanou úroveň. Schéma lze vidět na **obr. 1**. [1, 3]

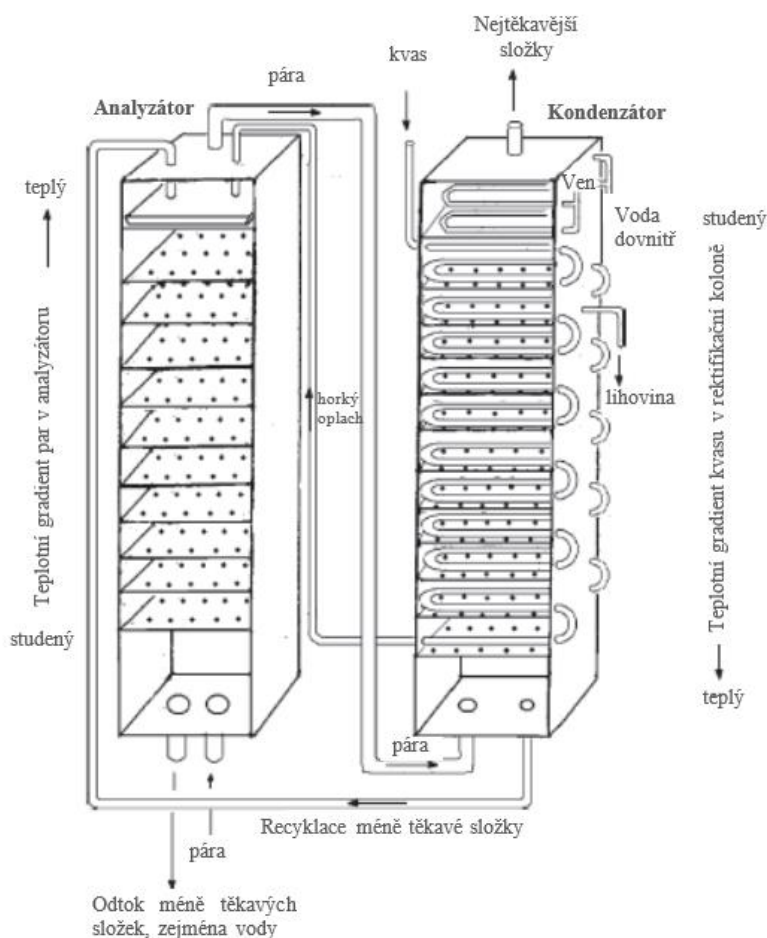


Obr. 1: Schématické znázornění dvouretortového kotlového destilačního systému. [3] *Není znázorněno v měřítku.*

K výrobě aromatictějších těžších rumů se používají klasické destilační kotle (*pot still*), s dvojitými retortami nebo bez nich. Takovéto rumy převážně pocházejí z Jamajky, Antilských ostrovů, Bermud, Haiti a dalších karibských ostrovů. Všechny tyto rumy obsahují více esterů a vyšší alkoholy. Obvykle se vyrábějí z melasy. Destilace v kotlích převážně probíhá dvakrát. Po každé várce je potřeba kotle vyčistit a poté opět naplnit. Celý proces se pravidelně opakuje, což způsobuje, že je metoda poměrně finančně a časově náročná. Ale i přesto existují i vzácné rumy, které se vyrábí v kotlích a destilují se až třikrát. Melasa se zahřívá v kotli, postupně vzniká v kapalině tlak, pomocí kterého se odpařuje voda s dalšími těkavými aromatickými sloučeninami. Páry stoupají postupně kotlem nahoru do tzv. krku až do kondenzátoru, kde se postupně ochlazují a přecházejí do kapalného skupenství a pokračují dále. Z první destilace směs obsahuje převážně 25–30 % (v/v) alkoholu, následně přechází do druhého kotle a lze ji dostat na úroveň až 65–75 % objemu alkoholu. Jedovaté složky by měly být správně odstraněny při druhé destilaci, jedná se především o methanol, který má bod varu okolo 64 °C. Kotle jsou vyráběny z mědi, pro její dobré katalytické vlastnosti a tepelnou vodivost. Dokáže odstranit sirné sloučeniny, které nejsou žádoucí ve výsledném destilátu. Měď je schopna tyto nežádoucí látky vázat na svůj povrch. [1, 3]

Lehčí rumy jsou vyráběny pomocí kontinuální, kolonové nebo rektifikační destilace, anglicky nazývané jako *Coffey still*. Jedná se o název přístroje, který si nechal patentovat irský výběrčí daní Aeneas Coffey. Hlavní výhody tohoto druhu destilovaného lihu jsou zvýšená

Kontinuální kolonové destilační přístroje jsou navrženy speciálně pro kontinuální destilaci čisté lihoviny z nepřetržitě dávkovaného kvasu. Při této destilaci je kvas nepřetržitě přiváděn do horní části druhé kolony (kondenzátor), která je alternativou přepalovacího kotle. Přes jednotlivé perforované pláty směrem dolů stéká kvas. Ze dna kolony stoupá vodní pára, která kvas postupně zahřívá a dochází k odpařování ethanolu a dalších těkavých látek. Páry alkoholu stoupají do horní části kolony a poté přecházejí do spodní části první kolony (analyzátoru). Zbytek využitého kvasu na dně druhé kolony je odváděn na likvidaci nebo znovu využit. V druhé kolně dochází k proudění par nahoru přes jednotlivá patra kolon. Přes zkondenzovanou kapalinu ve vyšších patrech se probublávají bohatší páry, které kapalinu znovu ohřívají a uvolňují se z ní více těkavé látky a ty potom postupují také směrem vzhůru. K neúplné kondenzaci těžších par a stékání kapaliny dochází po předání tepla. Jímání par se děje v konkrétních úrovních a rozlišují se na úkap, jádro a dokap. Do kondenzátoru a poté i do zásobníku směřuje jádro. Schéma kontinuální kolonové destilace lze vidět na **obr. 2**. Kontinuální destilace je spojena s vyšší koncentrací alkoholu ve finálním destilátu, a to je hlavní výhoda oproti destilaci v kotli. [5]



Obr. 2: Schematický diagram kontinuálního, kolonového destilačního přístroje [3]

2.1.3 Zrání

Zrání rumů probíhá v dubových sudech, které mohou být zuhelnatělé. Dřevo podporuje získat dobrou barvu a chuť z dubu a rum ztrácí nežádoucí vlastnosti z nového destilátu. Proces zrání a stárnutí má účinky na senzorické vlastnosti, které jsou očekávány u rumu. Běžná doba zrání je 10–12 let, ale může být také delší jak 15 let.

Před plněním do lahví je obsah ethanolu standardizován a barva bývá upravována pomocí karamelu nebo v některých případech kořením. Bezbarvé neboli bílé rumy se přefiltrují a použije se dřevěné uhlí na odstranění jakékoli barvy a zdokonalení příchutě. [5]

2.2 Charakterizace chuti rumů

Základní chuť destilovaných nápojů je primárně odvozena od těkavých sloučenin, jako jsou vyšší alkoholy, estery mastných kyselin a některé karbonyly. Sloučeniny ovlivňující aroma a chuť jsou tvořeny během procesu fermentace a také získány během zrání ve dřevěných sudech. Sloučeniny extrahované ze dřeva se liší podle použitého druhu dřeva, kde se nachází více než 120 látek, například dubové dřevo je významným zdrojem kyseliny octové. Sudové dřevo podporují oxidaci, esterifikaci a je zvýšená tvorba acetaldehydu, acetalu a ethylacetátu. Také mikroorganismy působí jako zdroj chuti a aromatických látek. Celková role je podstatně méně důležitá než u kvasinek, ale může být významná při předávání specifických vlastností. [4, 5]

Rum má komplexnější aroma, kdy bylo popsáno více než 450 aromatických sloučenin, pro srovnání např. u whisky, bylo popsáno něco málo přes 260 sloučenin. [5] Hladiny vyšších alkoholů v rumu se velmi liší. V komerční produkci jsou obsahy aromatických látek nižší, než je tomu při výrobě v menším měřítku, protože se používají jednodušší destilační techniky. Obsah vyšších alkoholů v rumech je v podstatě stejný jako v jiných destilovaných nápojích. Složení je závislé spíše na použité melase než na samotné fermentaci. Jamajské rumy převážně obsahují 2-methyl-1-butanol, 2-butanol, 3-methyl-1-butanol nebo také 2-methyl-1-propanal. Vysoká hladina 2-butanolu je připisována bakteriálnímu metabolismu, pravděpodobně zrajícím bakteriím mléčného kvašení. Romy také obsahují vyšší hladiny 1-propanolu a 1-okten-3-olu, které mohou být významné. Celkový obsah aldehydů v rumech se pohybuje od 50 do 90 mg/ml. Nejhojněji se vyskytujícím karbonylem je acetaldehyd. Vyššími alifatickými aldehydy jsou propionaldehyd, isobutyraldehyd, 2-methylbutyraldehyd a také isovaleraldehyd, který má značný význam ve vůni. Ketony jsou vysoce aromaticky aktivní látky a jsou obecně přítomny ve vyšších hladinách, než je tomu u whisky nebo brandy. Nejběžnějšími ketony v rumech jsou aceton, 2-butanon, 3-penten-2-on, 2-pentanon nebo 2,3-butandion, který se pohybuje v hladinách 0,4 – 4,4 mg/l. [5]

Hladiny těkavých mastných kyselin se velmi liší od pouhých 100 mg/l v lehkých portorických rumech na více než 600 mg/l v těžkých rumech z Martiniku. Těžké rumy také obsahují větší množství těkavých kyselin. Tak jako u jiných lihovin je kvantitativně nejdůležitější kyselina octová. Ta má zvláštní význam u světlých rumů. Romy obecně obsahují vyšší hladiny máselné, propionové, propionové a valerové kyseliny než jiné lihoviny. Drobné rozdíly mezi rumy mohou vyplývat z kolísání hladin 2-ethyl-3-máselné, oktanové a dekanové kyseliny. Přestože většina mastných kyselin v rumech jsou nasycené, byly zjištěny také nenasyčené kyseliny, jako je kyselina linolová, olejová nebo také palmitová.

Ethylestery mastných kyselin mají v rumech značný význam, i když jejich koncentrace je velmi proměnlivá. Ethylacetát je přítomný pouze v lehkých rumech ve vysokých koncentracích a je obecně nejvíce se vyskytující těkavý ester. Koncentrace ethylesterů kyselin se šesti a více atomy uhlíku se pohybují od 0,1 do 0,5 mg/l v karibských rumech a od 1,5 do 20 mg/l v amerických rumech. Karibské rumy obsahují poměrně vysoké hladiny ethyl oktanoátu zatímco ethyl dekanoát má větší význam v novoanglických rumech.

Komplexní aroma rumů lze rozdělit do tří frakcí v závislosti na bodu varu. Světlá aromatická frakce zahrnuje ethyl, isoamyl a isobutyl estery včetně ethyl-3-fenylpropanoátu, isoamyl laktátu a isobutyl oktanoátu. Tyto estery dodávají ovocné aroma a jsou velmi důležité v tmavých těžkých rumech. Estery ve střední aromatické frakci se pohybují od ethyl hexanoátu až po ethyl laurát. Tyto látky jsou také důležité v chuti těžkých rumů, ale mají malý význam u světlých rumů. Hlavní komponenty těžké aromatické frakce jsou estery karboxylových kyselin s dlouhými řetězci, např. ethyl palmitát. Množství těchto látek je malé a význam omezený.

V rumech jsou také přítomné fenolické látky, eugenol nebo 4-methylguajakol. Dále také obsahují kresoly. Ty jsou pravděpodobně odvozeny od melasy, což může být zdrojem relativně vysoké hladiny terpenoidů. Laktony se mohou také podílet na aroma rumů. Vznikají pyrolýzou hexóz, která je důležitá u těžkých rumů. Dalšími přítomnými sloučeninami je síra. Většina látek z ní hraje malou roli v aroma, ale vznik diethyl sulfidu oxidací ethanthiolu může vést k odlišným pachům. [3, 5]

3 Chromatografie

Chromatografie je jedna ze základních analytických metod pro stanovení sloučenin v plynném nebo kapalném stavu. Jedná se o separační techniku, která využívá dělení látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi. První fáze se nazývá stacionární fáze, ta je nepohyblivá. V chromatografii nabývá nejrůznějších forem. Může to být tenký film kapaliny ve vnitřní stěně kapiláry, tuhé částice o malých velikostech až stovky mikrometrů nebo tenká vrstvička kapaliny, která je nanesená na tuhých částicích. Většinou se jakákoliv forma stacionární fáze označuje jako sorbent, kterým je vyplněna kolona. Druhá fáze je pohyblivá, buď kapalina, nebo plyn, označována jako mobilní fáze bez ohledu na skupenství. Fáze jsou voleny tak, aby měl vzorek v každé fázi jinou rozpustnost při dané teplotě. Diferenciální migrace sloučenin vede k jejich separaci. [6, 7]

Je to fyzikálně-chemická metoda separace složek ve směsích kapalných nebo pevných. Stacionární fází je naplněná kolona, přes kterou postupuje mobilní fáze. Vzorek je umístěn na začátek nepohyblivé části a pomocí pohyblivé fáze je unášen celou soustavou ke konci kolony. Jednotlivé složky vzorku mohou být zachycovány stacionární fází, a proto se zdržují při pohybu. Zdržují se více složky, které jsou silněji poutány nepohyblivou fází. Takto se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se nejdříve dostávají složky, které jsou méně zdržovány.

Každá molekula vzorku při průchodu kolonou projde mnohokrát z proudu mobilní na povrch stacionární fáze a zpět. V každém okamžiku je systém blízko rovnováhy. Dosažená rovnováha se popisuje pomocí distribuční konstanty K_D , která je definována jako poměr rovnovážných koncentrací složky ve dvou koexistujících fázích:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s V_m}{(n_A)_m V_s} \quad (1)$$

kde $(n_A)_s$ a $(n_A)_m$ jsou látkové množství látky A ve stacionární a mobilní fázi, V_m a V_s je objem těchto fází. Avšak chromatografická kolona je dynamický systém, a tak nemůže doopravdy dosáhnout rovnováhy. Čas, který setrvá průměrná molekula složky na povrchu stacionární fáze, je závislý na interakci mezi složkou a sorbentem a určuje pořadí, ve kterém složky vycházejí z kolony. Čím je interakce větší, tím později složka vychází z kolony a tím je vyšší zádrž v systému.

Chromatografická separace probíhá na přístroji, který se nazývá chromatograf. K němu je připojen detektor, který detekuje složky vycházející z kolony. Tyto složky neboli signály se poté přenesou na zapisovač a vzniká základní záznam, kterému se říká chromatogram. [8, 9]

4 Plynová chromatografie

Ve velmi krátké době se plynová chromatografie (GC, *Gas Chromatography*) stala přední technikou pro separaci a analýzu těkavých sloučenin. Používá se pro identifikaci a kvantifikaci složitějších plynů a těkavých látek. Bývají analyzovány, jak organické sloučeniny s bodem varu nižším než je 400 °C, tak i anorganické materiály bez ohledu na skupenství. [8]

Plynová chromatografie se nazývá podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. „Podle převažujícího mechanismu separace se používají dvě základní varianty plynové chromatografie. Adsorpční plynová chromatografie (plyn-pevná stacionární fáze) je omezeně použitelná pro plyny a některé kapaliny o nízké molekulární hmotnosti. Rozdělovací plynová

chromatografie využívá jako stacionární fázi film netěkavé kapaliny nanesené na povrch tuhého nosiče, který má minimální adsorpční vlastnosti.“ [9]

Plynová chromatografie je často kombinována s řadou dalších technik, jako je hmotnostní spektrometrie, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a atomová emisní spektrometrie. [8, 10]

4.1 Historie

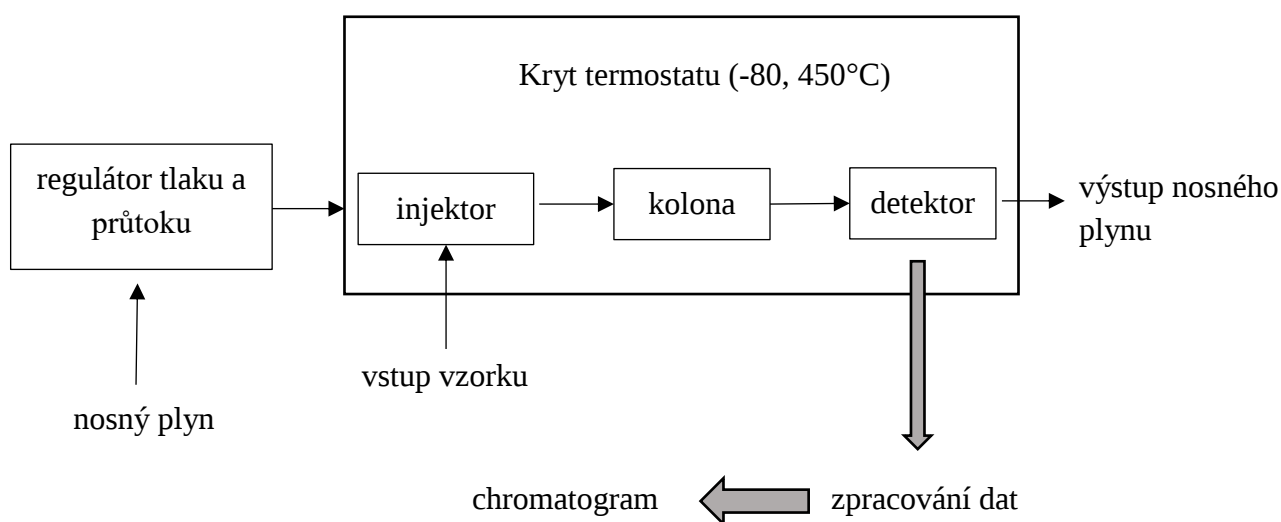
Chromatografie začala být používána na přelomu 20. století, kdy Ramsey oddělil směs plynů a par na adsorbentech, jako bylo dřevěné uhlí. Rostlinné pigmenty oddělil pomocí kapalinové chromatografie Michael Tswett. Tswett je považován za otce chromatografie, hlavně protože vytvořil tento termín a také vědecky popsal proces.

První publikovaná práce o plynové chromatografii pochází z roku 1952 od Martina a Jamese. První komerčně vyráběné nástroje byli od Griffina, George a dalších. Metoda, tak jak ji dnes známe, se vyvinula na konci 50. a na počátku 60. let. Zjistilo se, že se jedná o jednoduchou a rychle použitelnou metodu pro separaci mnoha těkavých materiálů.

Poptávka po nových strojích vedla k vývoji nových plynových chromatografů s vylepšenými schopnostmi. Vývoj chromatografie ve všech jejích formách důkladně prozkoumal Ettre, který má i mnoho publikací. Dnes je GC vyspělá a velmi důležitá analytická technika. [10]

4.2 Instrumentace

Plynový chromatograf se skládá z několika částí jako je zdroj nosného plynu, průtokový regulátor, injektor neboli nástříkový blok, kolona umístěná v termostatu kolon, detektor a vyhodnocovací zařízení. Schéma plynového chromatografu lze vidět na **obr. 3**. [7]



Obr. 3: Schéma plynové chromatografie

4.2.1 Mobilní fáze

Mobilní fází v plynové chromatografii je inertní plyn, který nereaguje se vzorkem. Hlavní funkcí je přenos vzorku kolonou. Pro zdroj slouží tlakové láhve nebo generátory, které pracují na principu molekulových sít. Tok nosného plynu je pečlivě kontrolován, aby byla zajištěna reprodukovatelnost retenčních časů a byl minimalizován drift detektoru a hluk. Podle druhu detektoru se preferují různé typy plynů. Pro tepelně vodivostní detektor se nejvíce používá helium. U plamenově ionizačního detektoru může být použit dusík i helium. Dusík poskytuje o něco větší citlivost a pomalejší analýzu než helium. Pro detektor elektronového záchytu je doporučen velmi suchý dusík bez kyslíku. Dále se také používá vodík nebo i argon. I když je vodík hojně dostupný v některých částech světa, jeho používání může být nebezpečné a nedoporučuje se z důvodu rizika vzniku požárů a výbuchů. Tlak v hlavě kolony je regulován buď mechanickými, nebo elektronickými regulátory, aby průtok zůstal konstantní na své optimální hodnotě.

Je důležité, aby byl nosný plyn ve vysoké čistotě. Nesmí obsahovat žádné stopy uhlovodíků, vodní páry a kyslíku, protože to vše může zhoršit polaritu stacionární fáze nebo snížit citlivost detektoru. Z těchto důvodů obsahuje systém nosného plynu filtry s molekulovým sítem k odstranění vody a redukčními činidly pro další nečistoty. [7, 8, 10, 11]

4.2.2 Injektor

Vzorek se dávkuje pomocí injektoru na začátek kolony. Vzorek se převede do plynného stavu a vnese se do proudu nosného plynu. Dávkování se uskutečňuje pomocí plynotěsné mikrostříkačky nebo dávkovacím ventilem buď ručně, nebo pomocí automatických dávkovačů. Vstřikování vzorku lze provádět dvěma technikami. První může být přímo na kolonu, které se využívá nejvíce v případě kapilárních kolon a druhý princip je dávkování nad ústí kolony umístěné na konci injektoru.

Vstřikování vzorku přímo na kolonu se provádí různými způsoby. Nejvíce se používají s děličem toku – *split* injektor, bez děliče toku – *splitless* injektor, nástřik přímo do kapilární kolony – *on column injector* a dávkování s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku.

