

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

**METODY KOMPLEKSOWEJ ANALIZY SKŁADU
PRODUKTÓW UBOCZNYCH PROCESU FERMENTACJI
ALKOHOŁOWEJ W PÓŁPRODUKTACH I PRODUKTACH
SPIRYTUSOWYCH**

mgr inż. Paulina Biernacka

Promotor: prof. dr hab. inż. Waldemar Wardencki

Gdańsk 2012

Składam serdeczne podziękowania

Panu prof. dr hab. inż. Waldemarowi Wardenckiemu

za życzliwą pomoc, opiekę, wyrozumiałość oraz cenne uwagi, które pozwoliły na pomyślne zakończenie niniejszej pracy

Panu prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi

za okazaną życzliwość, zaufanie, wiarę w moje możliwości, za naukę systematyczności oraz nieustanną mobilizację do pracy

Dziękuję także

Pracownikom i Doktorantom

Katedry Chemii Analitycznej za wspólne lata pracy oraz wszelkie gesty sympatii

Pragnę podziękować również

Destylarni Sobieski S.A. w Starogardzie Gdańskim

za życzliwą współpracę oraz możliwość wykonania części badań w Firmowym laboratorium

Panu Dr. J. L. Andersonowi z The University of Toledo, USA

za życzliwą współpracę, przekazaną wiedzę oraz serdeczne przyjęcie do Zespołu

Samorządowi Województwa Pomorskiego oraz Unii Europejskiej

za wsparcie finansowe w trakcie realizacji badań

Szczególnie dziękuję Rodzinie i Przyjaciołom

za wieloletnie wsparcie, wyrozumiałość i nieustającą wiarę w moje możliwości

Paulina Biernacka

“Do what you can, with what you have, where you are”

Theodore Roosevelt

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	7
WSTĘP.....	9
I CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	13
1 ZARYS TECHNOLOGII WYTWARZANIA SPIRYTUSU	13
2 SUROWCE WYKORZYSTYWANE W PROCESIE PRODUKCJI SPIRYTUSU	15
2.1 Surowce zbożowe.....	16
2.1.1 Żyto (<i>Secale</i> L.).....	16
2.1.2 Jęczmień (<i>Hordeum</i> L.).....	17
2.1.3 Pszenica (<i>Triticum</i> L.).....	17
2.1.4 Owies (<i>Avena</i> L.).....	18
2.1.5 Kukurydza (<i>Zea</i>)	18
2.1.6 Amarantus (<i>Amaranthus</i>)	18
2.1.7 Sorgo (<i>Sorghum</i> Moench)	19
2.2 Surowce okopowe	20
2.2.1 Ziemniak (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	20
2.2.2 Burak cukrowy (<i>Beta vulgaris</i> L.).....	20
2.2.3 Topinambur (<i>Helianthus tuberosus</i> L.).....	21
2.3 Surowce pochodzenia przemysłowego	22
2.3.1 Melasa	23
2.3.2 Odpady przemysłu owocowo-warzywnego	23
2.3.3 Odpady przemysłu piekarniczego i młynarskiego	23
2.3.4 Odpady przemysłu celulozowego	24
3 PRODUKTY UBOCZNE PROCESU FERMENTACJI ALKOHOLOWEJ	24
3.1 Estry	26
3.2 Alkohole.....	28
3.3 Związki karbonylowe.....	31
3.4 Związki siarki.....	33

3.5	Kwasy organiczne	34
4	POLIMEROWE CIECZE JONOWE – SORBENTY NOWEJ GENERACJI W SPME	39
II	CEL PRACY	47
III	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	48
1	MATERIAŁY DO BADAŃ	48
1.1	Destylaty rolnicze.....	48
1.2	Wódki.....	51
2	ODCZYNNIKI CHEMICZNE	52
3	APARATURA	54
4	SZKŁO LABORATORYJNE I AKCESORIA.....	56
5	PROCEDURA IZOLACJI I WZBOGACANIA ANALITÓW	57
6	ROZRÓŻNIANIE POCHODZENIA BOTANICZNEGO DESTYLATÓW ROLNICZYCH.....	59
6.1	Oznaczanie estrów etylowych metodą HS-SPME/GC-FID	59
6.2	Oznaczanie głównych produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej metodą GC-FID.....	69
6.3	Określenie składu frakcji lotnej destylatów rolniczych z wykorzystaniem techniki HS-SPME/GC-MS	77
7	OZNACZANIE ZWIĄZKÓW KARBONYLOWYCH W WÓDKACH CZYSTYCH.....	90
8	WYKORZYSTANIE POLIMEROWYCH CIECZY JONOWYCH W SPME.....	100
8.1	Synteza polimerowych cieczy jonowych	101
8.1.1	Opis syntezy	104
8.1.2	Analiza spektralna ^1H NMR.....	104
8.2	Przygotowanie włókien ekstrakcyjnych pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi	106
8.3	Dobór optymalnych warunków rozdzielania chromatograficznego HS-SPME/GC-FID.....	110
8.4	Wybór wariantu stosowania techniki SPME.....	111
8.5	Dobór optymalnych warunków ekstrakcji na przykładzie włókna typu poli([ViBHDIM][NTf ₂])	112
8.5.1	Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji analitów	113
8.5.2	Wpływ stężenia etanolu na wydajność ekstrakcji analitów.....	114

8.5.3	Wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji analitów	115
8.5.4	Wpływ czasu ekspozycji włókna na wydajność ekstrakcji analitów	116
8.5.5	Wpływ zmiany siły jonowej próbki na wydajność ekstrakcji analitów	117
8.5.6	Wpływ czasu desorpcji na ilościowe wprowadzenie analitów do kolumny	118
8.5.7	Zestawienie dobranych parametrów izolacji i wzbogacania analitów z zastosowaniem włókna typu poli([ViBHDIM][NTf ₂]).....	118
8.6	Porównanie wydajności ekstrakcji wybranych analitów z zastosowaniem włókien SPME pokrytych różnymi strukturami polimerowych cieczy jonowych.....	119
8.6.1	Porównanie wydajności ekstrakcji alkoholi	121
8.6.2	Porównanie wydajności ekstrakcji estrów.....	124
8.6.3	Porównanie wydajności ekstrakcji związków karbonylowych	125
8.6.4	Określenie wybranych parametrów walidacyjnych.....	127
8.6.5	Oszacowanie wpływu grubości fazy stacjonarnej na wydajność ekstrakcji analitów.....	133
9	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	135
	STRESZCZENIE	139
	ABSTRACT.....	140
	DOROBEK NAUKOWY	141
	LITERATURA.....	149
	ZAŁĄCZNIK.....	161

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

Akronim/Skrót	Termin angielski	Termin polski
b.d.		Brak danych
BMIM	1-butyl-3-methylimidazol	1-butylo-3-metyloimidazol
CA	Cluster Analysis	Analiza skupień
CAR	Carboxen	Carboksen – faza stacjonarna typu węglowe sito molekularne
CDA	Canonical Discriminant Analysis	Kanoniczna analiza dyskryminacyjna
cP	Centypuaz	Centypuaz
CV	Coefficient of Variation	Współczynnik zmienności
Cz.d.a.		Czysty do analizy
DI-SPME	Direct Immersion SPME	Ekstrakcja SPME z fazy ciekłej
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction	Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz
DMSO- d_6	Deuterated dimethyl sulfoxide	Deuterowany dimetylosulfotlenek
DSC	Differential Scanning Calorimetry	Różnicowa kalorymetria skaningowa
DTA	Differential Thermal Analysis	Termiczna analiza różnicowa
DVB	Divinylbenzene	Diwinylobenzen
ECD	Electron Capture Detector	Detektor wychwytu elektronów
EMIM	1-ethyl-3-methylimidazol	1-etylo-3-metyloimidazol
EtOH	Ethanol	Etanol
FID	Flame Ionization Detector	Detektor płomieniowo-jonizacyjny
FPD	Flame Photometric Detector	Detektor płomieniowo-fotometryczny
GC	Gas Chromatography	Chromatografia gazowa
HS-SPME	Headspace SPME	Ekstrakcja SPME z fazy nadpowierzchniowej
IL	Ionic Liquid	Ciecz jonowa
IPA	Isopropyl alcohol	Propan-2-ol
IR	Retention Index	Indeks retencji
IS	Internal Standard	Wzorzec wewnętrzny
LDA	Linear Discriminant Analysis	Liniowa analiza dyskryminacyjna
LiNTf ₂	Lithium bis(trifluoromethanesulfonimide)	bis(trifluorometylosulfonylo)imidek litu
LLE	Liquid-liquid Extraction	Ekstrakcja ciecz-ciecz
LOD	Limit of Detection	Granica wykrywalności
LOQ	Limit of Quantification	Granica oznaczalności
Lp.		Liczba porządkowa
m/z	Mass/charge ratio	Stosunek masy (m) jonu do jego ładunku (z)
MeOH	Methanol	Metanol
MS	Mass Spectrometry	Spektrometria mas
NIST	National Institute of Standards and Technology (USA)	Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii (USA)

