



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav analýzy potravin a výživy

***LABORATOŘ INSTRUMENTÁLNÍCH METOD
V ANALÝZE POTRAVIN***

Autentikace whisky pomocí GC/QTOF

Garant úlohy: Ing. Michal Stupák, Ph.D.

VÝUKOVÉ CÍLE LABORATORNÍHO CVIČENÍ

- 1) Prohloubení teoretických a praktických znalostí v oblasti plynové chromatografie a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (GC–HRMS)
- 2) Demonstrace analytické metody pro stanovení těkavých a částečně těkavých látek ve whisky
- 3) Seznámení se s chemometrickými metodami a jejich využití pro stanovení autenticity whisky

KRITÉRIA HODNOCENÍ PRÁCE

- Znalost základních informací souvisejících s GC–HRMS instrumentací
- Praktické provedení práce
- Dodržení pravidel pro práci v laboratoři (bezpečnost, čistota, pořádek)
- Protokol – přehlednost experimentálních údajů, výsledky a závěr

ČASOVÝ HARMONOGRAM PRÁCE

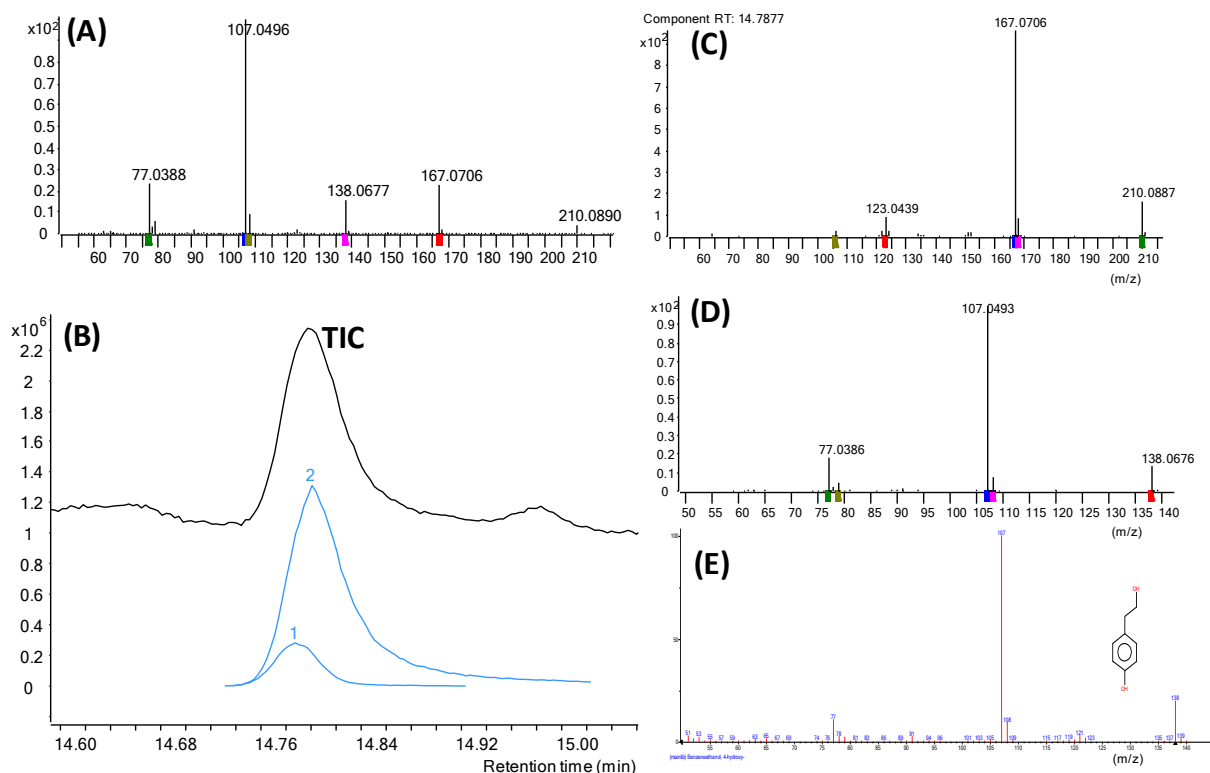
K rok č.	Činnost
1.	Výklad, prozkoušení a diskuse (45 min)
2.	Ukázka přípravy vzorku whisky pro analýzu (15 min)
3.	Příprava vzorků whisky (120 min)
4.	Nastavení instrumentace GC-HRMS (20 min)
5.	Ukázka jednotlivých softwarů pro vyhodnocení dat (30 min)
8.	Vyhodnocení a zpracování dat (60 min)
9.	Příprava protokolu (30 min, lze vyhotovit též mimo laboratoř, po domluvě s asistentem)