Jaký způsob nástřiku se použije, závisí na požadavcích analýzy. *Split* injektor se používá u vzorku obsahujících velké koncentrace analyzovaných komponent. Po nástřiku se vzorek vypaří, smíchá se s nosným plynem a rozdělí se na dvě frakce. Pro analýzu je použita jen malá část, obvykle 0,1–10 %, a větší část vzorku je odvedena do odpadu. Poměr rozdělení se obvykle pohybuje mezi 1:20 a 1:500. Takovýto způsob se nejvíce užívá pro kvantitativní analýzu, pokud je důležitým požadavkem velké rozlišení zón separovaných látek. Dávkování bez děliče toku se používá více pro zředěné vzorky. K analýze není použit celý vzorek, ale pouze asi 80 %, aby nedocházelo k rozmývání zón.

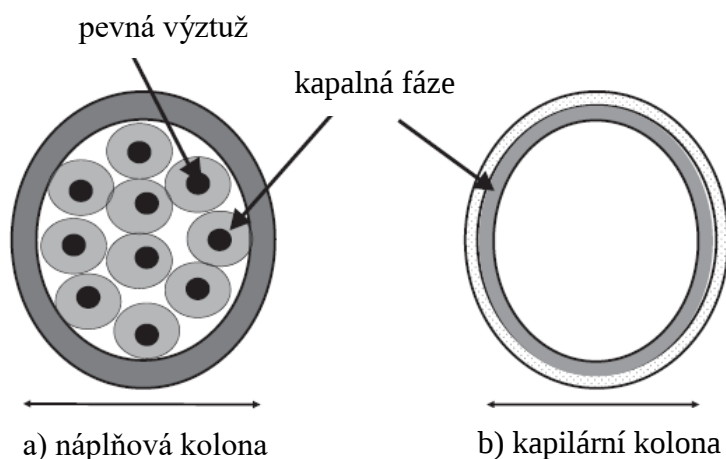
On-column dávkování je speciální technika nástřiku, kdy je vzorek dávkován přímo do kolony pomocí speciální mikrostříkačky. Používá se pro analýzu vzorků, jejichž složky se rozkládají těsně nad bodem varu. Na začátku kolony je teplota okolo 40 °C, má deaktivovaný povrch a dochází ke kondenzaci vzorku v úzké zóně.

Injektor pro dávkování s programovým vypařováním vzorku (PTV) je podobný *split* a *splitless* injektoru. Teplota vstřikovací komory může být naprogramována tak, aby provedla

přechod od 20 do 300 °C za několik desítek sekund. Vložka s chromatografickou náplní může být součástí injektoru. Ta slouží k odstranění rozpouštědla a nízkomolekulárních sloučenin. Umožňuje zachytit nečistoty a netěkavé sloučeniny. Výhodou je kombinovat s injekcí za studena na kolonu. [7]

4.2.3 Kolona

Existují dva typy kolon, které se liší svým výkonem, náplňové a kapilární kolony. U naplněných kolon je stacionární fáze nanесena nebo vázána chemickou reakcí na porézní nosič. Pro kapilární se tenká vrstva nepohyblivé fáze ukládá na vnitřní vrstvu povrchu kolony.



Obr. 4: Schématické znázornění (a) náplňová kolona a (b) kapilární kolona [10]

Náplňové kolony se běžně používají, zejména při analýze velmi malých molekul. Jsou to kovové nebo skleněné trubice o vnitřním průměru 2–6 mm, dlouhé 1–5 m. Plní se adsorbenty na bázi silikagelu a aktivního uhlí, molekulovými sítý nebo alumina. Hlinitokřemičitany se používají jako molekulová síta. Obsahují inertní a stabilní porézní nosič, na kterém stacionární fáze může být impregnována nebo ohraňována. Tato pevná podpora je vyrobena z kulovitěho materiálu, částice o průměru přibližně 0,2 mm, které se získávají z křemelin, jejichž struktura je chemicky srovnatelná s amorfním oxidem křemičitým. Separace složek mezi nosným plynem a upevněnou stacionární fází by měla probíhat pouze na základě rozdělování. Náplňové kolony mají vyšší kapacitu než kolony kapilární. Moderní náplňové kolony jsou mikronáplňové kolony, které mají malý průměr a obsahují malé částice náplně, proto je dosahováno vyšší účinnosti separace jako při stejné délce u běžných náplňových kolon.

U kapilárních kolon se jako nosič stacionární fáze využívají vnitřní stěny. Obvykle jsou vyrobeny z taveného oxidu křemičitého o nejvyšší čistotě získaného spalováním tetrachlor silanu v atmosféře bohaté na kyslík. Dále mohou být skleněné nebo kovové kapiláry, jejichž vnitřní stěny jsou povlečené stacionární fází nebo jsou kapiláry naplněné v celém svém objemu. Vnitřní průměr kolon je 100 až 700 μm , tloušťka filmu stacionární fáze 0,1–5 μm a délka kolon se pohybuje od 15 až do 100 metrů. Většinou pro aplikaci stačí kolony o délce 30 metrů. Větší průměr kolon může pojmout více vzorku, menší průměry vedou sice k vyšší účinnosti, ale také

k nízké kapacitě, proto nemohou být kolony tak dlouhé, protože by musel být delší čas separace. Kolona je obalena vrstvou polyimidu, který dodává křehkému materiálu kolony pružnost a brání ji před zlomením. Kolona může být také pokryta hliníkovou vrstvou, která chrání kolonu do teplot 425 °C, polyimidová vrstva chrání do 350 °C.

Podle uložení stacionární fáze se rozlišují tři druhy kapilárních kolon. Prvním typem jsou kolony WCOT (*wall coated open tubular column*), v kterých tvoří kapalná stacionární fáze tenký film na vnitřní straně kapiláry. Kolony by měly být velmi úzké, aby byl zajištěn dostatečný kontakt mobilní fáze se stacionární. Další kolony jsou SCOT (*support coated open column*), které mají na vnitřní straně vrstvu nosiče se zakotvenou kapalinou. Posledním druhem jsou PLOT kolony (*porous-layer open tubular column*), které mají na vnitřním povrchu kapiláry vrstvu pevného aktivního sorbentu. Kolony PLOT se používají pro větší vzorky než kolony WCOT.

V závislosti na druhu výroby nosiče stacionární fáze, nepravidelně nebo pravidelně po celé délce, mohou být kapilární kolony naplněné v celém objemu. Stacionární fáze, které jsou běžně poutány dispersními silami, jsou vázány k povrchu chemicky, aby nedocházelo k odnášení vrstvy stacionární fáze z povrchu kolony nebo nosiče, takové to kolony jsou s vázanou fází. [6, 7, 9, 10, 11]

4.2.4 Detektory

Detektory jsou zařízení, které reagují na přítomnost analytu a složení protékající mobilní fáze. Detektor vysílá elektrický signál, který je zaznamenán v závislosti na čase. Sleduje vlastnost plynu z kolony, která závisí na koncentraci a druhu složek. Detektory by měly být vysoce citlivé, měly by mít dobrou stabilitu a reprodukovatelnost signálu. Dále také nízký šum, drift a rychlou odezvu nezávislou na rychlosti toku mobilní fáze. Lineární dynamická odezva by měla být v rozsahu několika řádů a teplotní rozsah by měl být minimálně do 400 °C. Univerzální detektory by měly mít obdobnou odezvu pro všechny analyty.

Plynová chromatografie využívá několik různých druhů detektorů pracujících na odlišných principech. Nejpoužívanější a nejuniverzálnější je plamenově ionizační detektor, tepelně vodivostní a detektor elektronového zachytu. V poslední době se nejvíce v laboratořích využívá hmotnostně spektrometrický detektor. K vysoké selektivitě a snížení zbytkové nejistoty identifikace vede řada jeho detekčních variant. Používá se pro analýzu komplexních matric. [6, 7, 10, 11, 12]

4.3 Plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (GC-MS)

Plynový chromatograf je přímo spojený se stolním hmotnostním spektrometrem. Systém se dnes běžně používá ve většině analytických laboratořích. Využívá se pro analýzu komplikovaných směsí látek, u kterých je identifikace komponent na základě porovnání retenční času nemožná. Techniku lze uplatnit při sledování technologických procesů, jakostních parametrů výrobků a surovin, nebo při analýze objektů životního prostředí. Díky vysoké citlivosti detekce lze GC-MS aplikovat v oblasti stopové a ultrastopové analýzy. V potravinářském a kosmetickém průmyslu je spojení GC-MS nejčastěji používáno pro objektivní hodnocení chutí a vůní, jejichž nositelem jsou nejvíce těkavé látky.

Na výstupu z kolony plynového chromatografu bývá atmosférický tlak, ale iontový zdroj u hmotnostního spektrometru využívá vysoké vakuum. Proto je systém GC-MS spojený s dostatečně výkonným čerpacím systémem, který je schopný s rezervou odčerpat nadbytek nosného plynu z prostoru ionizace. Mezi kolonou a iontovým zdrojem je separátor, který pracuje na principu odstranění přebytečného nosného plynu. Průtok kapilární kolonou je o dost nižší a vakuový systém jej odčerpá při normálním výkonu, a proto je kolona zavedena do evakuovaného prostoru MS těsně před iontový zdroj. Molekuly analytu musí být nejprve ionizovány, aby mohly být přitahovány řádným magnetickým nebo elektrickým polem. Existuje mnoho technik, ale jako nejběžnější se používá elektronová ionizace.

Vzhledem k malé velikosti je často označován jako stolní přístroj. Většina stolních systémů GC-MS využívá jednu platformu kvadrupól, iontové pasti nebo analyzátor hmotnosti hmoty.

Používají se nepolární až středně polární kolony s pokrytím do 5 % stacionární fáze. Ta je pro zvýšení stability zesíťována a chemicky navázána. Vyrábějí se přímo kolony pro spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií bez použití děliče, kdy všechny nosný plyn jde do iontového zdroje. [10, 11, 12]

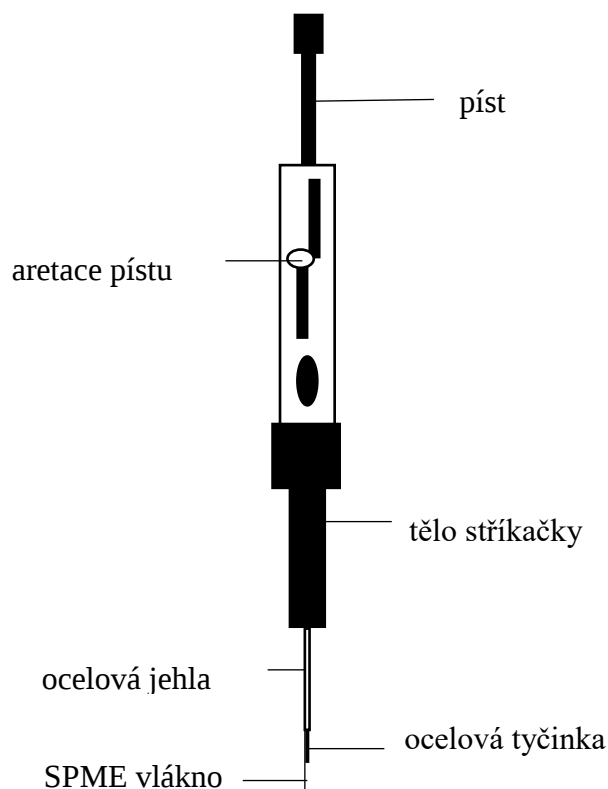
5 Mikroextrakce tuhou fází SPME

Mikroextrakce na pevné fázi (SPME, *Solid Phase Microextraction*) byla vyvinuta v 90. letech 20. století jako zjednodušená metoda extrakce těkavých kontaminujících látek z vody bez rozpouštědel. Tato technika nevyžaduje žádné organické rozpouštědlo ani speciální přístrojové vybavení. K analýze postačí malé množství vzorku. Lze takto vzorkovat jak pevné, tak i kapalné vzorky. Do jediného kroku jsou spojeny všechny procesy jako je složitá příprava vzorku, jeho zakoncentrování a extrakce.

SPME využívá 1 až 2 cm dlouhé porézní vlákno z taveného křemene potažené vhodným adsorpčním materiálem, které je umístěno v injekční stříkačce a chráněné ocelovou jehlou. Jehla slouží k propíchnutí septa a také jako ochrana vlákna před poškozením. Na **obr. 5** je schéma SPME jehly.

Analyty vzorku se extrahují a koncentrují na extrakčním vlákne. Potom je vlákno zavedeno do injektoru GC, kde působením teploty jsou sledované sloučeniny desorbovány a unášeny mobilní fází do kolony, kde jsou odděleny.

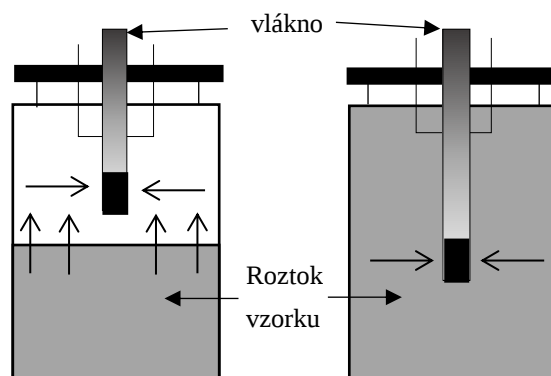
Jsou odlišné typy vláken potažené různým adsorpčním materiálem, která se používají na různé druhy vzorků. Pro nepolární sloučeniny se často používá nepolární polydimethylsiloxan (PDMS), které lze použít i na některé těkavé aromatické látky. Pro více polární látky se používá polární polyakrylát (PA), kterým jdou stanovovat fenoly nebo alkoholy. Existují také smíšená vlákna, která obsahují divinylbenzen (DVB) nebo carboxan (CAR), které zvyšují retenční kapacitu. Pro analýzu aromatických látek mohou být použita vlákna 100 μm PDMS, 65 μm DVB/PDMS, 85 μm CAR/PDMS nebo také 50/30 μm DVB/CAR/PDMS. [10, 12, 13, 14]



Obr. 5: Schéma SPME jehly

Vzorkování pomocí SPME lze provádět dvěma základními způsoby a těmi jsou přímá extrakce DI-SPME (*direct injection*) a extrakce z prostoru nad vzorkem HS-SPME (*headspace*), které jde vidět na **obr. 6**. Při přímé extrakci je vlákno ponořené ve vzorku a analyty jsou přímo transportovány z matrice vzorku do extrakční fáze. Aby byla extrakce rychlá, je potřeba přidat míchání, při kterém se zvýší transport analytů z převážné části roztoku do blízkosti vlákna.

Při headspace vzorkování (HS-SPME) je jehla s vláknem umístěna v prostoru nad vzorkem. Na vlákno se zachytávají analyty z plynné fáze, která je uvolňována ze vzorku při zahřívání. Extrahují se pouze relativně těkavé analyty. Tento typ je vhodný pro vzorky s vysokou molekulovou hmotností. [13, 14]



Obr. 6: Způsob SPME vzorkování (a) technika headspace (b) přímá extrakce [11]

Rutinně lze také použít techniku SPME v kombinaci s HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), HPCE (*High Performance Capillary Electrophoresis*) a MS (*Mass Spectrometry*). Využití této metody se používá na extrakci těkavých sloučenin při sledování životního prostředí, v biochemii a v analýze potravin. [7]

6 Experimentální část

6.1 Materiál

Vzorky rumů byly vybrány z komerčně a cenově dostupných lihovin na trhu. Analyzované vzorky pocházejí od různých výrobců, aby byla zajištěna odlišnost ve výrobních procesech, jako je zpracování cukrové třtiny, destilace a další. Pro optimalizaci HS-SPME, byl namíchán zásobní roztok vybraných standardů látek, které se nacházejí v třtinových rumech.

6.2 Chemikálie

Tab. 1: Chemikálie použité v diplomové práci

Název	Čistota	Výrobce	CAS číslo
Ethanol	Gradient Grade for LC	Merck	64-17-5
Ethyl acetát	For Analysis	Supelco	141-78-6
Ethyl butanoát	99%	Sigma-Aldrich	105-54-4
Ethyl hexanoát	≥ 99%	Sigma-Aldrich	123-66-0
Ethyl heptanoát	99%	Sigma-Aldrich	106-30-9
Ethyl octanoát	≥ 99%	Sigma-Aldrich	106-32-1
Ethyl decanoát	≥ 99%	Sigma-Aldrich	110-38-3
Ethyl tetradecanoát	99%	Sigma-Aldrich	124-06-1
Ethyl hexadecanoát	≥ 99%	Sigma-Aldrich	628-97-7
Methanol	Gradient Grade for LC	Merck	67-56-1

6.3 Laboratorní vybavení

- Headspace vialky 20 ml
- Automatické pipety 1000 µl, 10 ml
- Termostatovaný blok – Combi pal
- SPME sestava
- Plynový chromatograf – Agilent 7890A
- Hmotnostní detektor – Agilent 5975C

6.4 Výběr analytů

Cílem této práce je optimalizace HS-SPME při stanovení aromatických látek v třtinových rumech metodou GC/MS. Za chuť a vůni destilátů jsou zodpovědné aromatické látky. Představují celou řadu chemických sloučenin, jako jsou uhlovodíky, alkoholy, estery, karboxylové kyseliny, ketony nebo aldehydy. Nejvýznamnější a nejrozsáhlejší skupinu

představují estery, na které se zaměřuje tato práce, a to zejména na ethyl estery vyšších mastných kyselin. Pro sledování a kvantifikaci byly vybrány následující aromatické látky:

- Ethyl butanoát ($C_6H_{12}O_2$)
- Ethyl hexanoát ($C_8H_{16}O_2$)
- Ethyl heptanoát ($C_9H_{18}O_2$)
- Ethyl octanoát ($C_{10}H_{20}O_2$)
- Ethyl decanoát ($C_{12}H_{24}O_2$)
- Ethyl dodecanoát ($C_{14}H_{28}O_2$)
- Ethyl tetradecanoát ($C_{16}H_{32}O_2$)
- Ethyl hexadecanoát ($C_{18}H_{36}O_2$)

6.5 Příprava standardů

Byl připraven zásobní roztok standardů do 100 ml odměrné baňky, který se poté postupně dále ředil. Bylo přidáno 20 ml ethanolu do 100 ml odměrné baňky, poté se přidalo 50 μ l jednotlivých standardů a celé bylo doplněno methanolem po rysku. Koncentrace jednotlivých standardů v zásobním roztoku je vidět v **tab. 2**. Z tohoto zásobního roztoku byly ředěny pracovní roztoky pro kalibrační křivky. Byly ředěny do 50 ml odměrných baněk a opět doplněny methanolem.

Tab. 2: Koncentrace jednotlivých analytů v zásobním roztoku

Analyt	Koncentrace [μ g/ml]
Ethyl butanoát	438
Ethyl hexanoát	435
Ethyl heptanoát	435
Ethyl octanoát	434
Ethyl decanoát	431
Ethyl teradecanoát	430
Ethyl hexadecanoát	429

6.6 Příprava vzorků

Vzorky jednotlivých třtinových rumů byly automatickou pipetou 5 ml napipetovány do headspace vialek o objemu 20 ml. Poté byly vialky uzavřeny víčkem se septem. Takto připravené vzorky byly analyzovány optimalizovanou metodou HS-SPME GC/MS.

6.7 Optimalizace extrakčních podmínek

Metoda SPME je založena na sorpci analytu malých množství extrakční fáze na povrchu křemenného vlákna. Analyty se sorbují do té doby, než se dosáhne rovnovážného stavu. Množství extrahovaného analytu, které se používá při metodě SPME, je závislé jak na polaritě a tloušťce vlákna, tak i na extrakční době a koncentraci analytu ve vzorku.

Jsou dva typy vzorkování, které lze použít u SPME. Jedná se o přímou extrakci DI-SPME nebo extrakci z prostoru nad vzorek HS-SPME. U přímé extrakce je vlákno ponořené do vzorku a analyty jsou přímo transportovány ze vzorku do extrakční fáze. Při headspace vzorkování je

vlákno umístěno v prostoru nad vzorkem. Na vlákno jsou látky sorbovány z plynné fáze, která je uvolňována při zahřívání vzorku.

U vláken, která byla používána, byla optimalizována teplota a doba headspace extrakce. Mícháním nebo teplotou lze zvýšit účinnost extrakce.

6.7.1 Volba SPME vlákna

Na typu použitého vlákna velmi závisí efektivita SPME. Vlákna se od sebe liší polaritou, tloušťkou a také z jakého materiálu jsou vyrobená. Pro extrakci těkavých látek je vhodné několik typů vláken. Například pro extrakci nepolárních látek se používá vlákno s nepolárním polydimethylsiloxanem (PDMS), kterým jsou stanovovány také některé aromatické sloučeniny. Více polární analyty, jako jsou fenoly a alkoholy, se stanovují pomocí polyakrylátového (PA) vlákna. Lze také používat smíšená vlákna, která zvyšují retenční kapacitu a obsahují převážně Carboxen (CAR), divinylbenzen (DVB) nebo také Carbowax (CW). [10, 13]

K extrakci byly vybrány 2 typy vláken (**Tab. 3**). U vybraných vláken byla optimalizována extrakční doba a teplota extrakce.