Akronim/Skrót	Termin angielski	Termin polski
PA	Polyacrylate	Poliakrylan
PCA	Principal Component Analysis	Analiza głównych składowych
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetylosiloksan
PEG	Polyethylene glycol	Glikol polietylenowy
PFBHA	o-2,3,4,5,6-pentafluorobenzylhydroxylamine	o-2,3,4,5,6-pentafluorobenzylhydroksyloamina
pH	logarithm of the hydrogen ion activity in a solution	Wykładnik stężenia jonów wodorowych
PIL	Polymeric Ionic Liquid	Polimerowa ciecz jonowa
PIL-SPME	Polymeric Ionic Liquid based Solid Phase Microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej wykorzystująca polimerowe ciecze jonowe
pKa	logarithmic measure of the acid dissociation constant	Ujemny logarytm dziesiętny ze stałej dysocjacji
poli([ViBDMAPYD][NTf ₂])	poly(1-(4-vinylbenzyl)-4-dimethylaminopyridinium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide	bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-(4-winylobenzyl)-4-dimetyloaminopirydynowy)
poli([ViBHDIM][NTf ₂])	poly(1-(4-vinylbenzyl)-3-hexadecylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl] imide	(bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-(4-winylobenzyl)-3-heksadecyloimidazoliowy)
poli([ViHDIM][NTf ₂])	poly(1-vinyl-3-hexadecylimidazolium bis[(trifluoromethyl) sulfonyl] imide	bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-winylo-3-heksadecyloimidazoliowy)
poli([ViHIM][Cl])	poly(1-vinyl-3-hexylimidazolium) chloride	chlorek poli(1-winylo-3-heksyloimidazoliowy)
poli([ViPBIM][Cl])	poly(1-vinyl-3-propylbenzylimidazolium) chloride	chlorek poli(1-winylo-3-propylobenzylimidazoliowy)
poli([ViPCIM][NTf ₂])	poly(1-vinyl-3-pentylcyanoimidazolium) bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide	bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-winylo-3-pentylcyanoimidazoliowy)
ppb	Part per bilion	Jednostka stężenia (1:10 ⁹)
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Politetrafluoroetylen (teflon)
R	Regression Coefficient	Współczynnik regresji
RSD	Relative Standard Deviation	Względne odchylenie standardowe
SCD	Sulfur Chemiluminescence Detector	Detektor chemiluminescencji siarki
SDME	Single-drop microextraction	Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli
SOM	Self Organizing Maps	Metoda samoorganizującego odwzorowania cech
SPME	Solid Phase Microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
TGA	Thermogravimetric Analysis	Analiza termogravimetryczna
v/v	Volume/volume	Stężenie objętościowe
WWA	Polycyclic aromatic hydrocarbons	Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

WSTĘP

Alkohol etylowy nie jest niezbędny do życia, aczkolwiek towarzyszy nam niemalże na każdym kroku. Roczne jego spożycie w Europie wynosi około 11 litrów czystego alkoholu na dorosłego mieszkańca [1]. Z uwagi na fakt, iż przemysł spożywczy to jedna z prężniej rozwijających się gałęzi gospodarki, badania produktów spożywczych zawsze będą zagadnieniem bardzo istotnym. Uwzględniając rozwój w zakresie technologii produkcji napojów alkoholowych i analizy instrumentalnej oraz dążenie przez producentów do uzyskania jak najczystszych, najlepszych pod względem organoleptycznym produktów, tematyka analizy produktów spirytusowych pozostaje wciąż aktualna, szczególnie, że wraz z rozwojem nauki wzrasta także świadomość społeczeństwa.

Idea podjęcia problemu oznaczania związków ubocznych procesu fermentacji alkoholowej w półproduktach i produktach alkoholowych zrodziła się na podstawie licznych kontaktów z krajowymi przedstawicielami przemysłu spirytusowego. Z kolei założenia pracy oparto na wymogach jakie stawia Unia Europejska przemysłowi spirytusowemu, znacznie rosnącej konkurencji na rynku alkoholowym oraz uwzględniając potrzeby marketingowe. Przy określaniu celu badawczego uwzględniono zarówno najnowsze doniesienia literaturowe oraz własne doświadczenia w tym zakresie, jak też ogólną potrzebę standaryzacji metod badania pochodzenia wybranych produktów.

Wraz z przystąpieniem Polski do Unii Europejskiej, producenci zobowiązani są do przestrzegania unijnych norm i przepisów, m.in. Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 178/2002, dotyczącego ogólnych zasad i wymagań prawa żywnościowego oraz Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 110/2008, dotyczącego definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów [2,3]. Wymogi Unii Europejskiej stawiane produktom spożywczym stają się normą prawną, a każde odstępstwo od nich grozi konsekwencjami karnymi. Zatem zamierzenie producentów do podawania na etykiecie wyrobu, także surowca z którego jest on produkowany, niesie za sobą konieczność weryfikacji pochodzenia destylatów rolniczych wyprodukowanych w lokalnych gorzelniach rolniczych. Skupowanie przez zakłady produkcyjne destylatów rolniczych z lokalnych gorzelnii jest zjawiskiem powszechnym, bowiem często duże fabryki nie posiadają własnego zaplecza do produkcji destylatów rolniczych bądź dysponują tylko jedną gorzelnią przyzakładową, która nie jest w stanie samodzielnie zapewnić ciągłości produkcji. Zwykle w trakcie dostawy destylatu rolniczego gorzelnik przedkłada specjalne zaświadczenie o jego pochodzeniu surowcowym. Zdarza się jednak dostarczanie (np. z uwagi na brak określonego

surowca w danym okresie, czy też z chęci większego zarobku lub dla spełnienia aktualnych oczekiwań przedstawicieli przemysłu) destylatu produkowanego z innego surowca niż zamawiany, bądź mieszanego z kilku różnych surowców. Wobec tego aby weryfikować pochodzenie surowcowe destylatów należałoby kontrolować każdy cykl fermentacyjny w gorzelnii rolniczej, co jest praktycznie niemożliwe (destylaty rolnicze w kraju produkuje ok. kilkadziesiąt gorzelnii). Kontrolę pochodzenia surowcowego destylatów rolniczych rozwiązałoby opracowanie prostej i szybkiej metody pozwalającej na przeprowadzenie analizy już podczas dostawy destylatu.

Z punktu widzenia konsumenta ważna jest również jakość wybranych napojów spirytusowych dostępnych na krajowym rynku. Człowiek, poza smakiem i zapachem nie wykształcił w sobie innych umiejętności rozróżniania substancji pozytywnie i negatywnie oddziaływujących na jego zdrowie. Dlatego też wspomniane cechy decydują głównie o akceptacji konsumentki i są ściśle związane ze składem chemicznym mieszaniny. Zasadne zatem staje się powiązanie składu chemicznego gotowego produktu spirytusowego z jego jakością. Przykładowo, związkom karbonylowym przypisywany jest niekorzystny wpływ na właściwości sensoryczne produktów alkoholowych. Nadają one wyrobom spirytusowym nieprzyjemny, drażniący zapach i smak. Większość zakładów produkcyjnych wciąż korzysta z kolorymetrycznej metody oznaczania sumarycznej zawartości aldehydów w przeliczeniu na aldehyd octowy. Jednakże wyniki otrzymane tą metodą mogą być obarczone błędem spowodowanym np. występowaniem substancji przeszkadzających – związków nienasyconych i substancji o charakterze redukującym. Ponadto metoda kolorymetryczna nie określa zawartości poszczególnych aldehydów w próbce. Interesujące zatem byłoby oznaczenie zawartości poszczególnych aldehydów, a tym samym określenie ich wpływu na jakość wyrobów. Wdrożenie proponowanego podejścia do zakładowych metod kontroli jakości mogłoby być cennym źródłem informacji dotyczących efektywności prowadzenia procesu rektyfikacyjnego.