STUDIJNÍ ČÁST

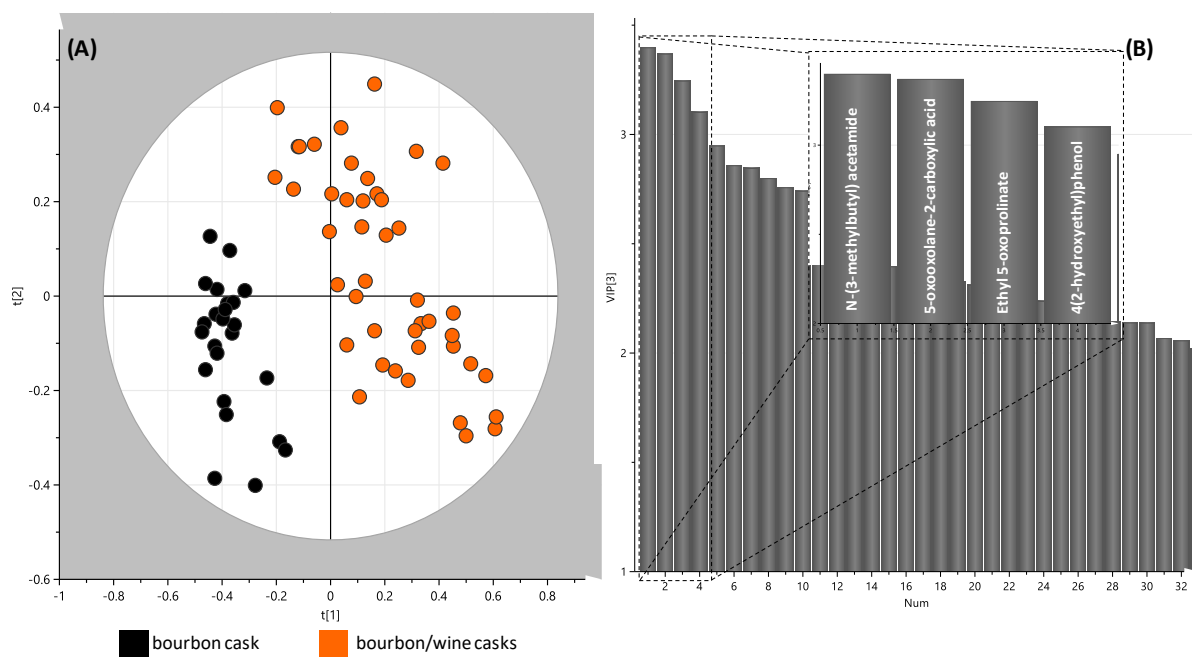
Skotská Whisky je celosvětově velmi oblíbeným alkoholickým nápojem na celém světě. Právě kvůli její popularitě je Skotská Whisky často předmětem falšování. Falšování whisky může probíhat následujícími způsoby: (i) levnější whisky označena jako „luxusní produkt“, (ii) levnější lihovina namíchána s autentickou whisky a (iii) levnější alkohol dochucen pomocí aditivní látek. Dále může být nesprávně uveden proces zrání (druh použitého sudu, doba zrání) v dubových sudech. Právě proces zrání je významný technologický krok pro výrobu Skotské whisky. Během tohoto procesu přecházejí do finálního produktu látky charakterizující chuť a vůni a tyto látky charakterizují jednotlivé druhy whisky. Pro stanovení těchto látek je vhodná zejména plynová chromatografie (GC) ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (HRMS). Pro stanovení autenticity výrobku je nutné charakterizovat autentické vzorky a po zpracování pomocí chemometrickými metodami (např. analýza hlavních komponent – PCA, částečná analýza nejmenších čtverců – PLS-DA) najít látky charakterizující jednotlivé skupiny. Tyto markery je třeba identifikovat a ověřit pomocí dostupných technik. Instrumentace GC-HRMS typu kvadrupól-analyzátor doby letu (QTOF) umožňuje identifikaci neznámých látek pomocí přesné hmoty získané z elektronové ionizace (EI), retenčních indexů, izotopového vzoru, knihovny NIST, přesné hmoty získané z pozitivní chemické ionizace (PCI) a využití tandemové MS (MS/MS) v PCI.