Tab. 3: Volba SPME vlákna

Typ vlákna	Podmínky
100 μm PDMS	extrakce – 15 min při 60 °C desorpce – 3 min při 250 °C
50/30 μm DVB/CAR/PDMS	

6.7.2 Volba extrakční doby

Nejvyšší citlivost SPME je při dosažení rovnováhy mezi vzorkem a povrchem vlákna. Extrakční doba je také kritickým parametrem. Úplná rovnováha není zcela nutná pro stanovení správných a přesných výsledků. Doba extrakce může být zlepšena mícháním nebo zvýšením teploty extrakce. [13]

Tab. 4: Volba doby pro extrakci

Doba extrakce [min]	Typy vlákna	Podmínky extrakce
10	100 μm PDMS	60 °C
15		
20	50/30 μm DVB/CAR/PDMS	
25		
30		

6.7.3 Volba teploty extrakce

Extrakční teplota je řízena difúzí analytů přítomných v matici vzorku. Vyšší teplota extrakce zvyšuje koncentraci analytů v headspace. Teplota má také vliv na citlivost SPME, protože zvýšení teploty snižuje rozdělovací koeficient a zároveň zvyšuje difúzní koeficient, což má vliv na extrahované množství analytu a určuje rychlost migrace látek, proto je vhodné měření provádět při stejné a optimální teplotě. [14]

Tab. 5: Volba teploty pro extrakci

Teplota extrakce [°C]	Typy vlákna	Podmínky extrakce
40	100 µm PDMS	15 min
50		
60	50/30 µm DVB/CAR/PDMS	
70		
80		

6.8 Optimalizace separačních podmínek

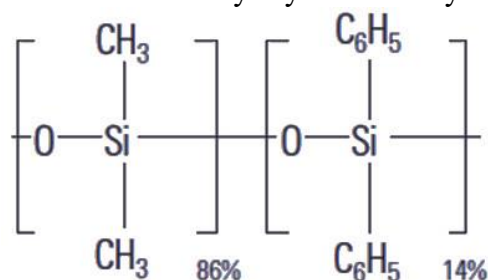
Mezi nejdůležitější podmínky pro účinnou a správnou separaci patří výběr chromatografické kolony. Volba správné kolony je založena na několika faktorech, jako je tloušťka filmu a délka kolony, vnitřní průměr, typ stacionární fáze a také důležitým faktorem je vlastnost analytu. Separace jednotlivých složek je nejvíce ovlivněna teplotou separace, účinností chromatografické kolony a selektivitou stacionární fáze, ale také může být ovlivněna druhem nosného plynu, nosičem stacionární kapaliny, konstrukcí chromatografu, teplotou dávkovače a dalšími faktory.

6.8.1 Volba GC kolony

Nejčastějším problémem je výběr vhodné stacionární fáze u kapilárních kolon. Schopnost kolony separovat analyty ve vzorku je dané polaritou fáze. Pro nepolární látky jsou vhodné nepolární kolony a pro polární sloučeniny se používají spíše polární kolony.

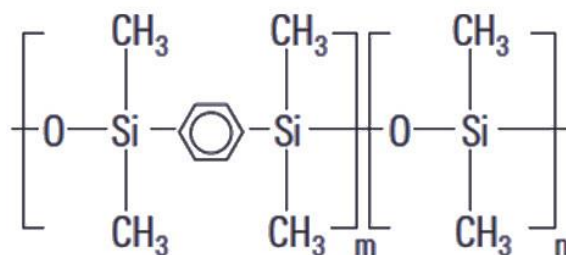
V této práci byly při vývoji metody použity čtyři různé kolony jako je nepolární HP-5ms, mírně polární VF-5ms, polární VF-WAXms a středně polární Rxi-624SilMS.

HP-5ms je nepolární kolona tvořená (5%-fenyl)-methylpolysiloxanem. Má velmi nízkou propustnost, proto je vhodná pro GC s použitím hmotnostního detektoru. Vykazuje vynikající inertnost vůči aktivním sloučeninám včetně kyselým a zásaditým látkám.



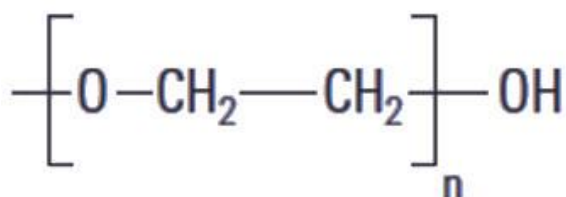
Obr. 7: Struktura HP-5ms [15]

VF-5ms je vysoce inertní 5% fenylmethylová kolona pro zvýšenou citlivost a přesnost. Mírně vyšší polarita má selektivitu pro aromatické sloučeniny. Je vhodná pro širokou škálu mírně polárních a dokonce i polárních sloučenin jako jsou fenoly.



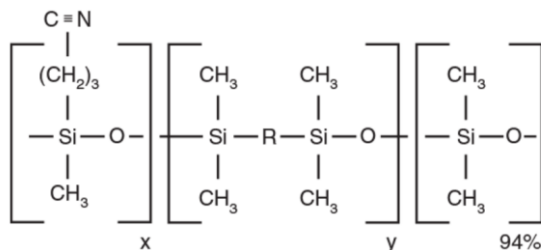
Obr. 8: Struktura VF-5ms [15]

VF-WAXms je se speciálně navrženou voskovou fází s polyethylenglykolem pro přesné výsledky MS s polárními sloučeninami. Zlepšuje poměr signál šum ve stopových analýzách.



Obr. 9: Struktura VF-WAXms [15]

Rxi-624SilMS je kolona s nízkou propustností a vysokou tepelnou stabilitou s maximální teplotou až 320°C. Je se středně polární silarylenovou fází podobnou 6% kyanopropylfenylu a 94% dimethylpolysiloxanu.



Obr. 10: Struktura Rxi-624-SilMS [15]

6.8.2 Podmínky GC/MS pro kolonu VF-5MS

Tab. 6: Nastavení GC/MS

Kapilární kolona	VF-5ms (30m x 320µm x 0,25µm; -60°C – 325°C)
Teplotní program	35 °C (0 min) → 4 °C/min → 100 °C (0 min) → 20 °C/min → 250 °C (15 min)
Nosný plyn	Helium
Mód	Konstantní průtok
Průtok	1 ml/min
Teplota nástřiku	250 °C
Mód nástřiku	Splitless
Průtok děličem toku	50 ml/min po 2 min
Detektor	Hmotnostní spektrometr
Čas analýzy	38.75 min
Ionizační mód	EI (Elektronová ionizace)
MSD transfer line	280 °C
Teplota MS kvadrupólu	150 °C
Teplota iontového zdroje	230 °C
Akviziční mód	Full scan 30–400 m/z

Pro identifikaci vzorků třtinových rumů, byla použita metoda popsaná v **tab. 6**. Pro stanovení obsahu jednotlivých ethyl esterů vyšších kyselin a především pro optimalizaci metody se parametry akvizičního módu full scan změnil na SIM (*Selected ion monitoring*). Parametry SIM módu jsou v **tab. 7**.

Tab. 7: SIM mód metody pro stanovení obsahu jednotlivých standardů

Čas měření [min]	m/z	D _{well} čas [ms]
6	45	100
	56	100
	59	100
	88	100
13	88	100
	95	100

6.9 Validace metody

Validace je proces ověření platnosti zvolené analytické metody. Před samotným poskytováním analytických informací, je nutné prokázat, že metoda je schopna podávat přijatelné výsledky, když jde o zcela novou metodu. Validací je hodnocena přesnost a správnost, která je dosažena během daného měření. Navíc validace zajišťuje, aby kterýkoliv jiný analytik byl schopen využít danou metodu podle zadaných parametrů a získal srovnatelné výsledky. [16]

6.9.1 Aritmetický průměr

Je průměrná hodnota souboru dat. Je to číselný průměr získaný součtem jednotlivých měření a vydělen počtem měření,

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (2)$$

kde $\bar{X}$ je průměr, x_i je i-té měření a n je počet měření. [16]

6.9.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka popisuje, jak jsou jednotlivé hodnoty rozptýleny od průměru hodnot.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

Kde s je směrodatná odchylka, x_i je jedno z n jednotlivých měření a $\bar{x}$ je průměr.

6.9.3 Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka je odvozena od směrodatné odchylky a udává rozptýlení od aritmetického průměru,

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \quad (4)$$

kde s_r je relativní směrodatná odchylka, která se většinou udává v procentech jako RSD. [16, 17]

6.9.4 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce neboli také mez detekce je nejnížší detekovatelné množství analytu, které je potřeba kvantifikovat jako exaktní hodnotu.

$$LOD = \frac{3 \cdot \delta n \cdot k}{m} \quad (5)$$

LOD je mez detekce vypočítaná ze m směrnice kalibrační křivky jednotlivých standardů, k plochy píku vydělené příslušnou výškou píku a δn výškou šumu na základní linii.

Limit kvantifikace nebo také mez stanovitelnosti je nejnížší množství analytu, které lze danou metodou detekovat a stavit.

$$LOQ = \frac{10 \cdot \delta n \cdot k}{m} \quad (6)$$

LOQ je mez kvantifikace, δn je výška šumu na základní linii, k je plocha píku vydělená příslušnou výškou píku a m je směrnice kalibrační křivky jednotlivých standardů. [17]

6.9.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost probíhá za stejných podmínek měření, provedené jedním analytikem ve stejný čas a v jedné laboratoři. Jedná se o shodu mezi výsledky, které jsou změřeny po sobě.

Opakovatelnost celkových retenčních časů a ploch pík je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka. [16, 17]

6.9.6 Linearita

Linearita je přímková závislost mezi dvěma proměnnými. Jedná se o odezvu analytického signálu a koncentraci analytu a slouží ke kvantitativnímu stanovení ve vzorcích. Pro hodnocení linearity se spíše používá korelační koeficient R , který určuje směr a sílu lineární závislosti.

Pro prokázání linearity se používá druhá mocnina korelačního koeficientu R^2 , která vychází z regresní přímky a určuje nejtěsnější proložení naměřených dat. R^2 musí být větší než 0,99. [7]

Touto metodou lze stanovit neznámé koncentrace ve vzorcích. Jsou připraveny standardní roztoky o známé koncentraci, u kterých se změří signál. Výsledky jsou vyneseny do grafu. Proložení jednotlivých bodů probíhá na základě metody nejmenších čtverců a závislost má nejlépe přímkový charakter.

$$y = ax + b \quad (7)$$

U rovnice přímky se hledá konstanta b , což je úsek na ose y a konstanta a je směrnici přímky. [7]

6.10 Analýza hlavních komponent PCA

Jedná se o nejznámější techniku vícerozměrné analýzy. Hlavní myšlenkou analýzy hlavních komponent (PCA, *Principal Component Analysis*) je snížení rozměrnosti souboru dat sestávajícího z velkého počtu vzájemně souvisejících proměnných. Snížení dat je dosaženo transformací na novou sadu proměnných s co nejmenší ztrátou informací. Během transformace vznikají nové proměnné neboli hlavní komponenty, které slouží pro vizualizace dat a vyhodnocení informací, které z nich plynou. [18]

7 Výsledky a diskuse

Byla vyvinuta metoda pro měření aromatických látek v třtinových rumech pomocí HS-SPME na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí. Byla zvolena vhodná kolona a nastaveny správné podmínky pro měření. Následně byla metoda optimalizována a bylo vybráno vhodnější SPME vlákno. Pro vývoj metody byl vybrán vzorek třtinového rumu, který je běžně cenově dostupný. Na základě získaných dat, respektive identifikovaných aromatických sloučenin, se vybraly standardní látky, které jsou často přítomné v třtinových rumech. Jednalo se o ethyl estery vyšších karboxylových kyselin. Ze standardů se připravily pracovní a zásobní roztoky, které pak byly použity při optimalizaci a následné validaci metody.

Byly vytvořeny dvě metody pro měření. Pro identifikaci aromatických látek v třtinových rumech byla vyvinuta metoda, která je v **tab. 6**, kde jsou sbírána všechna data. Pro optimalizaci SPME a kvantifikaci vzorků byla vytvořena metoda v **tab. 7**, kde se sbíraly jen určené píky standardů.

Vzorky 30 třtinových tmavých rumů a 3 bílých třtinových rumů byly analyzovány vyvinutou a optimalizovanou metodou. Identifikace látek proběhla porovnáním s knihovnou spekter NIST a vybrané analyty byly potvrzeny pomocí osmi standardů. Kvantifikace byla provedena pomocí kalibračních křivek, které se pohybovaly v rozsahu koncentrací od 0,9 do 43 µg/ml.

7.1 Optimalizace experimentálních podmínek

Optimalizace metody byla prováděna na čtyřech různých kolonách. Nejprve se musela nastavit délka měření, teplotní programy, průtok a mód nástřiku. Testoval se jak splitless mód při různých dobách od 1 až po 3 min, tak i split v poměru 10:1. Jako nejvhodnější typ nástřiku byl splitless, který trval 2 minuty, ale vlákno bylo necháno ve stroji tři minuty, aby došlo k veškeré desorpci všech analytů. Rozhodování mezi split a splitless módem bylo na základě separace píků na příslušných chromatografických kolonách.

Bylo také odzkoušeno přímé napojení kolony do hmotnostního detektoru, ale jednotlivé analyty byly eluovány z kolony mnohem dříve, píky byly od sebe špatně odseparované a bylo horší rozlišení. Proto byl použit transfer liner, přes který byla kolona připojena do detektoru.

Bylo potřeba nastavit nejvhodnější podmínky pro extrakci aromatických látek ve třtinových rumech a jejich zakoncentrování ze vzorku na příslušné SPME vlákno. Musel být vybrán vhodný způsob vzorkování. Byla odzkoušena metoda přímé extrakce a headspace. U headspace extrakce byly jednotlivé analyty od sebe lépe separované a píky měly dobré rozlišení a nechvostovaly jako u přímé extrakce. Proto na všechny analýzy bylo používáno headspace vzorkování. Před samotnou absorpcí látek na vlákno docházelo k vytemperování vzorku, které probíhalo po dobu 10 min při třepání 500 rpm a poté bylo do vzorku vloženo vlákno.

Dále bylo vybrané vhodné vlákno pro měření vzorků, u kterého byl optimalizován čas a teplota extrakce. U obou typů vláken byly optimalizované stejné podmínky. Na základě lepších sorpčních vlastností, bylo vybráno vhodnější vlákno. Pro analýzu byly také rozhodující chromatografické podmínky. Před každou sadou měření byl nejprve změřen blank čistého vlákna. Výsledky jednotlivých experimentálních podmínek jsou uvedeny níže.

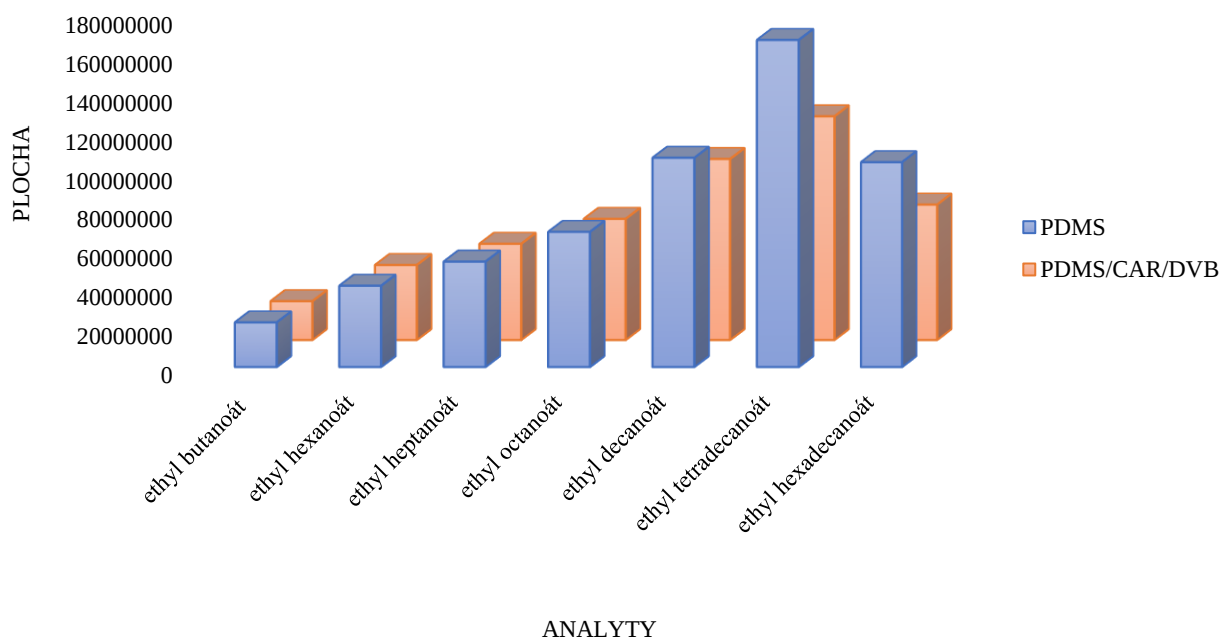
7.1.1 Volba typu SPME vlákna

Existuje mnoho různých typů SPME vláken, které lze použít na extrakci těkavých aromatických sloučenin. Volba správného typu vlákna ovlivňuje spoustu faktorů, jako jsou selektivita, reprodukovatelnost výsledků nebo účinnost extrakce. Jaké použít SPME vlákno na měření aromatických látek ve třtinových rumech, bylo inspirováno ve vědeckých člancích [19, 20, 21], a také záleželo na dostupnosti vláken.

Belmonte-Sanchez a spol. [20] ve svém článku používali PDMS vlákno, kterým porovnávali korelaci ethyl acetátu s ethyl estery karboxylových kyselin v různě starých. PDMS vlákno použili Pino a spol. [19] pro identifikaci 184 těkavých sloučenin v různě starých rumech. Da Porto a spol. [21] měřili těkavé látky v těžkých dominikánských rumech také pomocí PDMS vlákna.

Pro tuto diplomovou práci byla odzkoušena vlákna 100 μm PDMS a 50/30 μm DVB/CAR/PDMS. PDMS vlákno je nepolární a smíšené vlákno je polární. Výsledky obou vláken jsou téměř srovnatelné. Vycházejí z dat, která byla naměřena při opakovatelnosti a vynesena do grafu na **obr. 11**. Jsou zde podobné sorpční vlastnosti jednotlivých standardů, ale ethyl decanoát, ethyl hexadecanoát a nejvíce ethyl tetradecanoát se lépe sorbovaly na PDMS vlákno. Z toho vyplývá, že vhodnější vlákno pro extrakci látek je nepolární PDMS, tak jak bylo zmiňované v člancích od Belmonte-Sanchez a spol., Pino a spol. a Da Porto a spol.

Volba typu vlákna

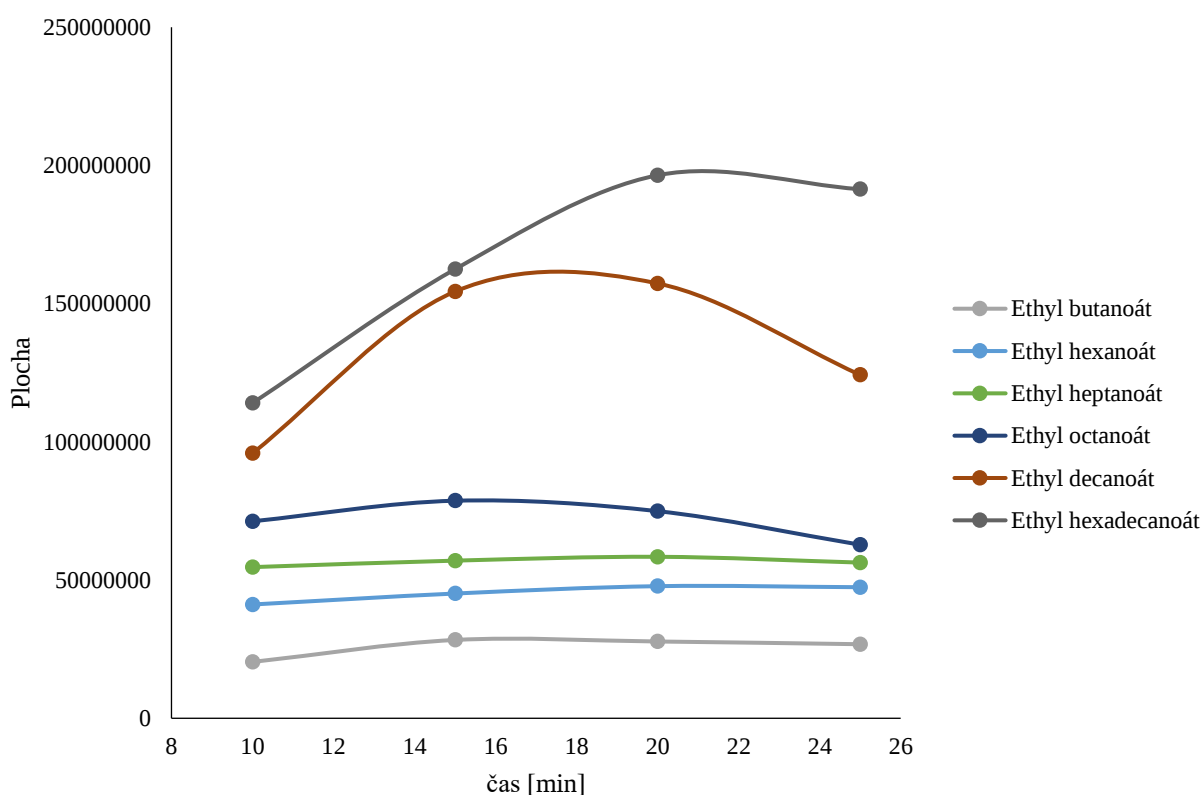


Obr. 11: Srovnání separačních schopností obou vláken

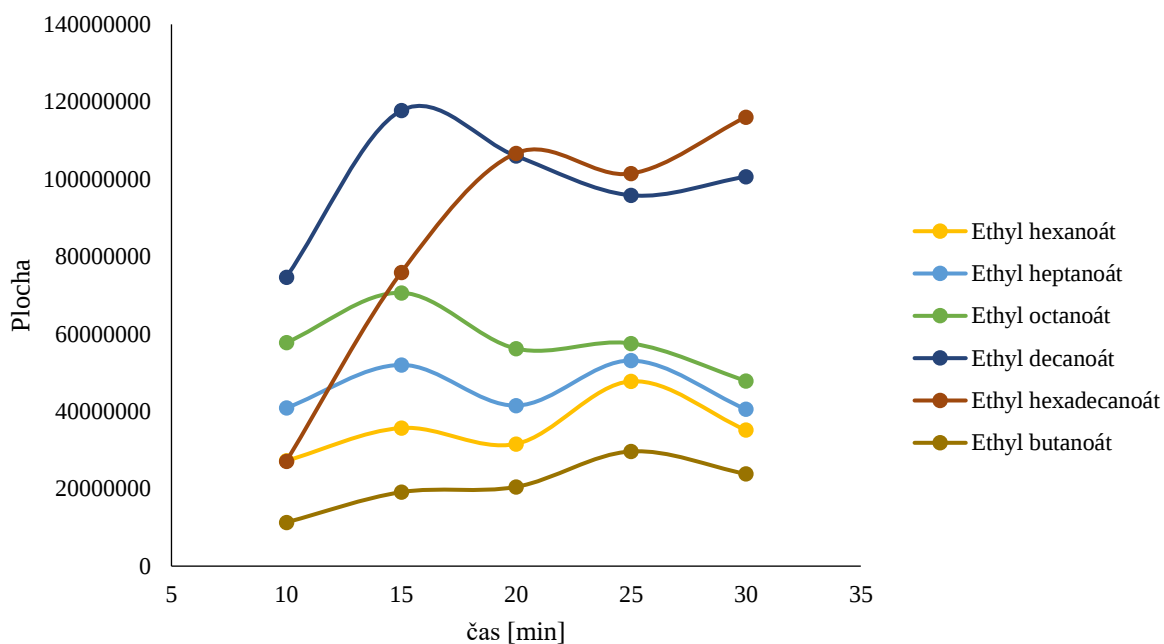
7.1.2 Volba extrakční doby

Důležitým faktorem je extrakční doba, při které dochází k rovnováze mezi jednotlivými analyty a povrchem vlákna. Absorpční profily byly sledovány při pěti různých časech. Zvolenými časy bylo 10, 15, 20, 25 a 30 minut. Sledovala se změna velikosti plochy píků na chromatogramu za určený čas.