Zauważony przez producentów potencjał analizy instrumentalnej spowodował ich dążenie do wdrażania w zakładowych laboratoriach metodyk, które pozwoliłyby obniżyć granice wykrywalności i oznaczalności głównych zanieczyszczeń produktów spirytusowych. Obniżenie granic wykrywalności produktów ubocznych powstających podczas procesu fermentacji alkoholowej w produktach spirytusowych, umożliwi szczegółową i kompleksową analizę całego procesu produkcyjnego. Szczegółowa analiza wyników frakcji lotnej produktów o określonych cechach (np. pochodzących z danej gorzelnii, produkowanych z wykorzystaniem określonych enzymów czy też przy różnych parametrach procesu,

rektyfikatów otrzymanych z różnych destylatów oraz gotowych napojów alkoholowych) powinna mieć bardzo duże zastosowanie praktyczne. Do tej pory w laboratoriach przemysłowych stosowane są metody umożliwiające oznaczanie produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej na poziomie stężeń rzędu mg/dm^3 , podczas gdy coraz częściej destylaty i inne produkty spirytusowe zawierają mniejsze ilości zanieczyszczeń (rzędu $\mu\text{g/dm}^3$ i niższe). Dlatego też wciąż poszukiwane są nowe rozwiązania w zakresie przygotowywania próbek do analizy umożliwiające izolację i wzbogacanie analitów z próbek. Poszukując odpowiedniej techniki ekstrakcyjnej priorytetowe staje się dążenie do spełniania dwóch zasadniczych kryteriów: otrzymania wysokiej selektywności i wydajności ekstrakcji oznaczanych związków, nawet ze skomplikowanej matrycy oraz zmniejszenia bądź wyeliminowania stosowania toksycznych rozpuszczalników. Założenia te spełnia m.in. technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME). Choć ta technika izolacji i wzbogacania analitów została opracowana już ponad 20 lat temu, to wciąż cieszy się wzrastającą popularnością. Czasem jednak handlowo dostępne fazy stacjonarne w SPME nie zapewniają oczekiwanego wzbogacenia i selektywnej izolacji oznaczanych analitów. Widząc konieczność poszukiwania nowych, bardziej selektywnych materiałów sorpcyjnych i zauważając potencjał polimerowych cieczy jonowych postanowiono wykorzystać w niniejszej rozprawie doktorskiej innowacyjne włókna SPME pokryte różnymi strukturami polimerowych cieczy jonowych w celu opracowania czulej metody ekstrakcji głównych, ubocznych produktów fermentacyjnych. Polimerowe ciecze jonowe i ich mery cieszą się coraz większą popularnością, głównie ze względu na ich niską prężność par, wysoką stabilność termiczną oraz ponad dwukrotnie większą lepkość w porównaniu z tradycyjnie stosowanymi rozpuszczalnikami.

Biorąc pod uwagę wyraźną potrzebę doskonalenia metod kontroli jakości na każdym etapie produkcji oraz fakt, iż do tej pory tylko nieliczne z opracowanych metod spełniają oczekiwania producentów, postanowiono podjąć problemem analityczny dotyczący kompleksowej analizy produktów spirytusowych. W związku z tym w ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto zagadnienia badawcze mające na celu:

- opracowanie metod pozwalających na rozróżnianie pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych na podstawie składu poszczególnych produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej,
- opracowanie przystępnej, przemysłowej metody oznaczania wybranych związków karbonylowych oraz określenie korelacji pomiędzy zawartością związków karbonylowych w wódkach czystych, a ich jakością sensoryczną,

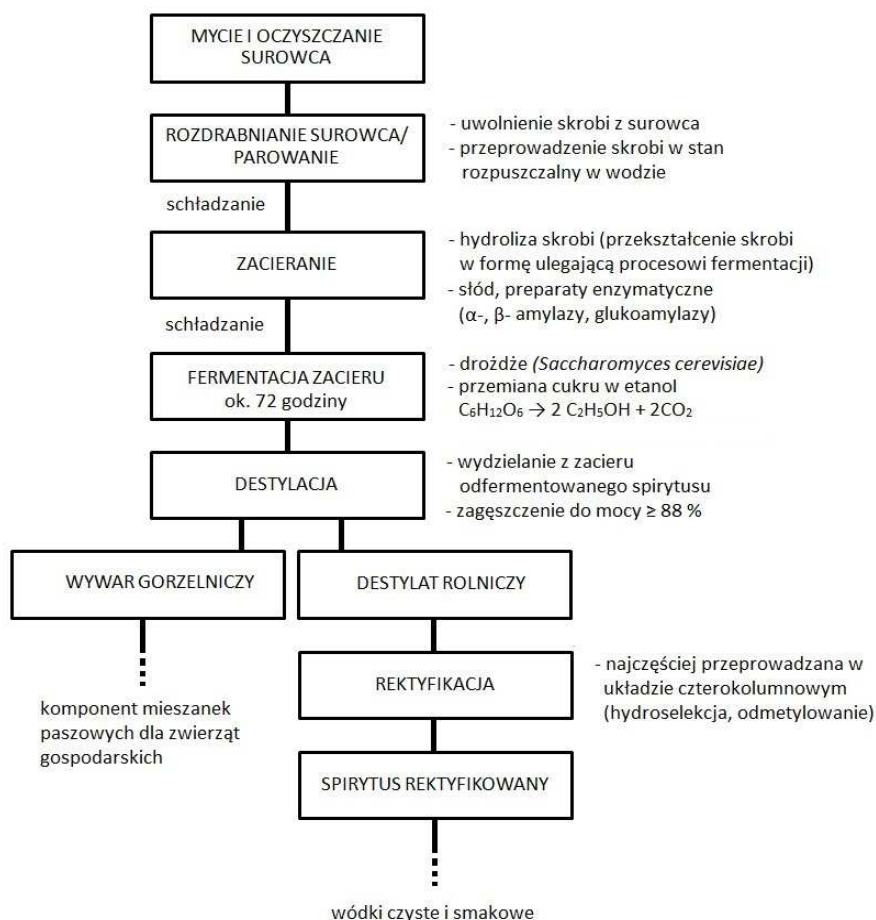
- opracowanie procedury oznaczania głównych związków ubocznych procesu fermentacji alkoholowej w produktach spirytusowych z wykorzystaniem włókien SPME pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi.

Uwzględniając obecny stan wiedzy w tym zakresie można stwierdzić, że podjęte w niniejszej rozprawie doktorskiej problemy analizy produktów spirytusowych charakteryzują się dużą innowacyjnością, a opracowane metodyki powinny ułatwić kompleksową charakterystykę produktów spirytusowych na każdym etapie ich produkcji.

I CZĘŚĆ TEORETYCZNA

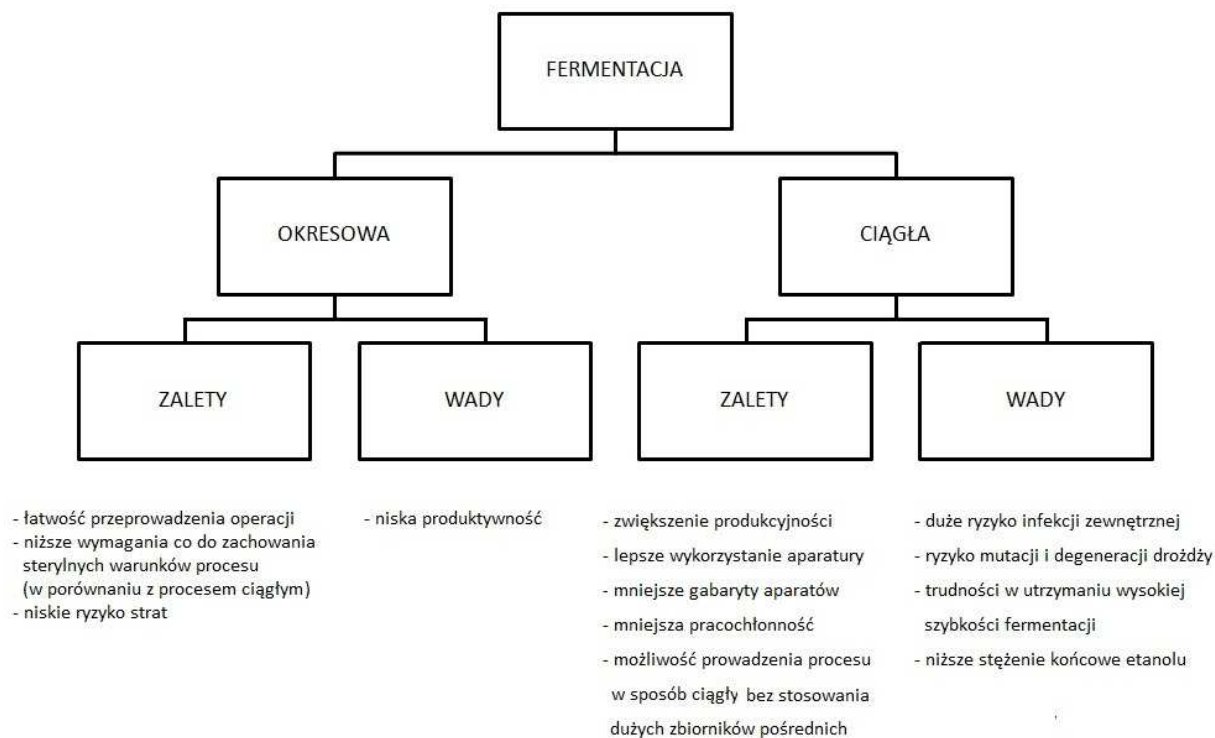
1 ZARYS TECHNOLOGII WYTWARZANIA SPIRYTUSU