Velkou předností hmotnostního spektrometru typu TOF („time of flight“) je možnost dekonvoluce a její využití je demonstrováno na **obrázku 1**. V tomto konkrétním případě byly odlišeny dvě látky s rozdílnými spektry, které jsou v koeluci a k jednotlivým signálům jsou přiřazeny hmotnostní spektra.

Na **obrázku 2** je uveden příklad chemometrického vyhodnocení naměřených dat pomocí statistického softwaru SIMCA. Na obrázku 2a je znázorněn tzv. „score plot“ demonstrující rozdělení jednotlivých vzorků whisky podle druhu sudu, které byly použity při výrobě whisky. „VIP-plot“ (**obrázek 2b**) ilustruje nejvýznamnější „markery“, které nejvíce přispívají k rozdělení jednotlivých skupin.



Obrázek 1: příklad využití dekonvoluce – (A) hmotnostní spektrum před dekonvolucí, (B) TIC chromatografický záznam s vyznačenými látkami detekovanými po dekonvoluci, (C) a (D) hmotnostní spektra po dekonvoluci, (E) NIST spektrum významného markeru



Obrázek 2: identifikace významných markerů pomocí PLS-DA a VIP-plotu.

Doporučená literatura:

- Stupak M., Goodall I., Tomaniova M., Pulkrabova J., Hajslova J.: A novel approach to assess the quality and authenticity of Scotch Whisky based on gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (2018) 1042:60-70. (doi: 10.1016/j.aca.2018.09.017)
- P. Wiśniewska, T. Dymerski, W. Wardencki, J. Namieśnik: Chemical composition analysis and authentication of whisky, *J. Sci. Food Agric.*, 95 (2015), pp. 2159-2166, 10.1002/jsfa.6960
- R.I. Aylott, W.M. MacKenzie: Analytical strategies to confirm the generic authenticity of scotch whisky, *J. Inst. Brew.*, 116 (2010), pp. 215-229, 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00424.x
- The Scotch Whisky Regulations 2009, (n.d.). <http://www.legislation.gov.uk/uksi/2009/2890/contents/made>(Accessed June 4, 2018).
- J. Conner Chapter 11 – maturation I. Russell, G. Stewart (Eds.), *Whisky* (second ed.), Academic Press, San Diego (2014), pp. 199-220, 10.1016/B978-0-12-401735-1.00011-8

PRAKTICKÁ ČÁST

Náplň a cíl práce

Cílem úlohy je seznámení s analytickou metodou pro autentikaci whisky pomocí profilování těkavých a částečně těkavých látek. Dále budou demonstrovány nastavení instrumentace GC–HRMS a naměřená data budou vyhodnocena pomocí chemometrických metod. Tento postup lze použít nejen pro whisky a další alkoholické nápoje, ale i pro širokou škálu komodit reprezentovaných těkavými a částečně těkavými látkami.