Z výsledků vyplývá, že délka extrakce roste s délkou uhlíkatého řetězce u vyšších ethyl esterů. Jako optimální doba extrakce bylo zvoleno 15 min, protože u nižších ethyl esterů docházelo k rovnováze a poté nebylo extrahováno vyšší množství. Musel vzniknout nějaký kompromis pro optimální čas. Srovnání různé délky extrakce je na **obr. 12** pro PDMS vlákno a na **obr. 13** pro smíšené vlákno. Na **obr. 13** je vidět lépe dosažení rovnováhy při 15 min a poté dochází k poklesu analytů. Na obrázcích níže chybí ethyl tetradecanoát, který byl objednan později a byl využit až při validaci metody.



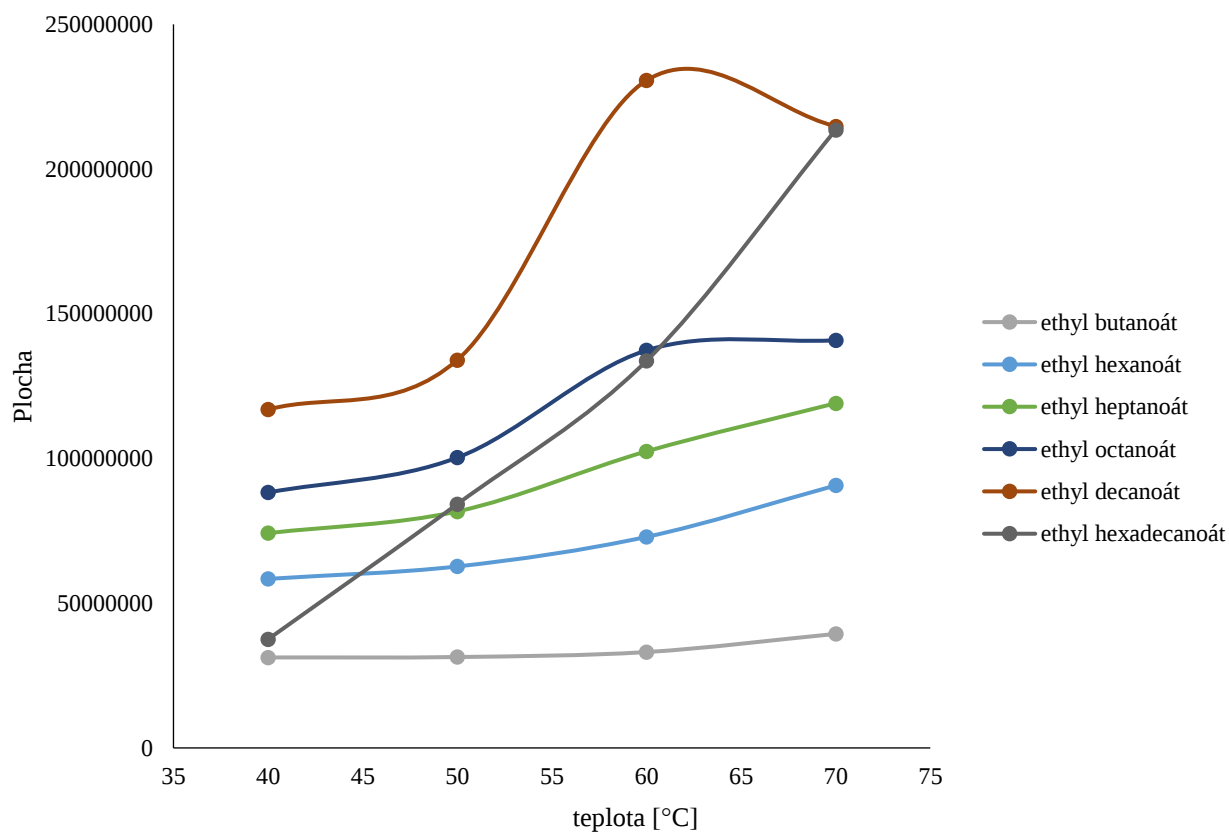
Obr. 12: Optimalizace extrakční doby pro PDMS vlákno



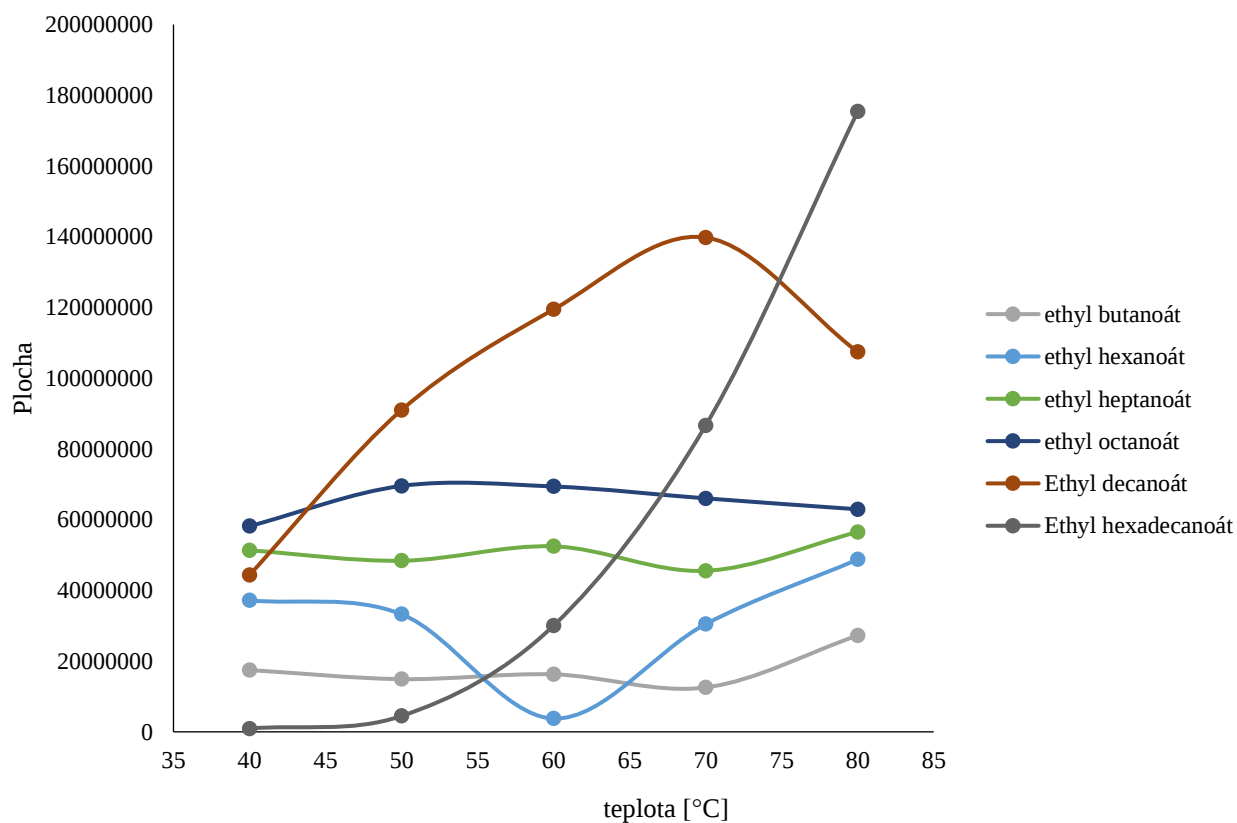
Obr. 13: Optimalizace extrakční doby pro DVB/CAR/PDMS vlákno

7.1.3 Volba teploty extrakce

Dalším důležitým faktorem je teplota extrakce. S rostoucí teplotou se zvyšuje proces extrakce, ale zároveň se také snižuje koncentrace jednotlivých analytů. Byly testovány čtyři různé teploty 40, 50, 60 a 70 °C. Vyšší teploty již nemohly být použity, protože ethanol má bod varu okolo 78 °C a docházelo by ke zkreslení výsledků. Nejlepší volbou bylo 60 °C, protože při vyšší teplotě se vyšší ethyl estery karboxylových kyselin již méně sorbovaly, což jde vidět na **obr. 14**. Na **obr. 15** je také optimalizace extrakční teploty pro smíšené vlákno, kde teplota hodně kolísala i u nižších ethyl esterů. Na obrázcích níže chybí ethyl tetradecanoát, který byl objednan později a byl využit až při validaci metody.



Obr. 14: Optimalizace extrakční teploty pro PDSM vlákno



Obr. 15: Optimalizace extrakční teploty pro DVB/CAR/PDMS vlákno

7.1.4 Volba GC kolony

Pino a spol. [19] na měření těkavých látek ve starých rumech, používali kolonu SPB-5 pomocí FID (*Flame Ionization Detection*) detekce. Belmonte-Sanchez a spol. [20] prováděli svoje měření na koloně VF-5ms, kde stanovovali těkavé a polotěkavé sloučeniny s širokým rozsahem polarit u 33 komerčních rumů. Ming-Jun a spol. [22] naopak použili kolonu DB-WAX, pomocí níž identifikovali okolo 120 sloučeniny, jako jsou alkoholy, estery, aldehydy, ketony, fenoly, kyseliny a další sloučeniny. Da Porto a spol. použili podobný typ kolony, Supelcowax, kterou analyzovali těkavé sloučeniny v těžkých dominikánských rumech [21].

Porovnáním jednotlivých chromatografických záznamů z kolon VF-5ms, VF-WAXms, HP-5ms a Rxi-624SilMS byla vybrána vhodná kolona pro měření. Nejlepší rozlišení a dobře odseparované píky od sebe měla kolona VF-5ms, která má mírně vyšší polaritu pro aromatické sloučeniny, proto byla vybrána pro analýzu třtinových rumů.

7.3 Validace metody

Po vyvinutí a optimalizování úplně nové metody, je potřeba provést její validaci. Ta se provádí, aby se výzkumník ujistil, že metoda je vhodná pro daný účel a dostatečně robustní, aby byl jiný pracovník schopen podle zadaného postupu stanovit dané látky.

Při validaci metody byla nejprve provedena opakovatelnost nástřiku zásobního roztoku standardů. Sledovanými parametry byl retenční čas a plocha jednotlivých analytů. Hodnota RSD retenčních časů nepřesáhla 1 %, což svědčí o správném nastavení separačních podmínek vybrané kapilární kolony. Výsledné plochy analytů se trochu liší, protože RSD se převážně pohybuje okolo 20 %. Mohlo to být způsobeno tím, že vlákno je velmi citlivé na okolní prostředí a může kolísat sorpce a desorpce vlákna v injektoru, i když vše probíhalo za stejných podmínek. Data z opakovatelnosti PDMS vlákna jsou uvedena v **tab. 8**.

Pro porovnání byla provedena také opakovatelnost smíšeného vlákna, kde jednotlivé výsledky jsou podobné jako u PDMS vlákna. Výsledky jsou uvedeny v **tab. 9**. Pro další měření pak bylo používáno pouze vlákno PDMS. Rozdíl mezi oběma vlákny je na **obr. 11**. Z RSD hodnot pro všechny analyty lze usuzovat, že metoda HS-SPME vykazuje opakovatelnost výsledků.

Tab. 8: Opakovatelnost PDMS vlákna

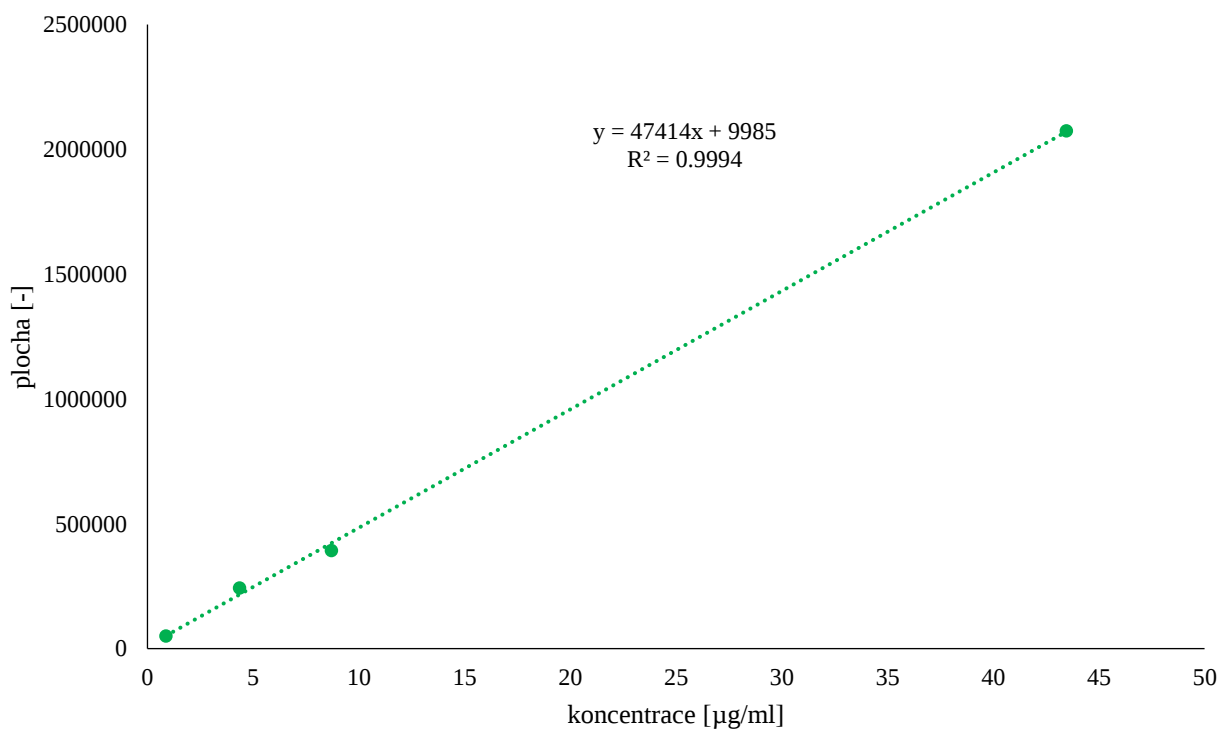
analyt	průměr		směrodatná odchylka		RSD [%]	
	r_t [min]	plocha	r_t [min]	plocha	r_t	plocha
ethyl butanoát	14,155	22887685,8	0,078	4226444	0,55	18,47
ethyl hexanoát	20,663	41680848	0,012	7855121	0,06	18,85
ethyl heptanoát	22,906	54067892,7	0,011	10703488	0,05	19,80
ethyl octanoát	24,598	69323942,3	0,014	15179788	0,06	21,90
ethyl decanoát	26,804	107406424	0,012	22398722	0,05	20,85
ethyl tetradecanoát	30,354	167990282	0,019	23293893	0,06	13,87
ethyl hexadecanoát	32,831	105150444	0,020	14761611	0,06	14,04

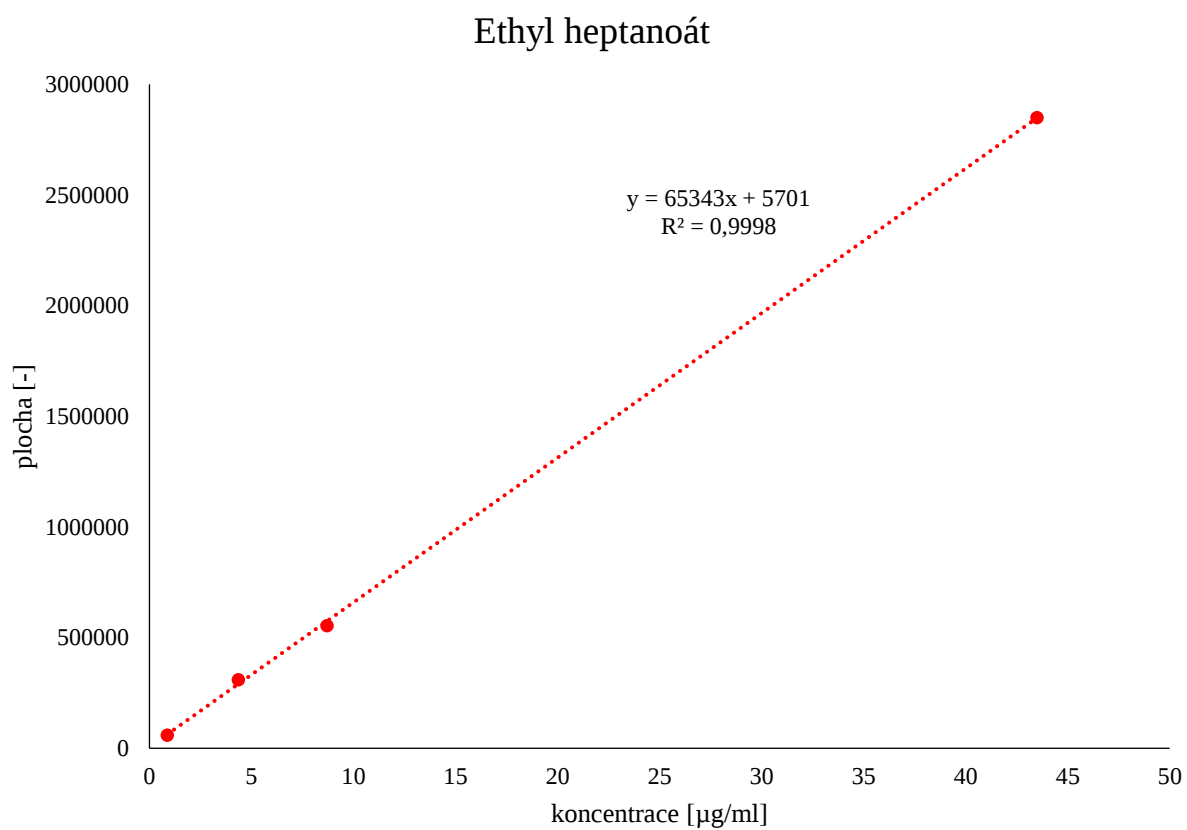
Tab. 9: Opakovatelnost DVB/CAR/PDMS vlákna

analyt	průměr		směrodatná odchylka		RSD [%]	
	r_t [min]	plocha	r_t [min]	plocha	r_t	plocha
ethyl butanoát	14,306	19911447	0,192	6500677	1,34	32,65
ethyl hexanoát	20,644	38469428	0,009	10977079	0,04	28,53
ethyl heptanoát	22,896	49339436	0,021	14352732	0,09	29,09
ethyl octanoát	24,586	62154703	0,013	17467357	0,05	28,10
ethyl decanoát	26,803	92915458	0,014	17307302	0,05	18,63
ethyl tetradecanoát	30,338	114868064	0,021	8828483	0,07	7,69
ethyl hexadecanoát	32,816	69487674	0,028	3786551	0,08	5,45

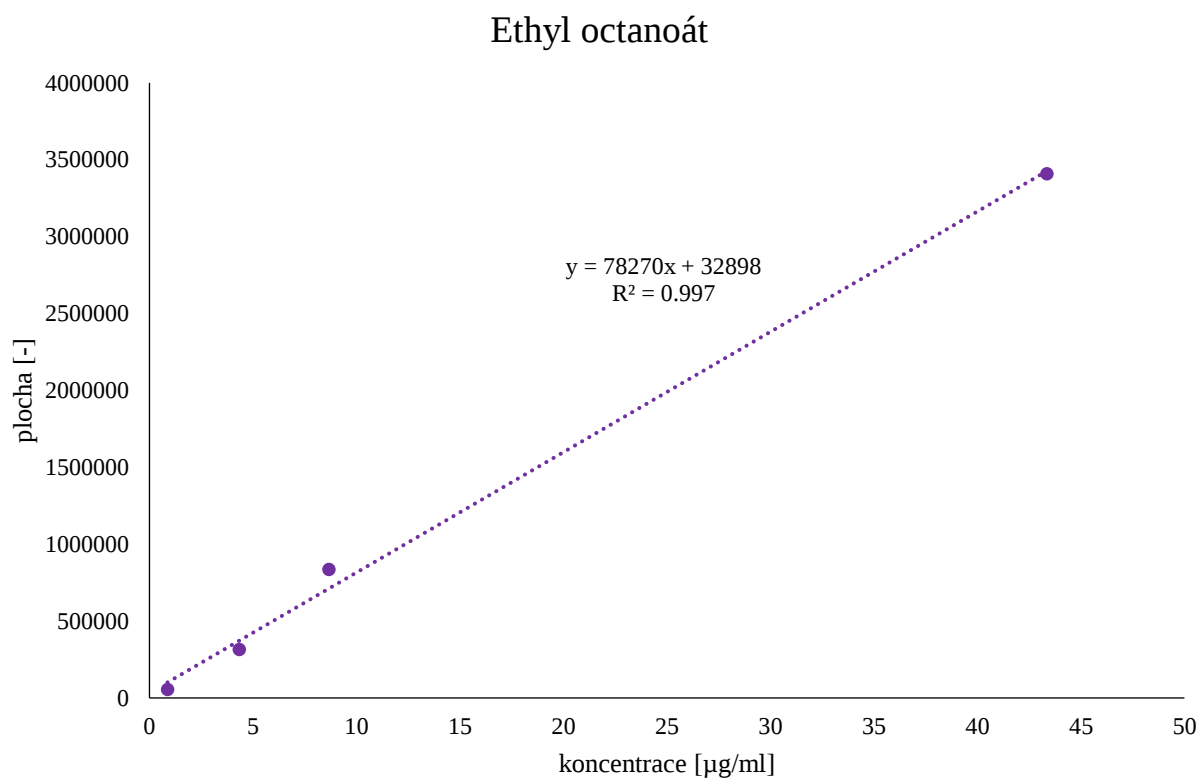
Součástí validace je také linearita, která slouží ke kvantifikaci zvolených vzorků. Linearita se skládá ze čtyř bodové kalibrační křivky vybraných standardů. Mezi jednotlivé standardy patřily ethyl hexanoát, ethyl heptanoát, ethyl octanoát, ethyl decanoát, ethyl tetradecanoát a ethyl hexadecanoát. Rozsah koncentrací se pohyboval od 0,9 do 43 $\mu\text{g/ml}$. Ze zásobního roztoku, kde standardy měli koncentraci okolo 430 $\mu\text{g/ml}$, se ředily zásobní roztoky na příslušné hladiny koncentrací. Jednotlivé kalibrační křivky analytů spolu s rovnicemi přímky a druhou mocninou korelačního koeficientu jsou na **obr. 16 – 21**. Z příslušných kalibračních křivek byly vypočítány mez detekce a stanovitelnosti, které jsou uvedeny v **tab. 10**. Pro ethyl butanoát nebyla sestavena kalibrační křivka, protože nebyl v nízkých koncentracích dobře odseparován od ostatních analytů.