Przemysłowa metoda otrzymywania spirytusu obejmuje dwa zasadnicze etapy: otrzymanie destylatu rolniczego w gorzelniach rolniczych oraz jego późniejszą rektyfikację. Surowcami wykorzystywanymi do produkcji etanolu mogą być wszystkie produkty zawierające cukry. Najczęściej jednak stosuje się te, które zawierają monosacharydy bądź skrobię tj. ziemniaki i zboża [4,5]. Stosowana w gorzelniach technologia przerobu surowców skrobiowych na spirytus wynika z charakteru stosowanego surowca oraz z właściwości skrobi. Cena i zawartość skrobi w surowcu jest zatem głównym czynnikiem decydującym o kosztach produkcji destylatu rolniczego. Proces technologiczny produkcji destylatu rolniczego polega na przygotowaniu i przekształceniu surowca w postać przydatną do fermentacji alkoholowej, a następnie na odpędzaniu z zacieru otrzymanego etanolu [6].



Rys. 1. Uproszczony schemat przemysłowego otrzymywania spirytusu [7,8]

Fermentacja etanolowa oraz rektyfikacja mogą być prowadzone różnymi metodami m.in. metodą ciągłą próżniową, ciągłą z recyrkulacją, próżniową ciągłą z recyrkulacją, okresową, okresową z recyrkulacją bądź też metodą ciągłą wielostopniową. Obecnie, w praktyce przemysłowej najczęściej stosuje się metodę hodowli okresowej, zawracanie biomasy oraz hodowlę ciągłą.



Rys. 2. Główne wady i zalety procesu fermentacji ciągłej i okresowej [9]

Otrzymane w wyniku fermentacji etanolowej roztwory etanolu należy zatężyć i oczyścić od niepożądanych składników towarzyszących. Powszechnie w tym celu stosuje się proces rektyfikacji polegający na wielokrotnej destylacji spirytusu surowego. Kolumna rektyfikacyjna może pracować w sposób ciągły lub okresowy [10]. W kolumnie rektyfikacyjnej zachodzi przeciwrządowy proces wymiany ciepła i masy, pomiędzy spływającą cieczą, a wznoszącą się parą. W trakcie tego procesu ciecz zuboża się w składnik lotny i wzbogaca w składnik wyżejwrzący kosztem ciepła skraplania pary. Para zaś wzbogaca się w składnik bardziej lotny, kosztem odparowania z cieczy i zubożenia o składnik wrzący w wyższej temperaturze. Wymiana ta zachodzi w odpowiednim stosunku ilościowym [10]. Zatężanie etanolu poprzez rektyfikację możliwe jest jedynie do stężenia azeotropowego. Pod normalnym ciśnieniem temperatura wrzenia mieszaniny azeotropowej etanol – woda, zawierającej 96,5 % masowych etanolu, wynosi 78,15 °C [9].

Rektyfikacja najczęściej przeprowadzana jest w układzie czterokolumnowym z wykorzystaniem procesów hydroselekcji i odmetylowania. Surowiec wraz z wodą odwarową z kolumny rektyfikacyjnej oraz z wodą procesową podawany jest do górnej części kolumny hydroselekcyjnej. Na tym etapie procesu destylat rolniczy rozcieńczany jest do około 10-15 %. Następuje wywołana dużym rozcieńczeniem destylatu zmiana lotności większości zanieczyszczeń spirytusu surowego i przemieszczenie ich w górę kolumny, skąd usuwane są z układu rektyfikacyjnego i przesyłane do dalszej obróbki do kolumny spirytusu porektyfikacyjnego. Z dołu kolumny hydroselekcyjnej odbiera się wstępnie oczyszczony spirytus, który podawany jest do kolumny rektyfikacyjnej, gdzie ulega wzmocnieniu i oczyszczeniu z pozostałych przedgonów i fuzli. Kolejnym etapem jest odmetylowanie spirytusu i usunięcie pozostałych w destylacie związków przedgonowych. W efekcie otrzymuje się czysty spirytus, którego jakość ściśle zależy od warunków prowadzenia procesu rektyfikacji [8].

2 SUROWCE WYKORZYSTYWANE W PROCESIE PRODUKCJI SPIRYTUSU

Rodzaj surowców wykorzystywanych w procesie produkcji spirytusu jest kolejnym czynnikiem, który wpływa na wydajność całego procesu produkcyjnego oraz jakość otrzymanego wyrobu (ilościowy i jakościowy skład produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej). W polskim gorzelnictwie najczęściej wykorzystuje się surowce skrobiowe bądź cukrowe, rzadziej surowce zawierające inne węglowodany np. inulinę. Do produkcji etanolu najczęściej wykorzystuje się rośliny wiechlinowate m.in. żyto, pszenżyto, pszenicę, jęczmień, kukurydzę, a nawet sorgo, jak też rośliny bulwiaste m.in. ziemniaki, buraki czy też topinambur. Sporadycznie do produkcji etanolu wykorzystywane są również surowce przemysłowe, takie jak melasa oraz surowce odpadowe, takie jak czerstwy chleb, zepsute dżemy, kompoty, czekolada oraz orzechy [11]. Zawartość węglowodanów ulegających procesowi fermentacji jest ważnym czynnikiem decydującym o wydajności procesu, dlatego też ich ilość obecna w surowcu jest jednym z kryteriów branych pod uwagę w trakcie wyboru surowca gorzelniczego. W powszechnie wykorzystywanych surowcach rolniczych zawartość węglowodanów waha się w granicach 20-60 %. Drugą istotną cechą wyboru określonego surowca jest jego cena, z uwagi na fakt, iż to głównie ona determinuje całkowity koszt produkcji etanolu (ok. 76 % kosztów produkcji etanolu to koszty zakupu surowca) [12].

2.1 Surowce zbożowe

W polskim rolnictwie około 70-75 % zasiewów stanowi uprawa zboża. Wstępnie szacuje się, że całkowita powierzchnia upraw różnego rodzaju zbóż wynosi ponad 8,1 mln ha co sprawia, że Polska jest czołowym producentem zbóż w Unii Europejskiej. Powierzchnia uprawy podstawowych gatunków zbóż w roku 2010 (dla kukurydzy w 2009) wynosiła:

- pszenica \approx 2,4 mln ha,
- żyto \approx 1,4 mln ha,
- jęczmień \approx 1,1 mln ha,
- owies \approx 0,5 mln ha,
- pszenżyto \approx 1,3 mln ha,
- mieszanki zbożowe \approx 1,4 mln ha,
- kukurydza \approx 0,32 tys. ha,

a plony zebrane w jej wyniku szacowane były na: 15935,6 – 16662,8 tys. ton – zboża ozime oraz 9202,1 – 9469,1 tys. ton – zboża jare. W roku 2010 największe plony uzyskano z uprawy pszenicy (ozime: 7869,5 – 8226,2 tys. ton, jare: 1271,4 – 1310,1 tys. ton), następnie pszenżyta (ozime: 3815,0 – 3957,3 tys. ton, jare: 321,6 – 331,7 tys. ton), mieszanek zbożowych (ozime: 189,5 – 201,9 tys. ton, jare: 3534,0 – 3662,9 tys. ton), żyta (ozime: 3281,5 – 3476,8 tys. ton), jęczmienia (ozime: 780,0 – 800,6 tys. ton, jare: 2753,7 – 2778,2 tys. ton) oraz kukurydzy (1800 tys. ton) [13,14].