Příprava vzorku

Do plastové kyvety se pipetuje 3 ml vzorku, 10 ml deionizované vody a 10 ml ethylacetátu. Kyveta se protřepe po dobu dvou minut a pak se umístí do odstředivky, kde probíhá odstředění po dobu pěti minut při frekvenci 10 000 otáček za minutu. Vrchní etylacetátová vrstva se zfiltruje přes vrstvu vyžíhaného síranu sodného promytého ethylacetátem do baňky. Po zfiltrování je vrstva síranu sodného promyta 5 ml ethylacetátu. Ethylacetátový extrakt je odpařen při 220 mbar do poslední kapky, která pak byla odfoukána dusíkem. Odparek se rozpustí v 0,5 ml ethylacetátu. Simultánně bude stejným způsobem připraven blank.

Zpracování naměřených dat

Naměřená hmotnostní spektra vzorků whisky jsou nejprve převedena do centroidního formátu. Následně je provedena dekonvoluce v softwaru UnknownAnalsis. Poté se provede „peak alignment“ (sjednocení retenčních časů a přesných hmot) u detekovaných látek pomocí softwaru MassProfilerProfessional. Z výsledných látek se provede rekurzivní analýza pomocí MassHunter Quant. Výsledkem této analýzy je plocha píků jednotlivých látek v jednotlivých vzorcích. Tento datový soubor byl exportován do programu Excel, kde se provede normalizace. Upravený datový soubor je následně exportován do statistického softwaru SIMCA, kde bude provedena PCA a PLS-DA. Následně jsou detekovány markery charakterizující jednotlivé skupiny whisky a na závěr jsou tyto látky identifikovány pomocí knihovny NIST, přesné hmoty, isotopového vzoru, retenčního indexu a pozitivní chemické ionizace.

Chemikálie, spotřební materiál a pomůcky

Deionizovaná voda (Milli-Q, Millipore, USA)

Ethylacetát (Merck, Německo)

Síran sodný (Penta Praha, ČR)

Helium 6.0 (Siad, ČR)

Dusík 5.0 (Siad, ČR)

Běžné vybavení laboratoře (kádinky, odměrný válec, Pasteurova pipeta, navažovací lodička, lžička na chemikálie, 50 ml umělohmotné květy)

Předvážky AND HF-1200 (A&D Instruments, Japonsko)

Automatická pipeta FINNPIPETTE 1 – 5 ml (Thermo Scientific, USA)

Instrumentace

Agilent 7200B Quadrupole Time of Flight GC/MS

- Automatický podavač vzorků GC Sampler 80 (Agilent Technologies, USA)
- Programovatelná pec Agilent 7890B (Agilent Technologies, USA)
- Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr Accurate-Mass Q-TOF/MS 7200 (Agilent Technologies, USA)

Použité softwary

MassHunter Profinder (B.06.00, Agilent Technologies, USA)

Simca verze 13 (Umetrics, Švédsko)

UnknownAnalsis (B.07.01, Agilent Technologies, USA)

MassProfilerProfessional (13.0, Agilent Technologies, USA)

MassHunter Quant (B.07.01, Agilent Technologies, USA)

MassHunter Qual (B.07.00, Agilent Technologies, USA)

Microsoft Office Excel (2013, Microsoft, USA)

Instrumentální metoda

Tab. 1 Parametry plynové chromatografie chromatografie:

Kolona	HP-INNOWax (25 m × 0,2 mm, 0,2 μm; Agilent Technologies)
Nosný plyn:	Helium
Průtok plynu	1 ml / min
Typ nástřiku	Splitless (1 μl)
Teplotní program pece	60 °C po dobu 1,5 min; 10 °C/min do 240 °C
Teplota transferline	260 °C

Tab. 2 Podmínky hmotnostně-spektrometrické detekce

Ionizace	EI
Teplota zdroje	230°C
Hmotnostní rozsah	12 500 FWHM
Akviziční rychlost	5 spekter/s
Hmotnostní rozsah	40 – 550 <i>m/z</i>

PROTOKOL

- 1) Úvod – skupina, studenti
- 2) Princip metody (cca jeden odstavec)
- 3) Chromatografický záznam dvou rozdílných vzorků whisky
- 4) Podrobně popsany „score a loading plot“
- 5) Závěr (cca jeden odstavec)