Ethyl hexanoát

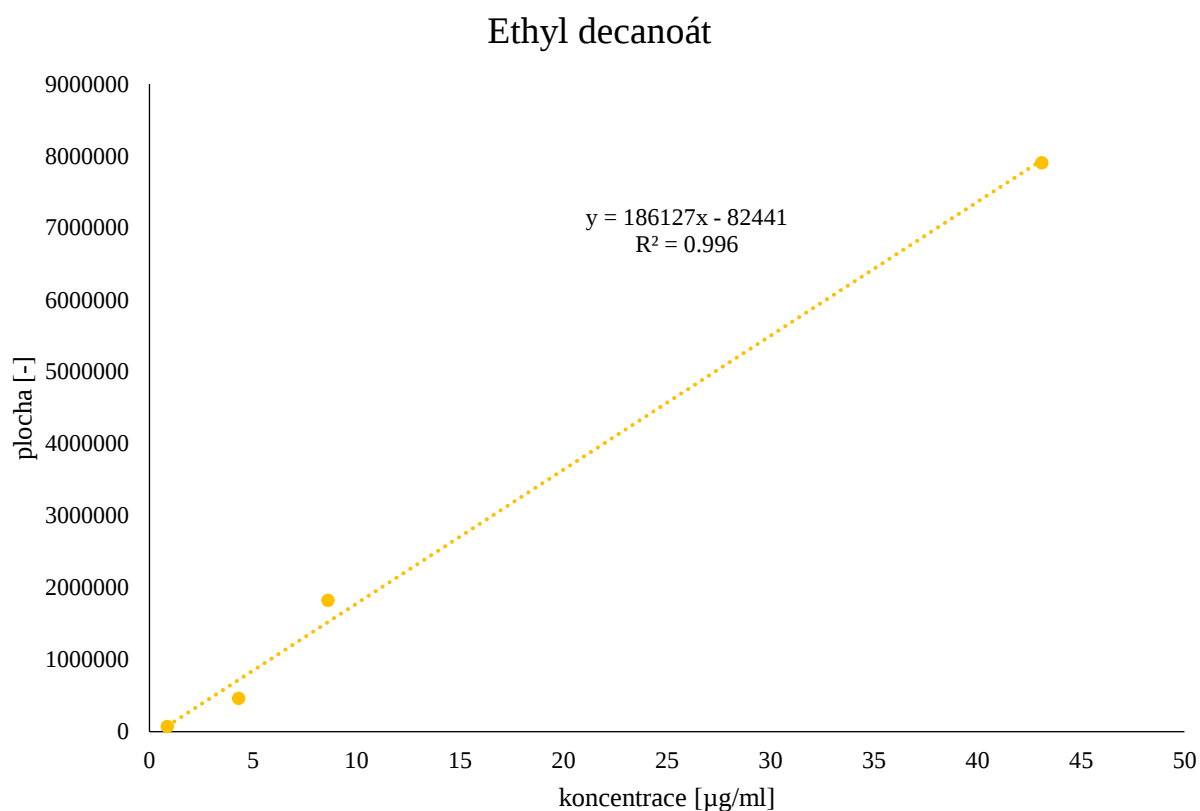
**Obr. 16:** Kalibrační křivka ethyl hexanoátu



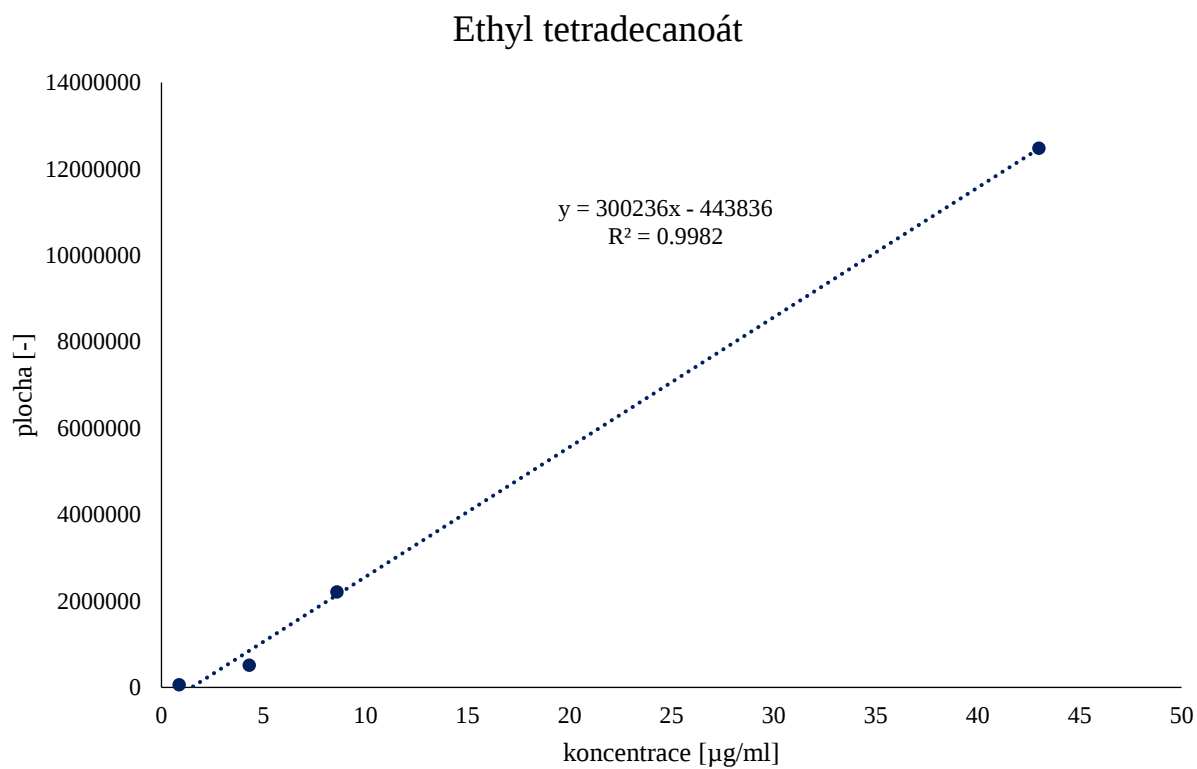
Obr. 17: Kalibrační křivka ethyl heptanoátu



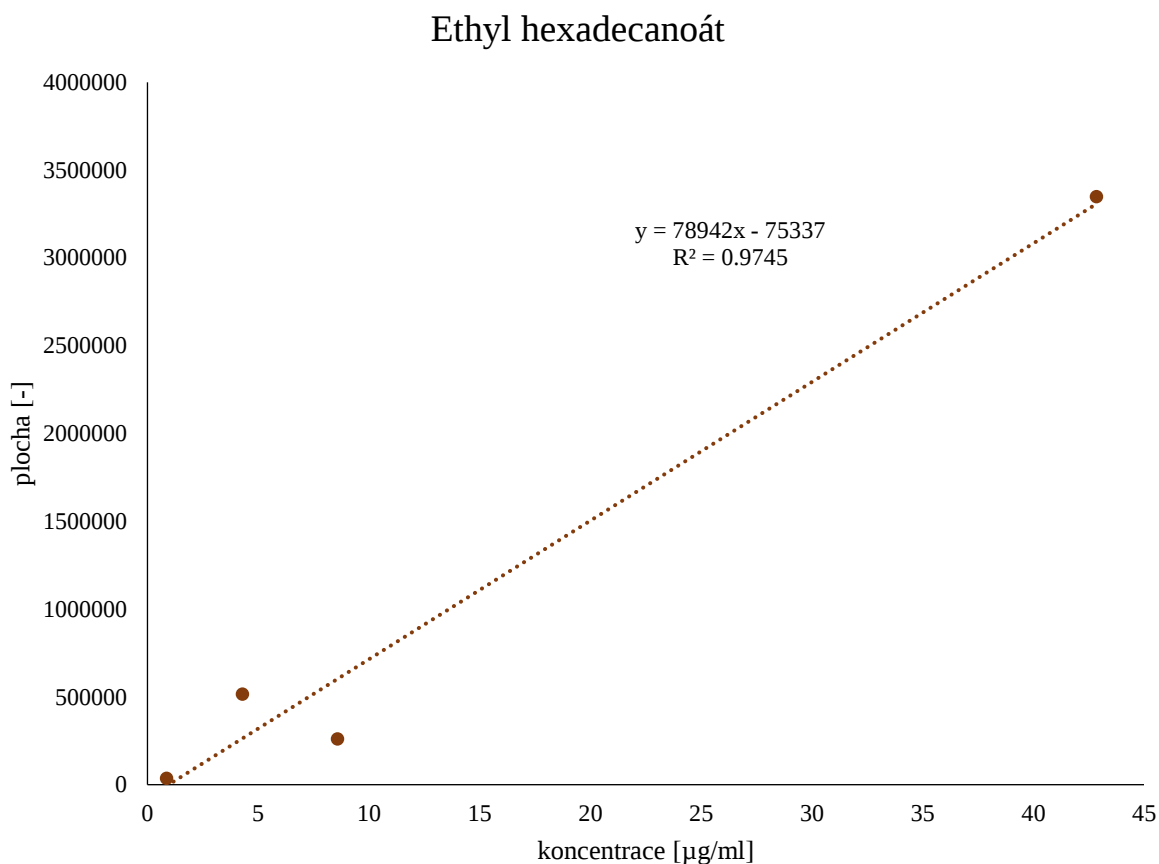
Obr. 18: Kalibrační křivka ethyl octanoátu



Obr. 19: Kalibrační křivka ethyl decanoátu



Obr. 20: Kalibrační křivka ethyl tetradecanoátu



Obr. 21: Kalibrační křivka ethyl hexadecanoátu

Tab. 10: Limit detekce a kvantifikace jednotlivých standardů

standard	RSD ploch [%]	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
ethyl hexanoát	18,85	0,10	0,20
ethyl heptanoát	19,80	0,02	0,07
ethyl octanoát	21,90	0,02	0,05
ethyl decanoát	20,85	0,02	0,05
ethyl tetradecanoát	13,87	0,02	0,06
ethyl hexadecanoát	14,04	0,10	0,40

V **příloze 1** je chromatogram zásobního roztoku standardů měřený metodou v SIM módu. Dále v **příloze 2, 3, 4, 5, 6 a 7** jsou spektra jednotlivých standardů.

7.4 Analýza vzorků

Bylo změřeno 30 různých druhů třtinových rumů z odlišných zemí původu, a také s rozdílnou dobou zrání v dřevěných sudech. Dále byly analyzovány tři vzorky bílých třtinových rumů, zda se svým složením nějak liší od tmavých rumů.

Hlavní komponenty, které byly identifikovány byly ethyl estery nižších i vyšších karboxylových kyselin. Identifikace probíhala na základě porovnání s NIST knihovnou. V tabulkách jsou uvedeny látky se 70 % shodou. Byla zvolena tato nízká pravděpodobnost, aby bylo ukázáno, jaké látky se mohou v třtinových rumech nacházet. Když by byla použita

pravděpodobnost nad 90 %, téměř žádné sloučeniny by nebyly uvedené. Identifikace také byla potvrzena pomocí osmi standardů, které byly identifikovány při vývoji v jednom vzorku rumu a dále se pak nacházely i v ostatních vzorcích.

V **tab. 11a, 11b** jsou uvedeny všechny látky, které se běžně vyskytovaly ve vzorcích. V **tab. 12** jsou uvedeny další sloučeniny, které byly identifikovány, ale nenacházeli se u všech třiceti vzorků. V **tab. 13** jsou poté látky, které byly pouze v uvedených vzorcích a v ostatních nejsou přítomny. Je zajímavé, že například ve vzorku Guajiro, byl identifikován eukalyptol s 94 % shodou s NIST knihovnou. Jednalo se o medový rum. I když nebyla u všech vzorků stanovena senzorická analýza na čich, tento vzorek opravdu po mentolu voněl, ze začátku připomínal i medovinu.

V **tab. 14** jsou změřená data bílých třtinových rumů a uvedené látky, které v nich byli identifikovány. V **tab. 15** jsou pak dále uvedené sloučeniny, které byly identifikované pouze u vzorku Havana club navíc než u ostatních bílých rumů. Výrazné rozdíly bílých rumů od hnědých třtinových rumů nejsou. Nacházejí se v nich podobné sloučeniny. Bílé romy procházejí stejnými procesy výroby jako romy tmavé, pouze po vyzrání v dřevěných sudech jsou romy odbarveny několika násobnou filtrací přes uhlíkové kameny. Výskyt některých vyšších esterů karboxylových kyselin v obou druzích rumů, v tmavých a bílých, může být způsoben uvolněním těchto látek ze dřeva při zrání.

Jako poslední vzorek byl analyzovaný český rum Božkov Tuzemák. V **tab. 16** jsou uvedené látky, které byly identifikovány. Sloučeniny jsou identické jako u třtinových rumů. Může to být tím, že oba druhy různých rumů jsou vyrobeny z melasy a tyto látky se mohou uvolňovat právě z ní. Melasa u rumu českého je vyrobena z cukrové řepy a analyzované romy jsou vyrobeny z melasy z cukrové třtiny. Chromatogram tohoto vzorku je v **příloze 8**. Chromatogram rumu Božkov Tuzemák je porovnán s Blankem, aby bylo vidět, že se nejedná o ethyl estery, které by byly uvolněny z vlákna, ale nachází se přímo ve vzorku. Ethyl acetát je také přítomný, ale je součástí ethanolu, který v přiblíženém chromatogramu nelze dobře vidět (**příloha 8**).

Pro ukázkou jsou v **příloze 9 – 14** chromatogramy některých vzorků třtinových rumů.

Tab. 11a: Přehled identifikovaných analytů u vzorků třtinových rumů 1 – 16

vzorek		země původu	doba zrání	Ethyl acetát		1,1- diethoxyethan		Isopentyl alkohol		Isoamyl acetát		Ethyl butanoát		Ethyl hexanoát		Ethyl octanoát		Ethyl decanoát		Ethyl dodecanoát		Ethyl tetradecanoát		Ethyl hexadecanoát	
				identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*	
1	Hefron	Panama	5	+	NIST/85 %	+	NIST/88 %	-	-	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
2	Malteco	Panama	5	+	NIST/90 %	+	NIST/96 %	+	NIST/72 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
3	Serum Ancom	Panama	10	+	NIST/95 %	+	NIST/94 %	+	NIST/70 %	+	NIST/81 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
4	Coman Dante	Panama	18	+	NIST/97 %	+	NIST/76 %	-	-	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
5	Naud	Panama	15	+	NIST/97 %	+	NIST/94 %	-	-	+	NIST/74 %	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
6	Bracelo imperial	Dominikánská republika	8	+	NIST/96 %	+	NIST/96 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
7	Ron Tabú	Dominikánská republika	3-4	+	NIST/97 %	+	NIST/87 %	-	-	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
8	Matusalem	Dominikánská republika	15	+	NIST/83 %	+	NIST/95 %	-	-	+	NIST/76 %	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	-	-	+	STD	+	STD
9	Black stamp	Jamajka	5	+	NIST/90 %	+	NIST/96 %	+	NIST/70 %	+	NIST/80 %	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
10	Captain morgan dark	Jamajka	2-7	+	NIST/96 %	+	NIST/95 %	+	NIST/73 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
11	Pampero aniversario	Venezuela	4	+	NIST/90 %	+	NIST/95 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
12	Diplomatico	Venezuela	8	+	NIST/96 %	+	NIST/96 %	+	NIST/75 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
13	Pampero especial	Venezuela	5-6	+	NIST/97 %	+	NIST/95 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
14	Key spiced gold	Karibik	4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
15	Republica espresso	Karibik	8	+	NIST/94 %	-	-	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
16	Republica honey	Karibik	8	+	NIST/93 %	-	-	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD

+...identifikováno

-...neidentifikováno

STD – porovnáno se standardem, NIST – porovnáno s knihovnou spekter

Tab. 11b: Přehled identifikovaných analytů u vzorků třtinových rumů 17 – 30

vzorek		země původu	doba zrání	Ethyl acetát		1,1- diethoxyethan		Isopentyl alkohol		Isoamyl acetát		Ethyl butanoát		Ethyl hexanoát		Ethyl octanoát		Ethyl decanoát		Ethyl dodecanoát		Ethyl tetradecanoát		Ethyl hexadecanoát	
				identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*	
17	Bumbu	Barbados	18	-	-	+	NIST/96 %	-	-	+	NIST/90 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	-	-	+	STD	+	STD
18	Mount Gay	Barbados	3-7	+	NIST/96 %	+	NIST/96 %	+	NIST/80 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
19	Blue mauricius	Mauricius	15	-	-	+	NIST/92 %	+	NIST/72 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
20	Lazy dodo	Mauricius	12	+	NIST/97 %	+	NIST/96 %	-	-	+	NIST/75 %	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
21	Guajiro	Kanárské ostrovy	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/78 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
22	Don papa	Filipíny	7	+	NIST/96 %	+	NIST/94 %	+	NIST/76 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
23	A. H. RIISE	Svatý Tomáš	20	+	NIST/93 %	+	NIST/78 %	-	-	+	NIST/76 %	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
24	Pyrat	Anquilla	>15	+	NIST/92 %	+	NIST/91 %	+	NIST/70 %	+	NIST/74 %	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
25	Ron Zacapa	Guatemala	23	+	NIST/97 %	+	NIST/96 %	+	NIST/76 %	+	NIST/79 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
26	Savoy dark rum	Bulharsko	-	+	NIST/96 %	+	NIST/90 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
27	Legendario	Kuba	7	+	NIST/85 %	+	NIST/95 %	+	NIST/74 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
28	Professore	Panama, Jamajka, Nikaragua, Dominikánská republika	-	+	NIST/90 %	+	NIST/93 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
29	El clasico elixir	Dominikánská rep., Trinidad, Barbados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
30	Republika	Nikaragua, Dominikánský rep., Barbados, Jamaika	8	+	NIST/83 %	+	NIST/95 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD

+...identifikováno

-...neidentifikováno

STD – porovnáno se standardem, NIST – porovnáno s knihovnou spekter

Tab. 12: Přehled identifikovaných analytů ve vzorcích

vzorek		země původu	doba zrání	Isobutanol		Ethyl propanoát		Ethyl pentanoát		Ethyl heptanoát		Diethyl sukcinát		Ethyl nonanoát		Isopentyl decanoát	
				identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*	
1	Blue mauricius	Mauricius	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/84 %
2	Bracelo imperial	Dominikánská republika	8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/80 %	-	-	-	-
3	Legendario	Kuba	7	+	NIST/90 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/79 %
4	Republika	Nikaragua, Dominikánský rep., Barbados, Jamajka	8	-	-	-	-	+	NIST/73 %	+	NIST/84 %	-	-	-	-	-	-
5	Black stamp	Jamajka	5	-	-	+	NIST/95 %	+	NIST/93 %	+	NIST/88 %	-	-	-	-	-	-
6	Ron Zacapa	Guatemala	23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/92 %	-	-	-	-
7	Pyrat	Anquilla	>15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/85 %	+	NIST/74 %	-	-
8	Captain morgan dark	Jamajka	2-7	+	NIST/75 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/81 %
9	Pampero aniversario	Venezuela	4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/88 %	-	-	-	-
10	Naud	Panama	15	-	-	-	-	+	NIST/79 %	+	NIST/72 %	+	NIST/87 %	+	NIST/80 %	-	-
11	Lazy dodo	Mauricius	12	+	NIST/84 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Bumbu	Barbados	15	-	-	+	NIST/95 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	A. H. RIISE	Svatý Tomáš	20	-	-	+	NIST/90 %	+	NIST/86 %	+	NIST/84 %	-	-	-	-	-	-
14	Republica espresso	Karibik	8	-	-	-	-	+	NIST/91 %	+	NIST/89 %	-	-	-	-	-	-
15	Professore	Panama, Jamajka, Nikaragua, Dominikánská republika	-	-	-	-	-	+	NIST/86 %	+	NIST/90 %	-	-	+	NIST/78 %	-	-
16	Mount Gay	Barbados	3-7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/75 %	-	-	-	-
17	Don papa	Filipíny	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/88 %
18	Diplomatico	Venezuela	8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NIST/84 %	+	NIST/78 %	+	NIST/85 %
19	Republica honey	Karibik	8	-	-	-	-	+	NIST/90 %	+	NIST/83 %	-	-	-	-	+	NIST/83 %
20	Savoy dark rum	Bulharsko	-	-	-	+	NIST/95 %	-	-	+	NIST/95 %	-	-	-	-	+	NIST/73 %

+...identifikováno

-...neidentifikováno

STD – porovnáno se standardem, NIST – porovnáno s knihovnou spekter

Tab. 13: Identifikované analyty pouze v konkrétních vzorcích

vzorek		země původu	dobu zrání	další neznámé identifikované látky pomocí NIST knihovny			
1	Blue mauricius	Mauricius	15	Isobutyl acetát, 78 %	isoamyl hexanoát, 75 %	propyl octanoát, 76 %	propyl decanoát, 79 %
2	Bracelo imperial	Dominikánská republika	8	1,1-diethoxy-3-methyl butan, 76 %			
3	Hefron	Panama	5	1,1-diethoxybutan, 76 %		1,1-diethoxy-3-methyl butan, 86 %	
4	Legendario	Kuba	7	1,1,3-triethoxypropan, 92 %			
5	Republika	Nikaragua, Dominikánský rep., Barbados, Jamajka	8	1,1-diethoxy-3-methyl butan, 71 %			
6	Malteco	Panama	5	isopropyl hexadecanoát, 71 %			
7	Pyrat	Anquilla	>15	1,1-diethoxydecan, 88 %			
8	Bumbu	Barbados	18	hexyl acetát, 89 %			
9	Professore	Panama, Jamajka, Nikaragua, Dominikánská republika	-	1,1-diethoxypropan, 79 %			
10	Don papa	Filipíny	7	2-heptanon, 73 %		octanal, 88 %	
11	Guajiro	Kanárské ostrovy	-	eukalyptol, 94 %			
12	Republica honey	Karibik	8	2,2-diethoxyethylbenzen, 97 %			

Tab. 14: Přehled identifikovaných analytů v bílých třtinových rumech

vzorek		země původu	doba zrání	Ethyl acetát		1,1- diethoxyethan		Isopentyl alkohol		Ethyl hexanoát		Ethyl octanoát		Ethyl decanoát		Ethyl dodecanoát		Ethyl tetradecanoát		Ethyl hexadecanoát	
				identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*		identifikace*	
1	Bacardi	Portoriko	1-2	-	-	+	NIST/93 %	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	-	-	+	STD	+	STD
2	Havana club	Kuba	3	+	NIST/97 %	+	NIST/91 %	+	NIST/89 %	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD
3	Republika bílá	Dominikánská rep., Guayna. Jamajka, Trinidad	-	+	NIST/74 %	-	-	-	-	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD	+	STD

+...identifikováno

-...neidentifikováno

STD – porovnáno se standardem, NIST – porovnáno s knihovnou spekter

Tab. 15: Další identifikované analyty ve vzorku Havana club

vzorek	země původu	dobu zrání	další neznámé identifikované látky pomocí NIST knihovny		
Havana club	Kuba	3	isobutanol, 97 %	isobutyl decanoát, 73 %	isopentyl decanoát, 84 %

Tab. 16: Identifikované analyty ve vzorku rum Božkov Tuzemák

vzorek	země původu	dobu zrání	další neznámé identifikované látky pomocí NIST knihovny					
Božkov Tuzemák	ČR	0	ethyl acetát, 97 %	ethyl propanoát, 83%	ethyl butanoát, 93%	ethyl hexanoát, 61 %	ethyl octanoát, 83 %	ethyl decanoát, 80 %

7.5 Kvantifikace vybraných analytů

Kvantifikace vybraných analytů ve všech vzorcích probíhala pomocí čtyř bodových kalibračních křivek. Stanovovalo se pouze šest ethyl esterů vyšších karboxylových kyselin. Ethyl dodecanoát nebyl stanoven, protože standardní roztok přišel až po optimalizaci metody a sloužil pouze k identifikaci příslušného analytu ve vzorcích a k ověření, že se jedná o správnou látku.

V **tab. 17a, 17b** jsou uvedené koncentrace vybraných standardů v 30 vzorcích třtinových rumů. V **tab. 18** jsou kvantifikované analyty u tří bílých rumů. Nejmenší zastoupení bylo ethyl heptanoátu, kde se v některých vzorcích obsah pohybuje i pod limitem kvantifikace. V některých vzorcích jsou velké obsahy ethyl octanoátu a ethyl decanoátu, například v rumech pocházejících z Panamy, Jamajky, dále také rupy Diplomatico, Blue mauricius, Don papa, Pyrat, Ron zacapa nebo Savoy dark rum, který je z Bulharska.

Tab. 17a: Koncentrace vybraných analytů u vzorků 1 – 16

vzorek		země původu	dobazrání	ethyl hexa- noát [μg/ml]	ethyl hepta- noát [μg/ml]	ethyl octa- noát [μg/ml]	ethyl deca- noát [μg/ml]	ethyl tetradecanoát [μg/ml]	ethyl hexa- decanoát [μg/ml]
1	Hefron	Panama	5	0,47	0,02	3,51	12,30	1,77	3,76
2	Malteco	Panama	5	0,56	<0,07	5,61	15,61	1,61	2,45
3	Serum Ancom	Panama	10	1,24	0,11	11,12	20,37	2,11	1,99
4	Coman Dante	Panama	18	1,46	0,13	13,02	31,49	1,86	6,91
5	Naud	Panama	15	4,13	0,40	35,77	80,93	2,45	3,97
6	Bracelo imperial	Dominikánská republika	8	1,94	<0,07	5,84	9,53	1,57	2,05
7	Ron Tabú	Dominikánská republika	3-4	1,39	0,09	5,22	17,37	3,35	8,80
8	Matusalem	Dominikánská republika	15	0,91	<0,07	4,59	7,04	1,83	7,41
9	Black stamp	Jamajka	5	25,51	2,54	12,04	28,77	2,70	17,68
10	Captain morgan dark	Jamajka	2-7	2,92	0,12	27,63	64,68	2,45	27,03
11	Pampero aniversario	Venezuela	4	0,94	<0,07	1,15	4,35	2,76	11,45
12	Diplomatico	Venezuela	8	3,27	0,10	21,55	58,18	2,81	19,98
13	Pampero especial	Venezuela	5-6	0,78	<0,07	1,90	4,74	1,96	6,10
14	Key spiced gold	Karibik	4	<0,2	0,09	0,30	2,15	1,51	1,60
15	Republica espresso	Karibik	8	6,59	0,67	7,97	18,84	2,34	10,26
16	Republica honey	Karibik	8	4,45	0,41	6,05	31,74	2,40	9,48

Tab. 17b: Koncentrace vybraných analytů u vzorků 17 – 30

vzorek		země původu	dobu zrání	ethyl hexanoát [µg/ml]	ethyl hepta- noát [µg/ml]	ethyl octa- noát [µg/ml]	ethyl deca- noát [µg/ml]	ethyl tetra- decanoát [µg/ml]	ethyl hexa- decanoát [µg/ml]
17	Bumbu	Barbados	18	2,42	2,37	0,33	0,54	1,50	1,18
18	Mount Gay	Barbados	3-7	1,92	<0,07	9,04	23,00	3,12	16,09
19	Blue mauricius	Mauricius	15	2,88	0,10	33,77	44,99	2,01	3,05
20	Lazy dodo	Mauricius	12	1,58	<0,07	6,29	13,70	1,70	5,95
21	Guajiro	Kanárské ostrovy	-	0,48	<0,07	19,02	3,31	2,45	54,40
22	Don papa	Filipíny	7	2,21	<0,07	26,36	94,36	2,24	4,10
23	A. H. RIISE	Svatý Tomáš	20	5,84	0,84	1,67	2,49	2,43	9,21
24	Pyrat	Anquilla	>15	4,19	0,17	19,63	60,21	2,23	7,86
25	Ron Zacapa	Guatemala	23	2,68	0,08	22,01	67,94	1,88	9,10
26	Savoy dark rum	Bulharsko	-	21,80	61,35	75,54	106,40	1,92	2,86
27	Legendario	Kuba	7	1,32	<0,07	16,01	40,87	1,90	13,67
28	Professore	Panama, Jamajka, Nikaragua, Dominikánská republika	-	18,52	1,82	9,67	20,04	2,32	14,67
29	El clasico elixir	Dominikánská rep., Trinidad, Barbados	-	0,65	<0,07	0,12	1,12	1,49	1,04
30	Republika	Nikaragua, Dominikánský rep., Barbados, Jamajka	8	8,07	0,80	5,94	14,34	2,87	17,48

Tab. 18: Koncentrace vybraných analytů ve vzorcích bílých třtinových rumů

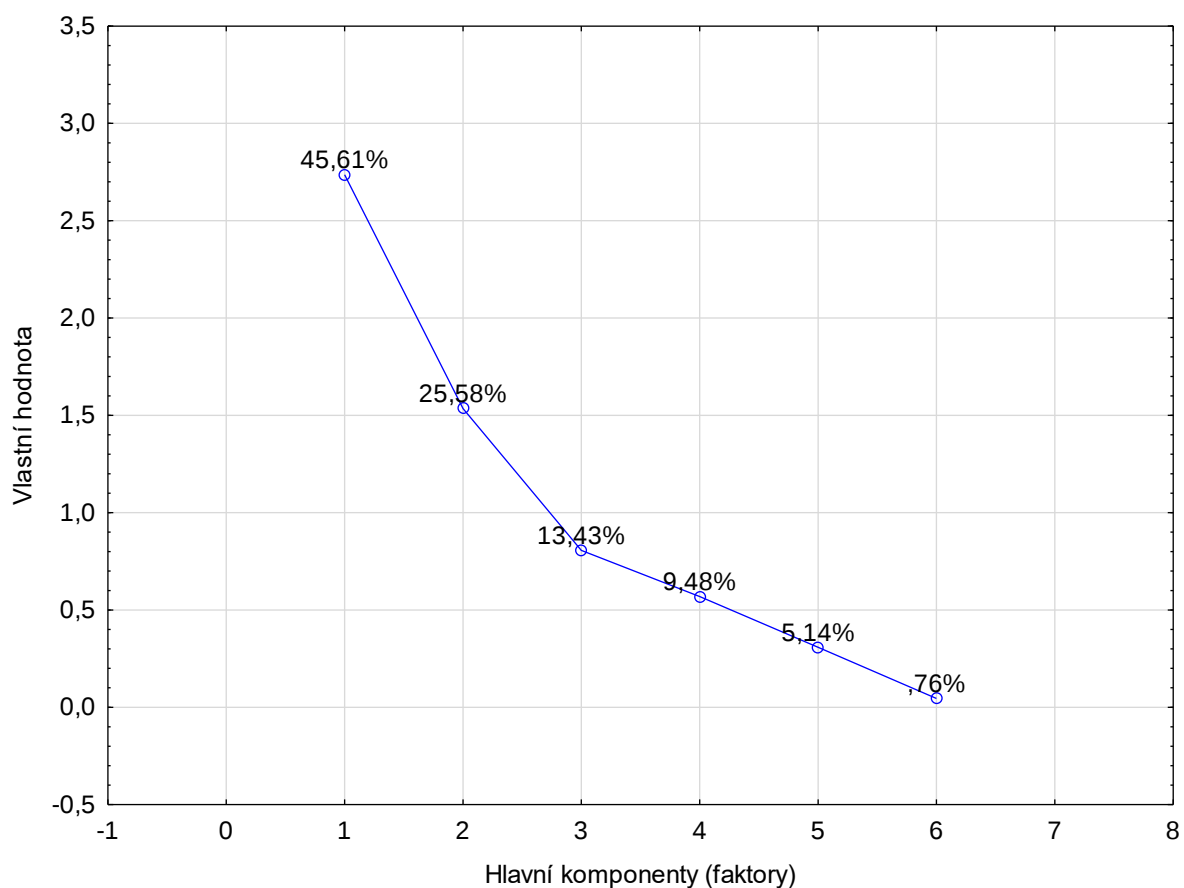
vzorek		země původu	dobu zrání	ethyl hexanoát [µg/ml]	ethyl hepta- noát [µg/ml]	ethyl octa- noát [µg/ml]	ethyl deca- noát [µg/ml]	ethyl tetra- decanoát [µg/ml]	ethyl hexa- decanoát [µg/ml]
1	Havana club	Kuba	3	1,49	<0,07	16,25	45,07	0,59	0,77
2	Bacardi superior	Portoriko	1-2	0,28	<0,07	1,48	5,40	<0,06	<0,4
3	Republika bílá	Dominikánská rep., Guayna. Jamajka, Trinidad	-	2,35	0,20	8,13	25,18	1,36	7,51

7.5.1 Zpracování kvantifikovaných dat

Byla provedena analýza hlavních komponent PCA (*Principal Component Analysis*) za účelem vizualizace kvantifikovaných dat, a také pro vyhodnocení informací, které plynou z těchto dat. Pomocí programu Statistica byla provedena analýza. Data obsahují šest proměnných, tedy šest hlavních komponent, ale pouze dvě komponenty mají větší variabilitu než původní proměnné. Mají vlastní číslo neboli *Eigenvalue* větší než 1, což znamená, že v komponentě je uloženo větší množství variability než v původních proměnných tzv. Kaiserovo kritérium. Tyto dvě komponenty nesou více než 70 % původní informace, což je uvedeno v **tab. 19** a následně graficky znázorněno na **obr. 22**. Data byla poté transformována do **obr. 23** a **obr. 24**, vzorky byly rozděleny jen podle zemí původu.

Tab. 19: Vlastní čísla korelační matice

Hlavní komponenty	Vlastní hodnota	% celkové variability
1	2,74	45,61
2	1,54	25,58
3	0,81	13,43
4	0,57	9,48
5	0,31	5,14
6	0,05	0,76



Obr. 22: Grafické znázornění vlastních čísel aktivních proměnných



Na **obr. 23** a **obr. 24** je grafická projekce proměnných do faktorových rovin 1 a 2 získaná pomocí analýzy hlavních komponent. Z grafů lze vyčíst, že rumy pocházející ze zemí, které se vyskytují v pravém horním kvartálu jsou bohaté na ethyl hexadecanoát, ethyl tetradecanoát a ethyl hexanoát, naopak mají méně ethyl decanoátu, ethyl octanoátu a ethyl heptanoátu.

Rum pocházející z Bulharska má vysoký obsah ethyl heptanoátu a také ethyl octanoátu a ethyl decanoátu, protože se vyskytuje ve stejném kvartále a analyty jsou blízko u sebe. Země nacházející se na opačné straně, než jsou analyty mají jejich menší obsahy. Ty země, které jsou soustředěné uprostřed kvartálů mají vyvážený poměr všech analytů.

Z **obr. 24** lze také vyčíst, že rumy pocházející ze stejných zemí nemají shodný obsah analytů, protože se nacházejí v různých částech grafu. Například vzorky z Panamy jsou rozmístěny jak v levém spodním kvartále, tak i v pravém dolním kvartále. Vzorky nalevo mají menší obsah ethyl tetradecanoátu, ethyl hexadecanoátu a ethyl hexanoátu. Jeden vzorek, který je v pravém dolním kvartále má vyšší obsah ethyl octanoátu, ethyl decanoátu a ethyl heptanoátu, a proto se trochu liší od ostatních vzorků pocházejících z Panamy.

Na základě zjištěných dat se může říct, že i když rumy pocházejí ze stejných zemí, tak si nejsou podobné obsahem stanovených analytů. Může to být způsobeno výrobním procesem rumu, délkou doby zrání v dřevěných sudech a druhem dřeva, ze kterého jsou sudy vyrobeny.

8 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá vyvinutím metody stanovení aromatických látek ve třtinových rumech metodou plynové chromatografie s hmotnostním detektorem a optimalizací HS-SPME extrakce. Optimalizovanou metodou byly následně analyzovány vybrané vzorky třtinových rumů z obchodní sítě.

Při vývoji metody bylo zvoleno pět různých kolon pro měření rumů a na základě nejlepších výsledků byla zvolena kolona VF-5ms, na které se prováděla analýza třtinových rumů. Byl stanoven vhodný teplotní program pro separaci sledovaných analytů. Byly vytvořeny dvě metody pro měření na GC-MS. První metoda sloužila k identifikaci vzorků a druhá byla pro kvantifikaci vzorků. Byly zvoleny vhodné extrakční podmínky pro SPME. Byla optimalizována teplota, čas extrakce, a typ SPME vlákna. Na základě extrakčních podmínek bylo vybráno vlákno PDMS pro měření třtinových rumů. Po vývoji metody byl celý proces validován, aby se odzkoušeli stanovené podmínky pro měření. Byla provedena validace, aby se ověřila robustnost a reprodukovatelnost metody.

Celkem bylo změřeno 30 vzorků tmavých třtinových rumů a 3 vzorky bílých třtinových rumů, ve kterých byly identifikovány a kvantifikovány vybrané těkavé látky, jako jsou ethyl butanoát, ethyl hexanoát, ethyl decanoát, isopentyl alkohol, diethyl sukcinát a další. Identifikace proběhla na základě porovnání analytů s knihovnou spekter NIST a vybrané analyty byly potvrzeny pomocí standardů. Kvantifikace vzorků byla provedena pomocí kalibračních křivek vybraných šesti standardů. Výsledky jednotlivých rumů byly mezi sebou porovnány. Pro porovnání byl také změřen vzorek českého rumu, který se vyrábí z cukrové řepy. Rozdíl mezi tímto rumem a třtinovými rумы nebyl výrazný. Pro vyhodnocení rozdílů mezi rумы byla využita analýza hlavních komponent, v níž byly porovnány rумы z různých zemí podle stanovených obsahů. I když rумы pocházely ze stejné země, tak neměly shodné obsahy analytů. Tato skutečnost mohla být způsobena procesem výroby, ale především dobou zrání v dřevěných sudech, které jsou vyrobeny z různých druhů dřevin.

Díky této diplomové práci je možné stanovovat aromatické látky v třtinových rumech pomocí mikroextrakce na tuhé fázi na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem.

9 Zdroje

- [1] PIGGOTT, John. *Alcoholic beverages*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2012. ISBN: 978-0-85709-051-6.
- [2] BROOM, David. *Rum The Manual*. Great Britain: Mitchell Beazly, 2016. eISBN: 978-1-78472-066-7.
- [3] BUGLASS, J. Alan. *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*. Chichester: John Wiley & Sons, 2011. ISBN: 978-0-470-51202-9.
- [4] FOSS, Richard. *Rum A Global History*. China: C&C Offset Printing Co. 2012. ISBN: 978-1-86189-926-2.
- [5] SUTHERLAND, P. Jane. VARNAM, H. Alan. *Beverages technology, chemistry and microbiology*. Salisbury: Chapman & Hall, 1994. ISBN: 978-0-412-45720-3
- [6] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [7] ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-85903-2.
- [8] ČŮTA, František, Miloš HEJTMÁNEK, Milan KARLÍK, Zbyněk KSANDR, Zdeněk KUČERA, Bohumil POLEJ, Milan POPL a Karel VOLKA. *Instrumentální analýza*. Praha: SNTL, 1986.
- [9] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [10] Mc.Nair M. Harold, Miller M. James. *Basic Gas Chromatography, Second edition*. John Wiley. 2009. ISBN 978-0-470-43954-8.
- [11] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [12] AHUJA, Satinder. JESPERSEN, Neil. *Modern Instrumental Analysis*. 1st ed. Oxford: Elsevier, 2006. ISBN: 978-0-444-52259-7
- [13] PAWLISZYN, Janusz. *Applications of solid phase microextracion*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999. ISBN 0-85404-525-2.
- [14] PAWLISZYN, Janusz. *Handbook of solid phase microextraction*. Beijing: Chemical Industry Press, 2009. ISBN 978-712-2047-014.
- [15] AGILENT, Technologies. *The essential chromatography & spectroscopy catalog*. GC and GC/MS. Agilent Technologies, © 214.
- [16] HARVEY, David. *Modern Analytical Chemistry*. Boston: McGraw-Hill Companies, 2000. ISBN: 0-07-237547-7.
- [17] BURGESS, Christopher. *Valid Analytical Methods and Procedures*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN: 0-85404-482-5.
- [18] JOLLIFFE, T. I. *Principal Component Analysis*. Second Edition. New York: Springer-Verlag, 2002. ISBN: 0-387-95442-2.
- [19] PINO, Jorge A. *Characterization of rum using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry*. Food Chemistry. 2007. 421 – 428. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.031.
- [20] RAUL BELMONTE-SANCHEZ, Jose. GHERGHEL, Simona. ARREBOLA-LIEBANAS, Javier. ROMERO GONZALEZ, Roberto. MARTINEZ VIDAL, Jose Luis.