2.1.1 Żyto (*Secale L.*)

Obecnie żyto należy do surowców najczęściej wykorzystywanych w gorzelnictwie, choć traktowane jest głównie tak jak pszenica, jako zboże chlebowe. Roślina ta wywodzi się z Azji i liczy około 10 gatunków [15]. Zboże to jest drugą co do wielkości najbardziej rozpowszechnioną rośliną uprawianą na terenie Polski. Skład chemiczny ziarna żyta może dość znacznie się wahać. Przeciętną zawartość skrobi, cukrów fermentujących, błonnika, białka, tłuszczu oraz związków mineralnych przedstawiono w tabeli 1 (str. 22). Zawarta w życie stosunkowo duża ilość związków fosforu, manganu, potasu, magnezu oraz wapnia, jest czynnikiem determinującym możliwość fermentacji zacieru żytniego bez stosowania pożywek dla drożdży. Ponadto ziarno to zawiera dużą zawartość enzymów amylolitycznych potrzebnych do scukrzania ziarna, dlatego zboże to czasem wykorzystywane jest przez

gorzelników do produkcji siodu [5]. Przeprowadzone przez naukowców badania wykazały, że destylat rolniczy otrzymany z żyta cechuje się pięciokrotnie niższą zawartością metanolu niż spirytus otrzymany z ziemniaków. Ponadto zawiera on mniej aldehydów niż spirytus ziemniaczany otrzymany z dodatkiem melasy. Badania porównawcze wykazały również, że wzrost mocy spirytusu żytniego (powyżej 93 % v/v) powoduje znaczące zmniejszenie zawartości olejów fuzlowych [16]. Jednakże z uwagi na fakt, iż niewielkie ilości olejów fuzlowych mają pozytywny wpływ na jakość sensoryczną spirytusu, zaleca się utrzymywanie mocy spirytusu poniżej 93 % [17].

2.1.2 Jęczmień (*Hordeum L.*)

Jęczmień pochodzi z Azji i liczy ok. 25 gatunków. Ma stosunkowo małe wymagania klimatyczne i glebowe. Stosowany jest głównie w krajach anglosaskich do produkcji whiskey. W gorzelniach rolniczych stanowi raczej rodzaj surowca pomocniczego. W Polsce głównie stosowany jest jako surowiec paszowy. Jeśli jednak chodzi o przemysł alkoholowy, to szerzej wykorzystywany jest w browarnictwie niż gorzelnictwie [18]. Warto zauważyć, że jęczmień cechuje się wysoką zawartością błonnika (tab. 1 str. 22). Fakt ten sprawia, że zboże to powoduje trudności w procesie parowania surowca, fermentacji i destylacji odfermentowanych zacierów jęczmiennych [5].

2.1.3 Pszenica (*Triticum L.*)

Zboże to wywodzi się z południowo-zachodniej i środkowej Azji i liczy niemalże 20 gatunków. Jest jednym z najstarszych zbóż chlebowych. Jako surowiec do produkcji spirytusu jest mniej popularne niż żyto pomimo, iż jest surowcem bardziej wydajnym. Alkohol wytwarzany z pszenicy charakteryzuje się bardzo dobrą jakością. Procentowy skład chemiczny pszenicy jest podobny do składu chemicznego żyta (tab. 1 str. 22). Zboże to, ze względu na wysoką zawartość związków mineralnych, podobnie jak żyto, umożliwia prowadzenie procesu fermentacji alkoholowej bez dodatku pożywek mineralnych do zacierów [5].

2.1.4 Owies (*Avena L.*)

Zboże to wywodzi się z Azji Środkowej i liczy ponad 30 gatunków. Większa niż w jęczmieniu, zawartość włókna, sprawia że surowiec ten powoduje trudności w prowadzeniu procesu fermentacji. Stosunkowo wysoka zawartość tłuszczu sprawia, iż sód wyprodukowany z owsa zapobiega nadmiernemu pienieniu się w czasie procesu fermentacji [5].

2.1.5 Kukurydza (*Zea*)

Kukurydza jest jednym z najbardziej wydajnych surowców zbożowych o składzie chemicznym podobnym do żyta i pszenicy (tab. 1 str. 22). Jest zbożem uprawianym na wielką skalę w wielu rejonach świata. W Polsce, z uwagi na stosunkowo chłodny klimat, powierzchnia jej uprawy nie jest zbyt duża. Większość zbiorów kukurydzy przeznaczana jest na produkcję paszy dla zwierząt, jednakże często wykorzystuje się ją również w przemyśle gorzelniczym [18]. Ponadto wykorzystuje się ją w przemyśle papierniczym, młynarskim, materiałów budowlanych oraz coraz częściej krochmalniczym i energetycznym. Uprawa kukurydzy ukierunkowana na ziarno ma liczne zalety, m.in. nadaje się do uprawy na glebach słabych i odłogowych, daje wysokie plony oraz możliwość pozyskania przez rolników wysokich dopłat na jej uprawę. Istotnym argumentem przeważającym na korzyść uprawy kukurydzy jest również możliwość zagospodarowania ziarna nadpsutego i o niższej wartości paszowej (np. zawilgoconego w magazynie) [19].

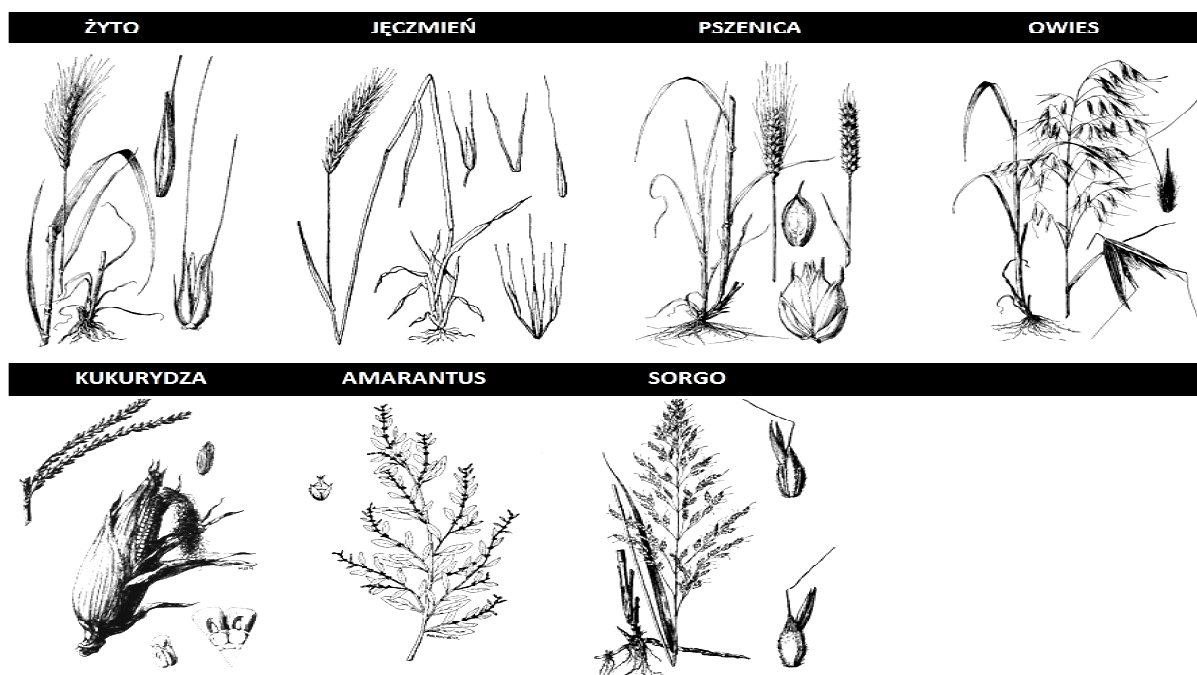
2.1.6 Amarantus (*Amaranthus*)

Amarantus pochodzący z Ameryki Południowej zaliczany jest do nietypowych surowców gorzelniczych. Jest cenionym źródłem składników mineralnych, nienasyconych kwasów tłuszczowych i antyoksydantów. Skład chemiczny amarantusa zbliżony jest do składu typowych surowców zbożowych. Wydajność etanolu z ziaren amarantusa przewyższa wartość 35 dm³/100 kg. Spirytus otrzymany z ziaren amarantusa cechuje się niską zawartością metanolu, aldehydów, estrów oraz stosunkowo wysoką zawartością olejów fuzlowych w odniesieniu do destylatów produkowanych z sorgo. Zawartość olejów fuzlowych jest nieco niższa niż w przypadku spirytusu surowego otrzymanego z orzechów włoskich oraz topinamburu [20]. Inne badania wykazują, iż alkohol otrzymany z amarantusa cechuje się

niższą jakością od spirytusu otrzymywanego z żyta i pszenżyta. Zawiera on większe ilości aldehydów i estrów, natomiast mniejsze ilości 2- i 3-metylobutanolu. Dużą zaletą jest czas fermentacji zacierów z amarantusa, które w porównaniu z zacierami z żyta i pszenżyta fermentują najszybciej [21]. W przypadku ograniczonego dostępu do powszechnie wykorzystywanych surowców gorzelnicznych, amarantus wraz z sorgo stanowią atrakcyjną alternatywę dla producentów spirytusu [20].

2.1.7 Sorgo (*Sorghum Moench*)

Sorgo pochodzi z Afryki. Uprawia się je na wilgotnych terenach strefy równikowej, zwrotnikowej i podzwrotnikowej. Ze względu na wysokie wymagania klimatyczne roślina ta nie jest uprawiana w Polsce na szeroką skalę. W Polsce nie ma również zarejestrowanych odmian sorgo. W krajowych gorzelniach rolniczych stosowane na szerszą skalę było w latach powojennych. Jednakże obecnie zboże to stosowane jest sporadycznie, pomimo faktu, iż zbliżony skład chemiczny do kukurydzy sprawia, że wydajność otrzymanego etanolu z wykorzystaniem sorgo przewyższa $40 \text{ dm}^3/100 \text{ kg}$ (tab. 1 str. 22) [5, 20]. Ponadto destylaty produkowane z sorgo cechują się brakiem zawartości akroleiny i niską zawartością innych aldehydów [22].



Rys. 3. Podstawowe gatunki zbóż wykorzystywane w gorzelnictwie [23]

2.2 Surowce okopowe

Rośliny okopowe mają duże znaczenie gospodarcze i uprawia się je zazwyczaj z przeznaczeniem na pokarm. Częścią użytkową tych roślin są podziemne bulwy (ziemniaki, topinambur) i korzenie (buraki). Wykorzystanie surowców okopowych w gorzelnictwie z roku na rok maleje, z uwagi na konkurencyjność cen zbóż i porównywalną wydajność otrzymywanego z nich etanolu.

2.2.1 Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.)

W Polsce, z uwagi na dogodne warunki glebowe, ziemniaki uprawiane są od końca XVII wieku. Znajdują zastosowanie głównie w przemyśle spożywczym i skrobiowym. W okresie międzywojennym stanowiły główny surowiec do produkcji alkoholu etylowego. Obecnie jednak wykorzystanie ziemniaków w gorzelnictwie spada. Powodem jest zrównanie cen zbóż i ziemniaków, jak też mniejsza wydajność etanolu produkowanego z ziemniaków. Maleje również zainteresowanie wywarem gorzelnicznym z ziemniaków z przeznaczeniem na paszę. Do produkcji spirytusu mogą być wykorzystywane również odpady powstające przy produkcji przetworów spożywczych z ziemniaków. Cechy te sprawiają, że ziemniaki stosunkowo chętnie wykorzystuje się do produkcji biopaliw [24-26]. Bulwa ziemniaka zawiera kwasy organiczne oraz niezbędne składniki pozwalające na sprawne prowadzenie fermentacji. Aż 94,25 % masy stanowi woda oraz węglowodany ulegające procesowi fermentacji, resztę stanowią nieskrobiowe składniki masy ziemniaka (tab. 1 str. 22). Wykorzystywane w gorzelnictwie ziemniaki powinny cechować się wysoką zawartością skrobi oraz dobrą odpornością na choroby, które prowadzą do osłabienia procesów i właściwości odpornościowych [18]. Wadą odmian wysokoskrobiowych jest stosunkowo gruba warstwa komórek skorkowaciałych (chroniących bulwy przed wysychaniem oraz zarażaniem), która może powodować gnicie bulwy ziemniaka [6].

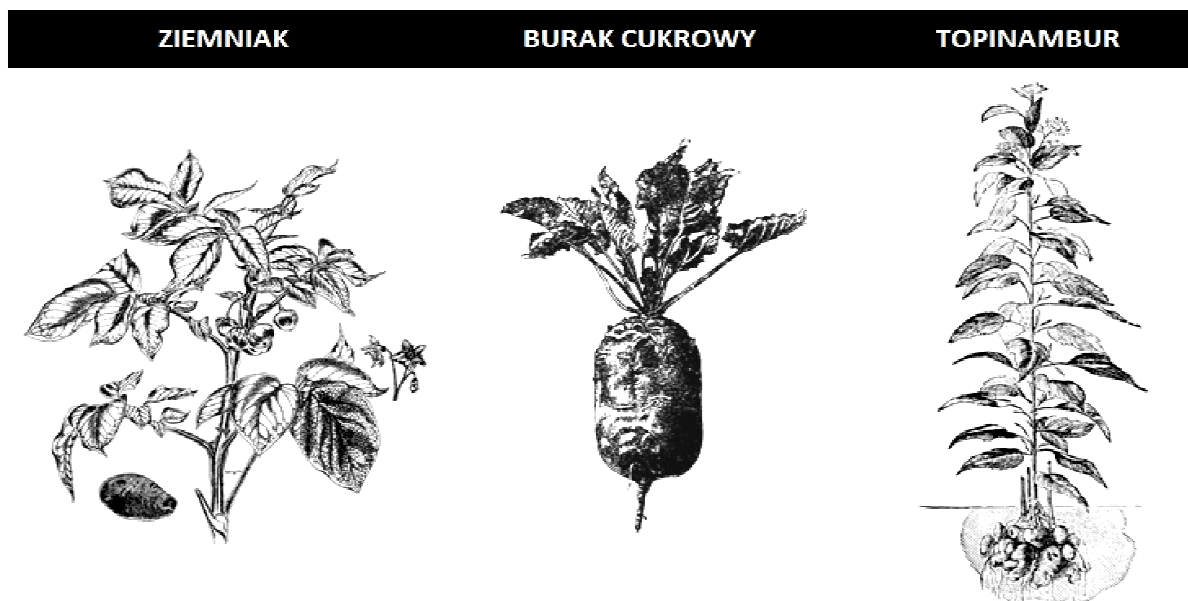
2.2.2 Burak cukrowy (*Beta vulgaris* L.)

Buraki cukrowe zajmują drugie miejsce na świecie, zaraz po trzcinie cukrowej, jako surowce wykorzystywane do produkcji cukru. Zazwyczaj ich wykorzystanie w gorzelnictwie jest niewielkie. Z reguły stosuje się je tylko w przypadku niemożności przerobu buraka na

cukier. Spirytus produkowany z buraków cukrowych cechuje się stosunkowo wysoką zawartością metanolu [5]. Ponadto faktem przemawiającym na niekorzyść wykorzystywania buraków cukrowych w gorzelnictwie są trudności w prowadzeniu procesu fermentacji, które wynikają z braku odpowiedniej infrastruktury do wypłukiwania cukru z buraków [18].

2.2.3 Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.)

Roślina ta, znana również pod nazwą słonecznik bulwiasty, zaliczana jest do nietypowych surowców gorzelniczych. W Polsce występują odmiany Albik oraz Rubik [22]. W bulwach topinamburu znajduje się od 13-17 % inuliny. Zawartość innych składników, z wyjątkiem włókna, zbliżona jest do składu chemicznego ziemniaków, jednak koszty prowadzenia plantacji topinamburu są ok. pięciokrotnie niższe niż w przypadku uprawy ziemniaków [11]. Pomimo tej cechy surowiec ten nie jest często wykorzystywany w gorzelnictwie. Sprawia on stosunkowo duże trudności w prowadzeniu procesu fermentacji, wynikające z faktu, że inulina w podwyższonej temperaturze łatwo hydrolizuje do fruktozy i ulega karmelizacji [5]. Badania prowadzone przez samodzielną pracownię gorzelniczą w Bydgoszczy wykazały, iż w destylatach produkowanych z topinamburu odmiany Albik nie wykryto akroleiny [22].