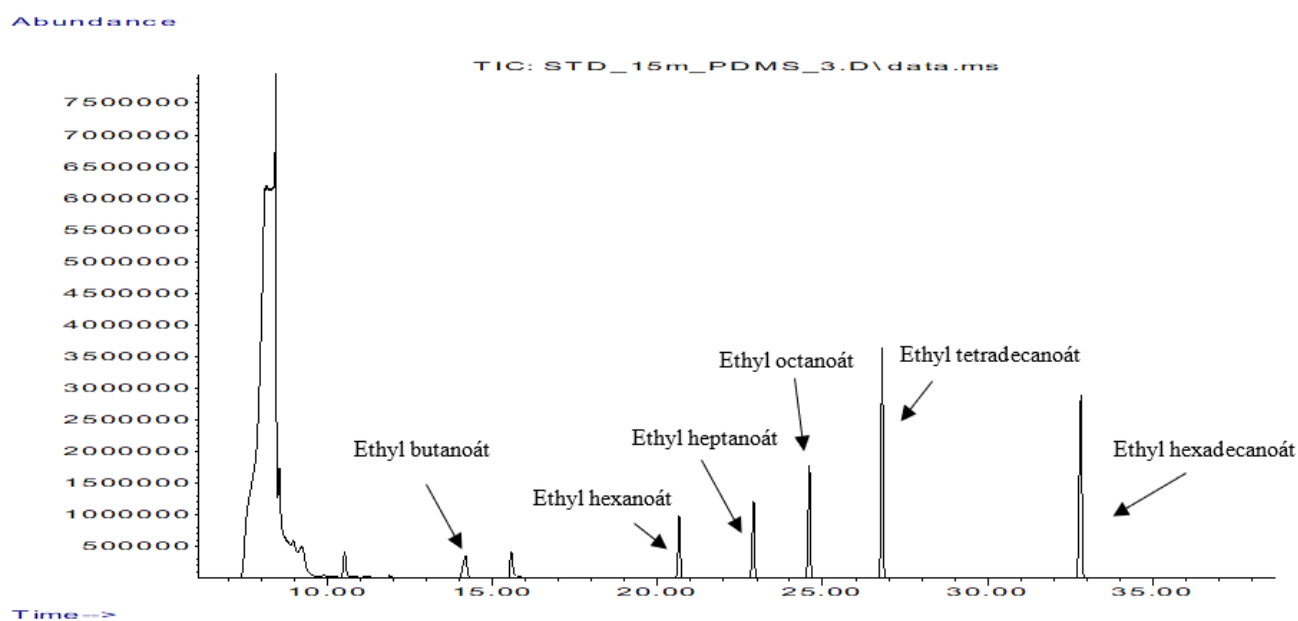
- PARKIN, Ivan. GARRIDO FRENICH, Antonia. *Rum classification using fingerprinting analysis of volatile fraction by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry*. Talanta [online]. 2018. 348-356. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2018.05.025
- [21] DA PORTO, C., DECORTI, D. and TUBARO, F. *Evaluation of volatile compounds and antioxidant capacity of some commercial rums from Dominican republic*. International Journal of Food Science & Technology. 2011. 988-993. Dostupné z: doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02597.x
- [22] MING-JUN Zhang, YU Chen, JI-DONG Liu, KAI Li & JIAN-BIN Li. *Comparison of LLE and SPME Methods for Screening the Aroma Compounds in Rum*. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 2021 DOI: 10.1080/03610470.2021.1937472
- [23] CARDOSOS, Daniel R. ANDRADE-SOBRINHO, Luiz G. LEIRE-NETO, Alexander F. RECHE, Roni V. ISIQUE, William D. FERREIRA, Marcia M.C. LIMA-NETO, Benedito S. FRANCO, Douglas W. *Comparison between Cachaça and Rum Using Pattern Recognition Methods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004. 3429-3433. Dostupné z: https://doi.org/10.1021/jf035262+
- [24] CHARALAMBOUS, George. *Analysis of foods and beverages: Headspace Techniques*. New York: Academic Press, 1978. ISBN 0-12-169050-4
- [25] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. 1. Vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN: 80-03-00569-8.
- [26] COELHO E, LEMOS M, GENISHEVA Z, DOMINGUES L, VILANOVA M, OLIVEIRA JM. *Validation of a LLME/GC-MS Methodology for Quantification of Volatile Compounds in Fermented Beverages*. Molecules. 2020 Jan 31;25(3):621. doi: 10.3390/molecules25030621. PMID: 32023947; PMCID: PMC7036758.
- [27] CRESPO SARIOL, H. MARIÑO PEACOK, T. YPERMAN, J. SÁNCHEZ ROCA, Á. CARVAJAL FALS, H. BRITO SAUVANELL, Á. CARLEER, R. CZECH, J. LEDEA VARGAS, J.R. NAVARRO CAMPA, J. *Comparative Study between Acoustic Emission Analysis and Immersion Bubble-Metric Technique, TGA and TD-GC/MS in View of the Characterization of Granular Activated Carbons Used in Rum Production*. Beverages , 3, 12. https://doi.org/10.3390/beverages3010012
- [28] DE SOUZA, Maria D. C. A. VÁSQUEZ, Pablo. DEL MASTRO, Nélica L. ACREE, Terry E. LAVIN, Edward H. *Characterization of Cachaça and Rum Aroma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. 54, 2. 485-488. Dostupné z: https://doi.org/10.1021/jf0511190
- [29] DRDÁK, M. STUDNICKÝ, J. MÓROVÁ E. KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava: Malé centrum. 1996. ISBN: 80-967064-1-1.
- [30] ECKSCHLAGER, K. HORSÁK, I. KODEJŠ, Z. *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. Praha: SNTL, 1980. ISBN: 04-610-80.
- [31] FIFIELD, F. W. KEALEY, D. *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. Malden: Blackwell Science, 2000. ISBN: 978-0-632-05384-1.
- [32] FOLWLIS, Ian A. *Gas Chromatography*. Greenwich: John Wiley & Sons. 1995. ISBN 0-471-95468-3
- [33] FRANITZA, Laura. NICLOTTI, Luca. GRANVOGL, Michael. SCHIEBERLE, Peter. *Differentiation of Rums Produced from Sugar Cane Juice (Rhum Agricole) from Rums*

- Manufactured from Sugar Cane Molasses by a Metabolomics Approach*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2018. 3038-3045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00180>
- [34] HÜBSCHMANN, Hans-Joachim. *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications, Second Edition*. Bremen: WILEY-VCH, 2009. ISBN: 978-3-527-31427-0.
- [35] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: UJEP. 2007. ISBN: 978-80-7414-873-6.
- [36] MEIER, Peter C. ZÜND, Richard E. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*. Second Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2000. ISBN: 978-0-471-29363-7
- [37] MOTYKA, Kamil. HLAVÁČ, Jan. *Stručný přehled separačních metod*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. 45 s. str. 14-16. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [38] PARKER, J.K. ELMORE, J. S. METHVEN, L. *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*. Oxford: Woodhead Publishing, 2015. ISBN 978-78242-103-0
- [39] PAWLISZYN, Janusz. *Solid Phase Microextraction: theory and practice*. vyd Canada: Wiley- VCH, 1997, p. 247, ISBN-0-471-19034-9.
- [40] PINO, J.A., RONCAL, E. *Validation of a HS-SPME-GC Method for Determining Higher Fatty Esters and Oak Lactones in White Rums*. Food Anal. Methods 9. 2016. 1958–1962. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0368-3>
- [41] PUENTE TORRES, J., CRESPO SARIOL, H., YPERMAN, J. et al. *A novel X-ray radiography approach for the characterization of granular activated carbons used in the rum production*. J Anal Sci Technol 9, 1 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40543-017-0133-x>
- [42] SPERBER, William H. DOYLE, Michael P. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-1-4419-0825-4
- [43] TAMANG, Jyoti Prakash. KAILASAPATHY, Kasipathy. *Fermented Foods and Beverages of the World*. New York: CRC Press, 2010. ISBN: 978-1-4200-9495-4
- [44] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN: 80-86659-00-3.
- [45] WILLIAMS, James. *Origin of Beverages*. Delhi: Global Media, 2009. ISBN 978-93-80075-02-0
- [46] WIŚNIEWSKA, Paulina. ŚLIWIŃSKA, Magdalena. DYMERSKI, Tomasz. WARDENCKI, Waldemar and NAMIEŚNIK, Jacek. *Application of Gas Chromatography to Analysis of Spirit-Based Alcoholic Beverages*. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2015 45:3, 201-225 DOI:10.1080/10408347.2014.904732

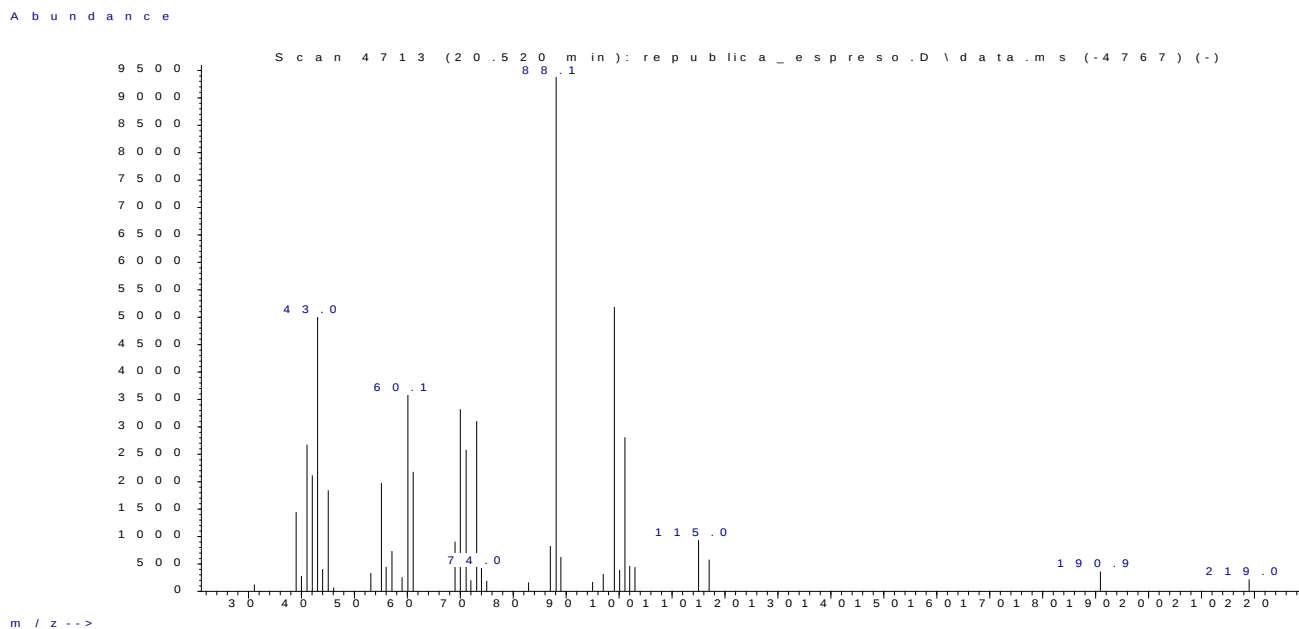
10 Seznam zkratk

CAR	Carboxen
CW	Carbowax
DI-SPME	Direct sampling Solid phase microextraction (přímá extrakce)
DVB	divinylbenzen
EI	Electron impact (Elektronová ionizace)
FID	Flame Ionization Detector (Plamenově ionizační detektor)
GC	Gas chromatography (Plynová chromatografie)
GC-MS	Gas chromatography-mass chromatography (Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií)
HS-SPME	Head Space Solid phase microextraction (extrakce nad hlavou)
HPCE	High performance capillary electrophoresis (Vysoce účinná capilární elektroforéza)
HPLC	High performance liquid chromatography (Vysoce účinná kapalinová chromatografie)
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MS	Mass Spectrometry (Hmotnostní spektrometrie)
PA	Polyakrylát
PCA	Principal component analysis (Analýza hlavních komponent)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PLOT	Porous-layer open tubular column
PTV	Programmed temperature vaporizer (Programové vypařování vzorku)
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SCOT	Support-coated open column
SIM	Selected ion monitoring (Monitorování vybraných iontů)
SPME	Solid phase microextraction (mikroextrakce tuhou fází)
WCOT	Wall – coated open tubular column

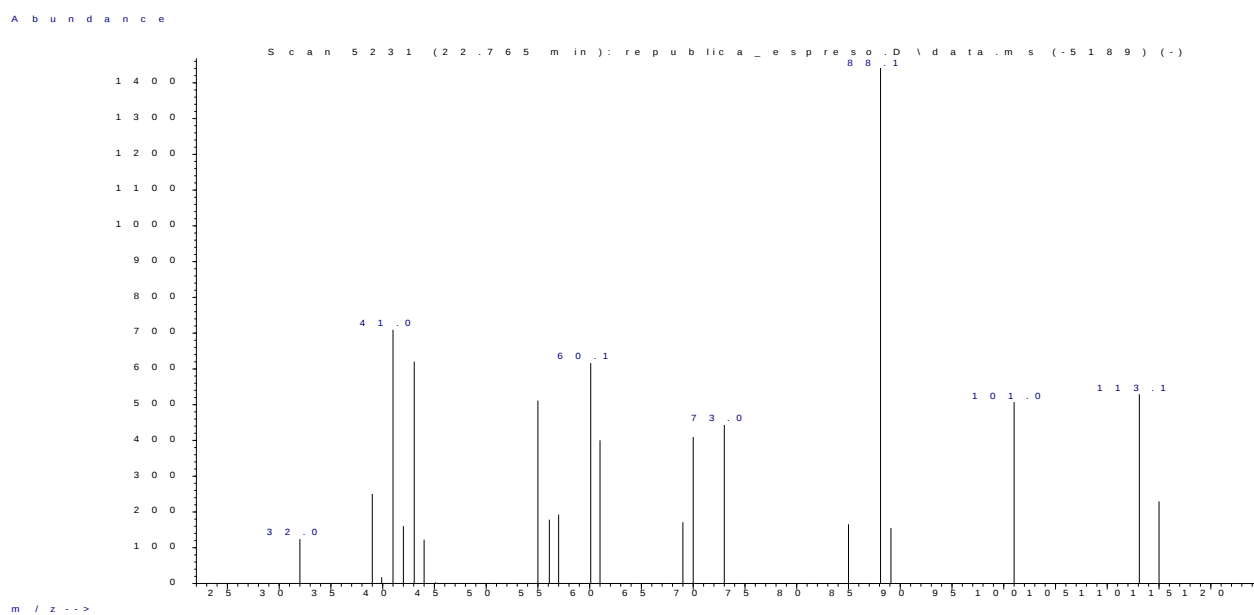
11 Přílohy



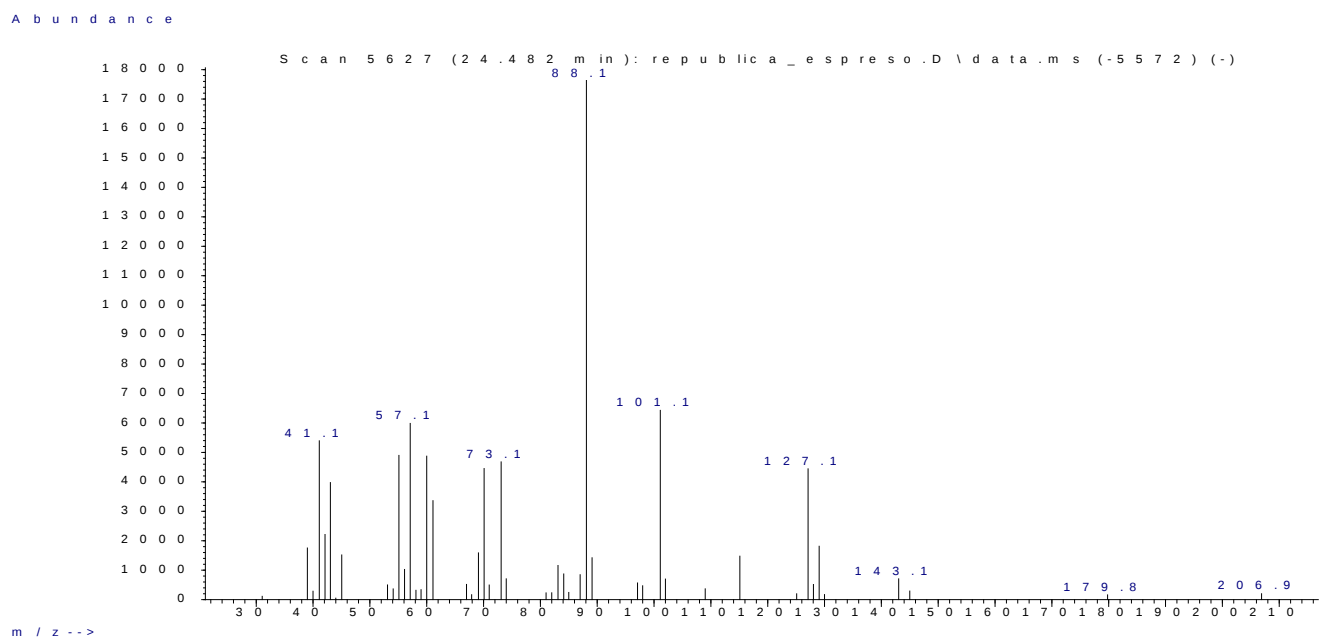
Příloha 1: Ukázka chromatogramu standardů při koncentraci látek okolo 430 µg/ml



Příloha 2: Spektrum ethyl hexanoátu

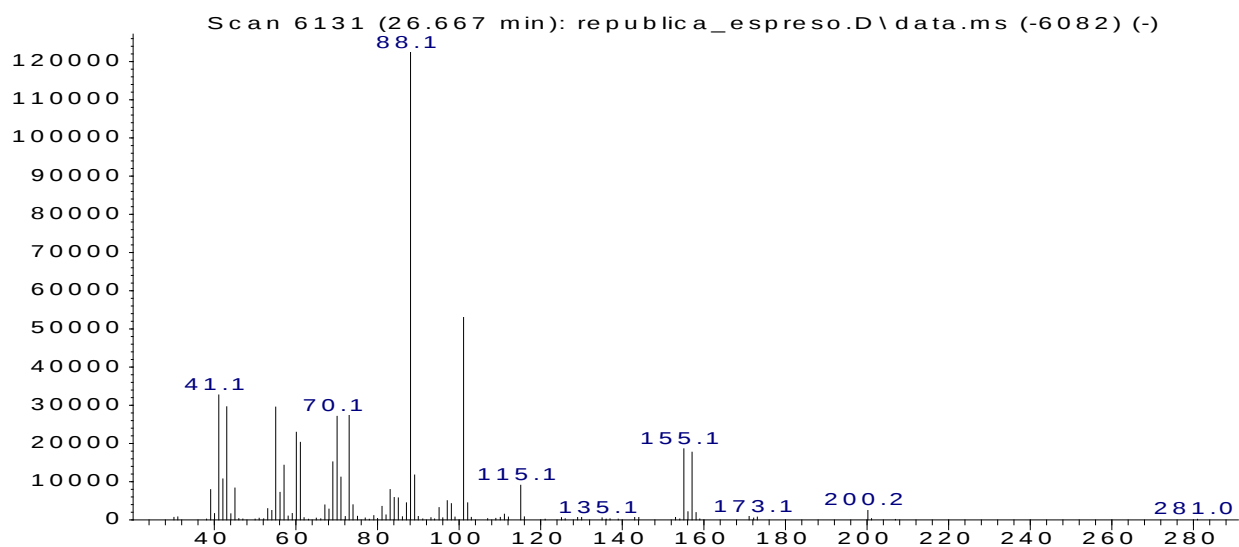


Příloha 3: Spektrum ethyl heptanoátu



Příloha 4: Spektrum ethyl octanoátu

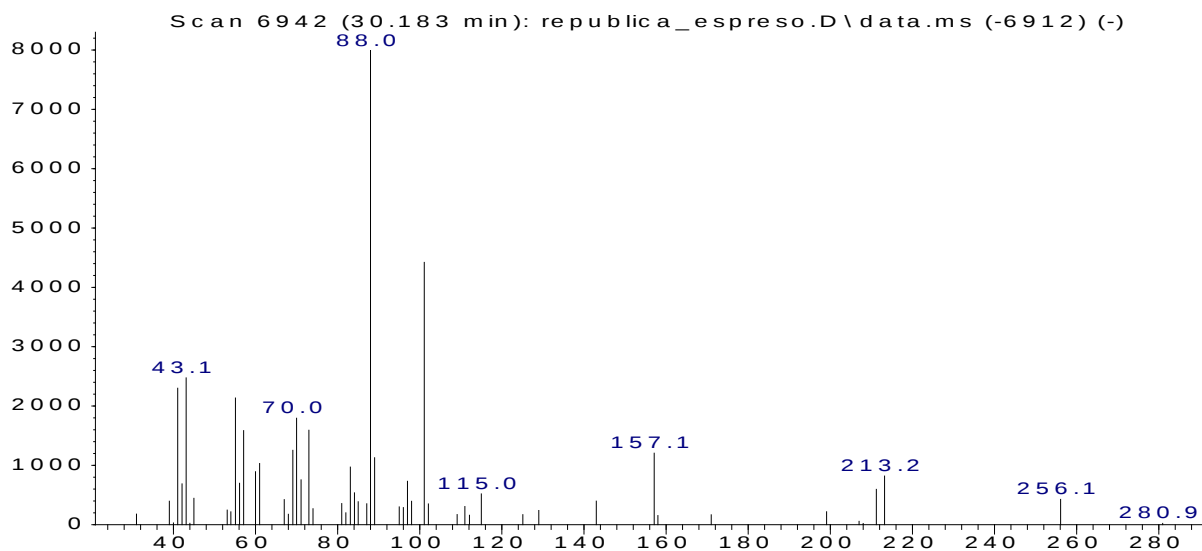
Abundance



m/z-->

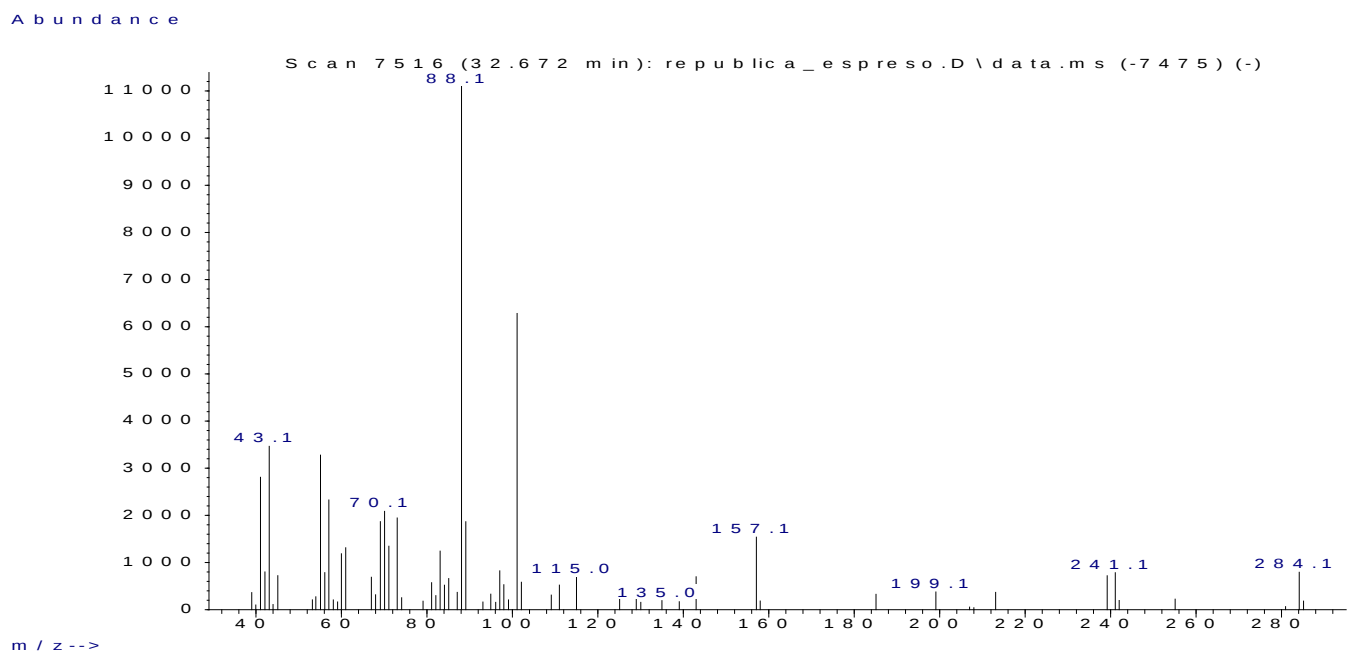
Příloha 5: Spektrum ethyl decanoátu

Abundance

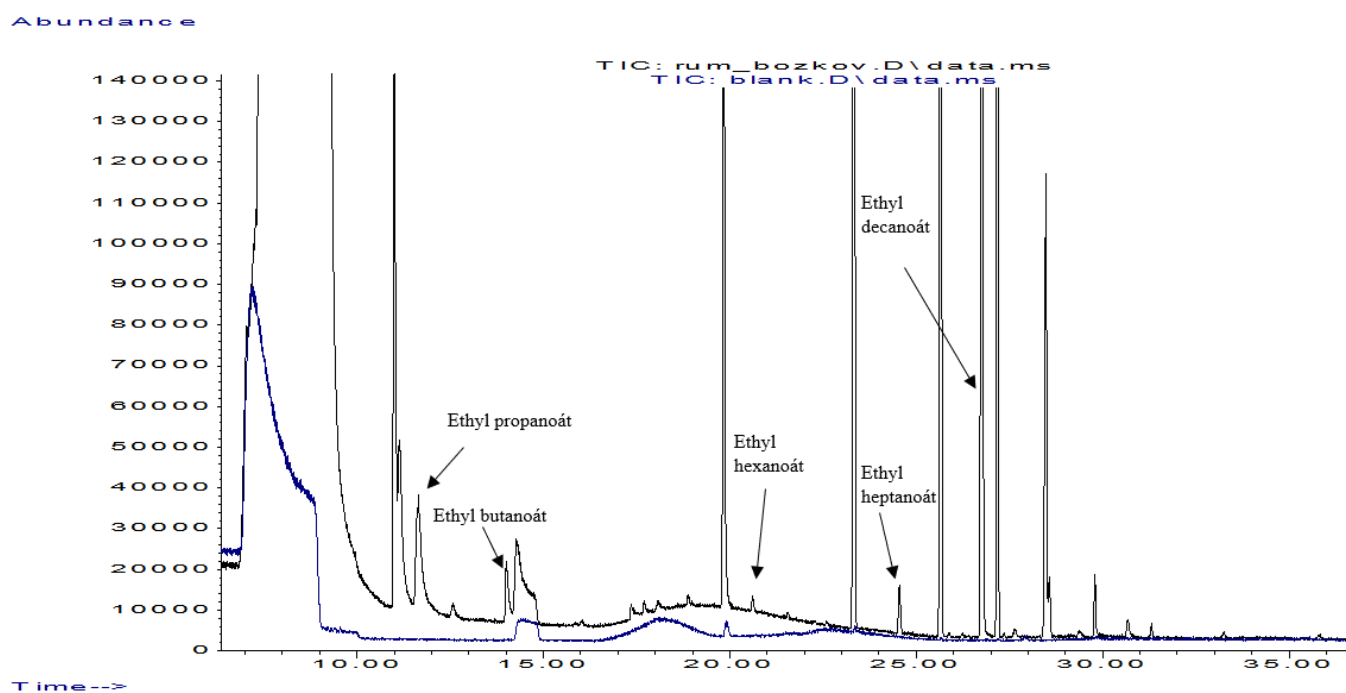


m/z-->

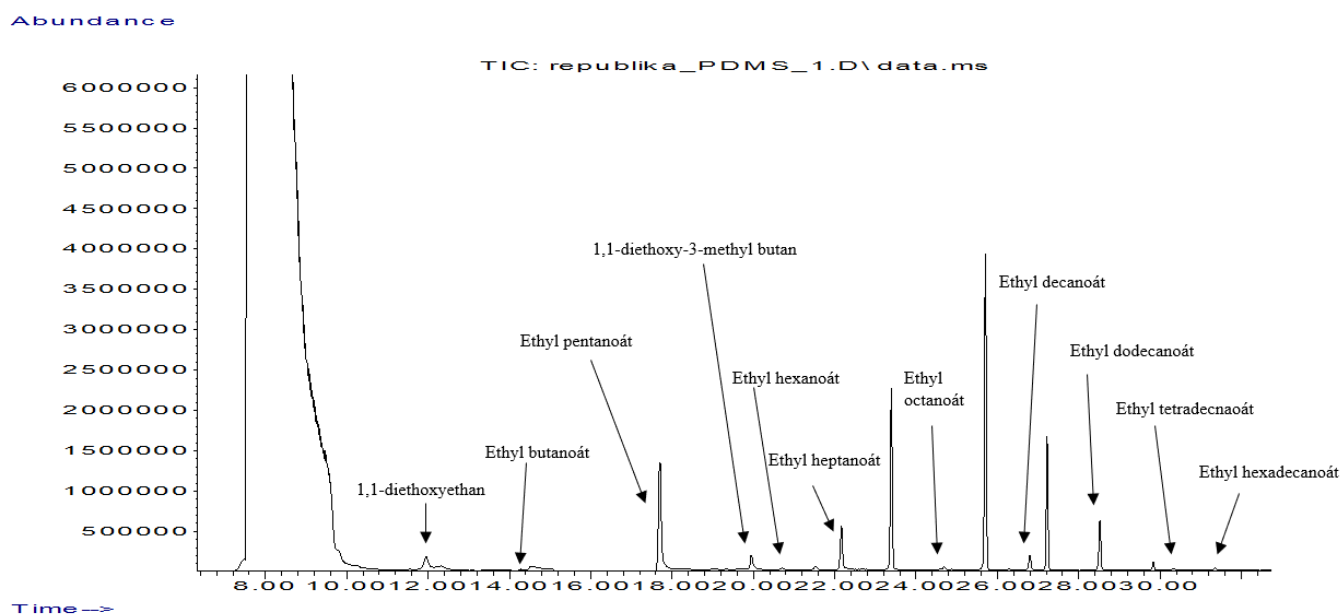
Příloha 6: Spektrum ethyl tetradecanoátu



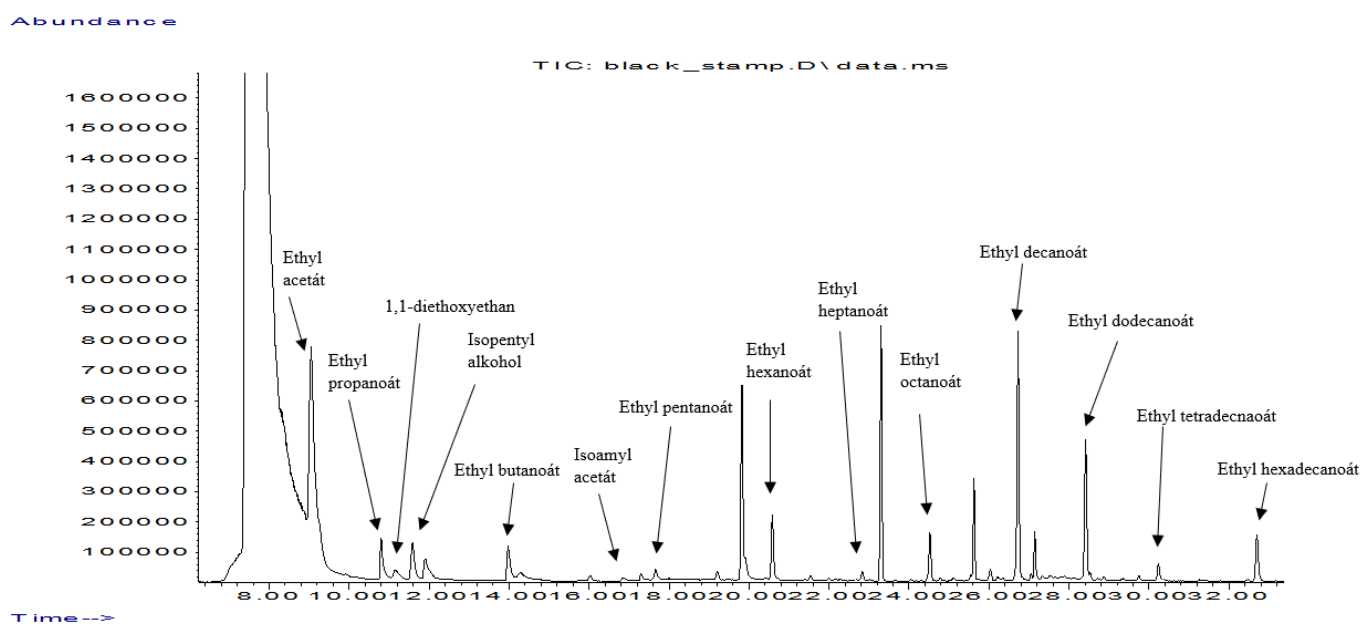
Příloha 7: Spektrum ethyl hexadecanoátu



Příloha 8: Ukázka chromatogramu rumu Božkov Tuzemák v porovnání s Blankem

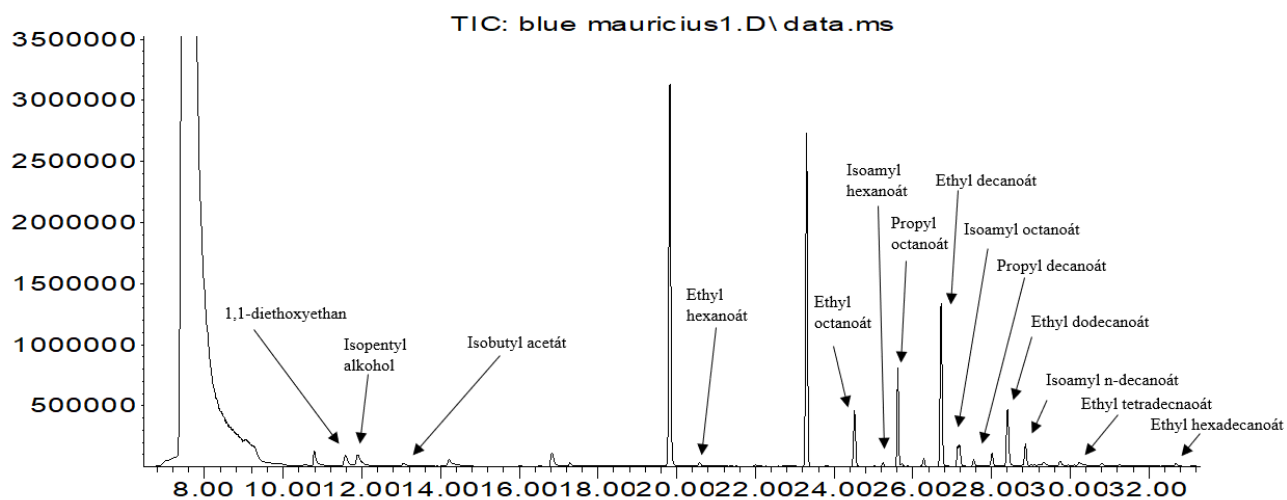


Příloha 9: Detail chromatogramu rumu Republiky od 7 min do 32 min



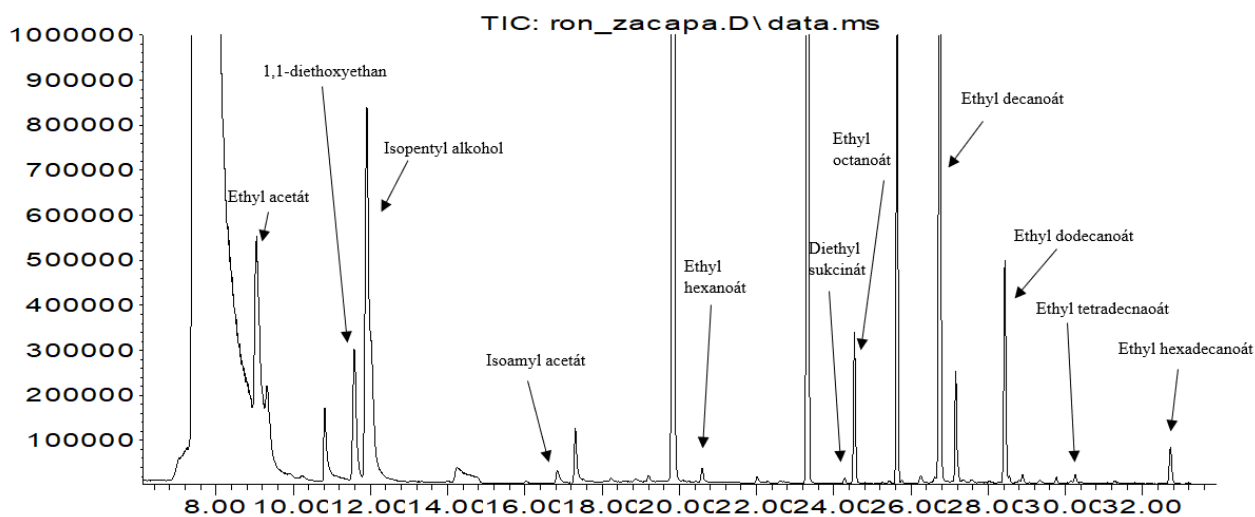
Příloha 10: Detail chromatogramu rumu Black Stamp od 7 min do 33 min

Abundance

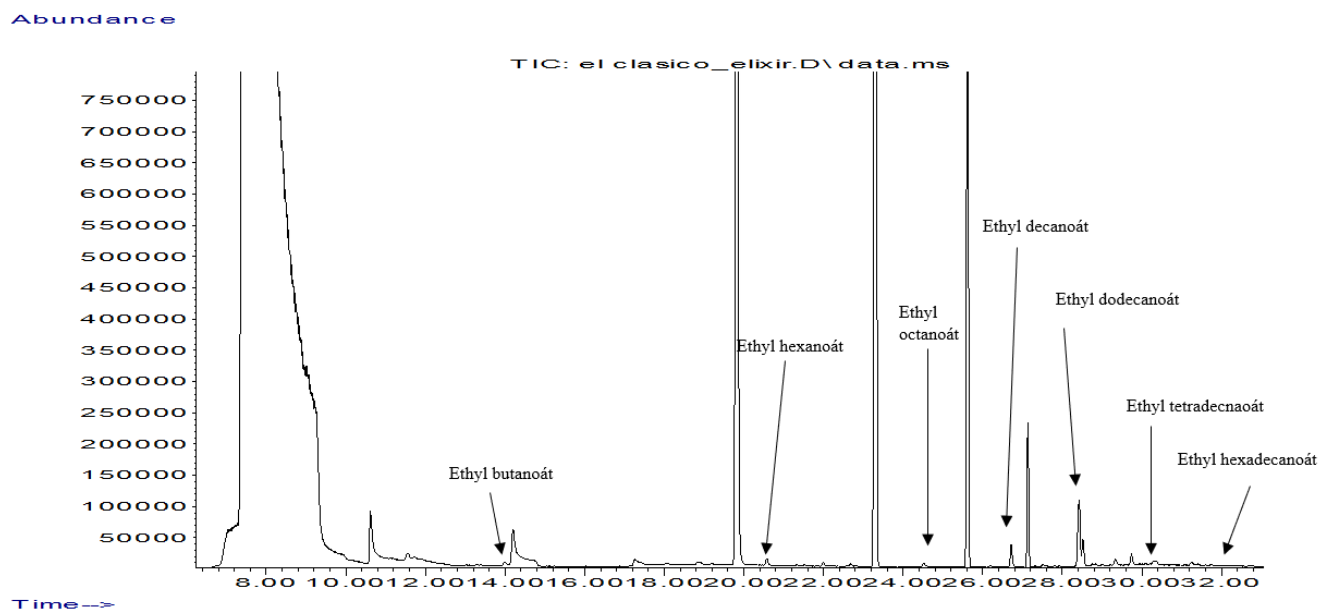


Příloha 11: Detail chromatogramu rumu Blue mauricius od 7 min do 33 min

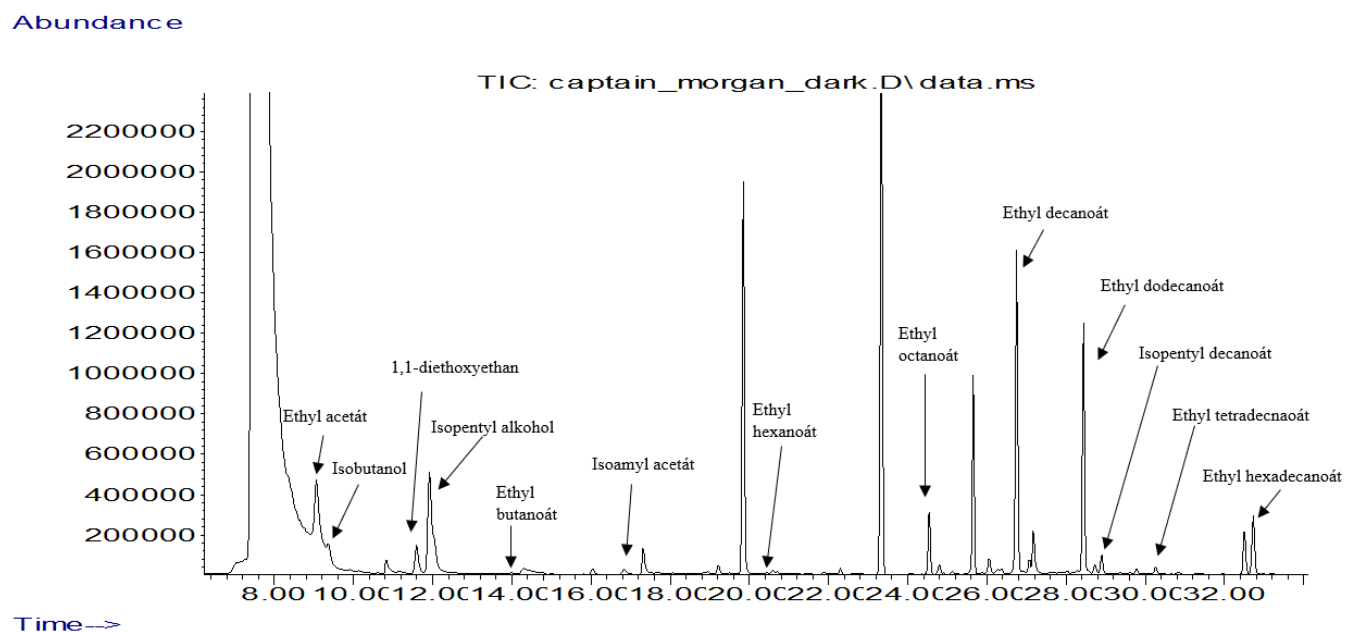
Abundance



Příloha 12: Detail chromatogramu rumu Ron zacapa od 7 min do 33 min



Příloha 13: Detail chromatogramu rumu El clasico elixir od 7 min do 32,5 min



Příloha 14: Detail chromatogramu rumu Canptain morgan dark od 7 min do 33 min