Rys. 4. Rośliny okopowe wykorzystywane w gorzelnictwie [27, 28]

Tab. 1. Skład chemiczny surowców do produkcji etanolu [5, 20, 29, 30]

SKŁAD CHEMICZNY	ŻYTO	PSZENICA	JĘCZMIĘŃ		BURAK CUKROWY	AMARANTUS
			gruboziarnisty	drobnoziarnisty		
skrobia i cukry fermentujące [%]	54-60	56-60	55	52	13-20	52,5
włókno (błonnik) [%]	1,9	1,9	9,3	12,6	1,2	b.d.
białko [%]	11	12	3,4	6,4	1,2	b.d.
tłuszcz [%]	2	1,6	1,8	2,3	b.d.	7,8
związki mineralne [%]	2	1,7	1,7	1,9	0,7	b.d.
Wydajność EtOH [dm ³ /100 kg]	35	38	35,05		16	35,1
SKŁAD CHEMICZNY	OWIES	WYMOK	KUKURYDZA	SORGO	ZIEMNIAKI	TOPINAMBUR
skrobia i cukry fermentujące [%]	35-52	60-66	58-62	65-72	14-18	10,3-10,6 (inulina)
włókno (błonnik) [%]	13	2,3	8-10,6	9,0-14	0,9	b.d.
białko [%]	10,3	6,4-8,5	2,2	2,8-8	2	b.d.
tłuszcz [%]	7	1,7	3,2-4,3	2,9	0,15	0,1
związki mineralne [%]	2,7	0,3	1,2	1,5-3	1	b.d.
pentozy i inne cukry niefermentujące [%]	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	1,7	b.d.
Wydajność EtOH [dm ³ /100 kg]	26,54	b.d.	42	40,4	11	6,02-6,2

b.d. – brak danych

2.3 Surowce pochodzenia przemysłowego

Do produkcji spirytusu mogą być również wykorzystywane surowce pochodzenia przemysłowego. Do ważniejszych surowców pochodzenia przemysłowego można zaliczyć:

- melasę,
- odpady przemysłu owocowo-warzywnego,
- odpady przemysłu piekarniczego,
- odpady przemysłu młynarskiego,
- odpady przemysłu celulozowego.

2.3.1 Melasa

Melasa to ciemnobrunatna ciecz będąca produktem odpadowym przy produkcji cukru. Jej głównym składnikiem jest sacharoza (ok. 50 %). Obok sacharozy melasa zawiera również dwa inne cukry: rafinozę i cukier inwertowany (mieszanina glukozy i fruktozy), a także związki mineralne (sole potasu, magnezu i wapnia) [5, 7]. W celu obniżenia kosztów produkcji, melasa sporadycznie dodawana jest przez gorzelników do zacierów ziemniaczanych i zbożowych. Jednak spirytus z przeznaczeniem do wyrobu wysokogatunkowych produktów spirytusowych nie może być produkowany z dodatkiem melasy [5].

2.3.2 Odpady przemysłu owocowo-warzywnego

Odpady przemysłu owocowo-warzywnego wykorzystywane w gorzelnictwie rolniczym to przede wszystkim, powstające przy produkcji moszczów w trakcie produkcji win i soków – wytloki jabłkowe, przeterminowane i spleśniałe dzemy oraz przeterminowane kompoty. Surowce te zawierają stosunkowo niską ilość cukrów fermentujących. Ponadto rolnicy nie mają możliwości ich magazynowania z uwagi na fakt, iż szybko ulegają procesowi samorzutnej fermentacji prowadzącej do powstania kwasu mlekowego. Fakt ten sprawia, że odpady te nie są surowcem podstawowym do produkcji spirytusu – stanowią zwykle surowiec uzupełniający – i dodawane są raczej sporadycznie [5].

2.3.3 Odpady przemysłu piekarniczego i młynarskiego

Do tej grupy surowców można zaliczyć pieczywo, które nie zostało wykupione ze sklepów oraz mąkę. Surowce te są bardzo rzadko wykorzystywane w gorzelnictwie rolniczym. Dodatek spleśniałego i czerstwego chleba znacznie obniża wydajność i jakość produkowanego destylatu [18]. Mąka natomiast przerabiana na etanol jest tylko w sytuacji, w której nie nadaje się ona do wypieku pieczywa lub mieszanek paszowych. Mąka, w zależności od rodzaju zboża jak i stopnia jej przemiału jest surowcem, którego skład chemiczny jest bardzo zróżnicowany. Warunkuje to konieczność analizy składu mąki przed zakupem partii. Pomimo stosunkowo wysokiej zawartości skrobi zacierzy z mąki fermentują

że, bądź nie fermentują wcale. Spowodowane jest to faktem, iż surowiec ten cechuje się niską jakością – nie nadaje się do spożycia ani przerobu na paszę [5, 6].

Tab. 2. Skład chemiczny surowców przemysłu piekarniczego i młynarskiego [5]

SKŁAD CHEMICZNY	MAKA PSZENNA	MAKA ŻYTNIA	CHLEB PSZENNY	CHLEB ŻYTNI
skrobia i cukry fermentujące [%]	65-74,5	61,6-73,2	45,1-48,1	44,9-49,3
włókno (błonnik) [%]	0,1-1,7	0,2-1,7	0,2-1,5	0,9-1,4
białko [%]	8,9-11	5,9-8,9	8,1-8,7	5,7-9,5
tłuszcz [%]	1,0-2	0,7-1,6	0,7-1,7	0,8-1
związki mineralne [%]	0,4-1,5	0,4-1,6	1,5-1,8	1,4-1,6
Wydajność EtOH [dm ³ /100 kg]	b.d.	b.d.	19,7-37,7	

b.d. – brak danych

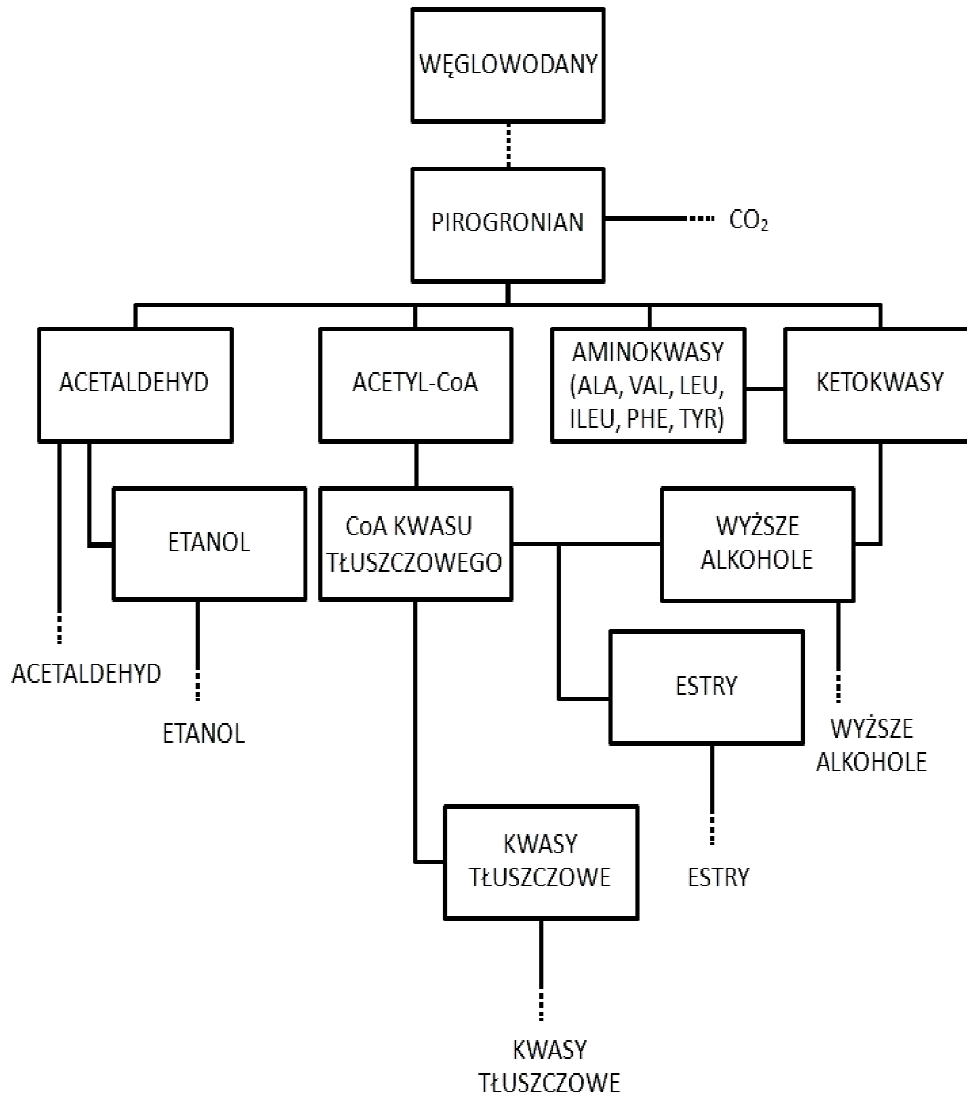
2.3.4 Odpady przemysłu celulozowego

Ługi posiarzynowe stanowią produkt uboczny przy produkcji drewna metodą siarczynową. W ich skład wchodzi glikoza powstająca z niepełnej hydrolizy celulozy, pentozany oraz kwas octowy i mrówkowy. Wydajność etanolu ze 100 litrów ługu celulozowego wynosi tylko 1 dm³ [18].

3 PRODUKTY UBOCZNE PROCESU FERMENTACJI ALKOHOLOWEJ

W zależności od rodzaju i jakości surowców użytych do produkcji, stosowanej metody, warunków prowadzenia procesu technologicznego i warunków przechowywania, jak też starzenia się alkoholi oraz rodzaju produkowanego trunku, napoje alkoholowe różnią się składem niektórych ubocznych produktów procesu fermentacji. Związki te mogą nadać napojowi alkoholowemu niepowtarzalny aromat bądź pogorszyć właściwości organoleptyczne napoju, nadając mu nieprzyjemny zapach i smak. Źródłem lotnych związków obecnych w napojach alkoholowych są różnorodne procesy biologiczne, enzymatyczne, mikrobiologiczne, chemiczne i termiczne zachodzące przed, w trakcie i po

procesie fermentacji alkoholowej surowców. Do najważniejszych klas związków chemicznych występujących w napojach alkoholowych zalicza się estry, aldehydy, wyższe alkohole, związki siarki oraz kwasy organiczne.



Rys. 5. Prekursory, półprodukty oraz produkty uboczne powstające podczas procesu fermentacji alkoholowej węglowodanów w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [31]

3.1 Estry

Estry są związkami powstałymi w czasie reakcji estryfikacji, z połączenia kwasów i alkoholi obecnych w produktach fermentacji. Estry występują w śladowych ilościach w napojach fermentowanych, jednak są niezwykle ważne, ze względu na ich intensywny zapach, który nadają finalnym produktom alkoholowym. Z uwagi na występowanie estrów w napojach alkoholowych w obrębie ich granicy wyczuwalności, nawet niewielkie wahania w stężeniach estrów obecnych w trunkach, dają widoczne efekty w aromacie napoju. Również obecność estrów poniżej granicy wyczuwalności nie pozostaje bez ich wpływu na zapach. Dzięki działaniu synergistycznemu tych związków można stwierdzić, iż obecność estrów, które znajdują się w napoju alkoholowym na poziomie niższym niż próg wyczuwalności, również ma wpływ na zapach napoju alkoholowego [32]. Wiele estrów cechuje przyjemny intensywny, owocowy aromat, dlatego jest to grupa niezwykle ważna w kształtowaniu aromatu produktów alkoholowych. Pomimo, iż estry są niejako pożądaną grupą związków i niekiedy stanowią podstawę unikalnego aromatu napojów, to ich nadmierna ilość wpływa niekorzystnie na cechy organoleptyczne tych produktów. Według Rappa octan etylu obecny w winie poniżej 50 mg/dm^3 nadaje mu przyjemny zapach, lecz wraz z osiągnięciem stężenia ok. 150 mg/dm^3 wino nabiera drażniącego, octowego charakteru [33].

Głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za tworzenie się estrów są dwa składniki: stężenie substratów – aktywowanych kwasów tłuszczowych (dzięki przyłączeniu do karboksylowego końca cząsteczki koenzymu A: acyl-CoA, acetyl-CoA) oraz etanolu i powstałych w czasie metabolizmu cukrów innych alkoholi fuzlowych. Drugim czynnikiem determinującym powstawanie estrów jest całkowita aktywność enzymów zaangażowanych w powstawanie tych substancji [34]. Największy wzrost tworzenia się estrów w procesie fermentacji zacierów ziemniaczanych przypada na pierwsze 8 godzin fermentacji. W kolejnych godzinach ilość ta ulega niewielkim zmianom, osiągając poziom końcowy nieco wyższy od stwierdzonego w fazie początkowej [35].

Powstawanie estrów można kontrolować poprzez szereg czynników wpływających na formowanie się substratów. Do czynników tych należy odpowiedni skład medium poddawanego fermentacji, rasa użytych drożdży, ciśnienie hydrostatyczne panujące w fermentorze oraz projekt samego fermentora. Niebagatelny wpływ na poziom estrów ma również poziom azotu, natlenienia brzezki oraz temperatura fermentacji, a także czynniki stymulujące wzrost drożdży [36].

Czynnikiem, dzięki któremu można sterować składem jakościowym oraz stężeniem estrów w napoju alkoholowym, jest rasa drożdży. Drożdże nie tylko wpływają na jakościową oraz ilościową zawartość estrów, ale są również odpowiedzialne za tworzenie się estrów w różnych proporcjach względem siebie [37]. Tak na przykład stężenie octanu etylu może wahać się w granicach 390 do 1740 mg/dm³, w zależności od rasy drożdży użytych do fermentacji. Różnice te również są obserwowane dla innych estrów, takich jak dekanian etylu, octan feniloetylu czy etanolan 3-metylobutyli [38]. Niebagatelny wpływ na produkcję estrów ma również zawartość cukrów w brzeczce. W brzeczce zawierającej wyższy poziom glukozy i fruktozy powstaje więcej estrów niż w takiej, w której występuje więcej maltozy [39,40]. Badania nad wpływem temperatury natomiast wykazują, że jej wzrost (w zakresie temperatur 16-26 °C) stymuluje zwiększoną produkcję niektórych z nich (oktanian etylu, dekanian etylu). Natomiast większa zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w medium fermentacyjnym zmniejsza powstawanie wszystkich estrów etylowych [41].

Zawartość estrów w różnych napojach, zarówno pod względem jakościowym i ilościowym wykazuje dużą rozbieżność. Podwyższone ich stężenie występuje w wódkach gatunkowych tworząc ich niepowtarzalny bukiet.

Tab. 3. Typowe poziomy stężenie wybranych estrów w produktach alkoholowych [42-49]

Nazwa związku	Stężenie [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]				
	destylat rolniczy	Madeira wino	wino jabłkowe	brandy	whisky
2-metylobutanian etylu	b.d.	b.d.	b.d.	340-460	b.d.
butanian etylu	1260	b.d.	0,13	1850-2350	b.d.
dekanian etylu	17000	21,5-210,5	b.d.	420-440	b.d.
dodekanian etylu	2800	1,2-6,5	0,1	60-70	3790-103330
etanolan 3-metylo-1-butylu	b.d.	0-2,2	b.d.	b.d.	b.d.
heksanian etylu	2040	0,2-3,7	0,436	880-1080	30-150
heptanian etylu	170	b.d.	0,003	b.d.	b.d.
nonanian etylu	434	0,6-5,2	b.d.	b.d.	b.d.
octan 2-metylopropylu	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	30-1590
octan butylu	b.d.	b.d.	0,209	b.d.	b.d.
octan etylu	128000	b.d.	23,4	b.d.	b.d.
oktanian etylu	6720	11,3-256,9	0,508	2160-2560	650-14140
pentanian etylu	92,6	b.d.	b.d.	50-70	b.d.

b.d. – brak danych

Tab. 3. Ciąg dalszy

Nazwa związku	Stężenie [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]				
	różowe wino	białe wino	czerwone wino	spirytus „Orujo”	piwo
butanian etylu	b.d.	b.d.	b.d.	18300	b.d.
dekanian etylu	600-1100	500-950	190-300	84900	b.d.
dodekanian etylu	300-700	200-640	160-200	41900	b.d.
etanolan 3-metylo-1-butylu	1400-3400	900-1800	600-1000	b.d.	2030
heksanian etylu	1400-1700	900-1500	800-840	15700	310
heptanian etylu	5,0-9	5 do 10	5,0-6	b.d.	b.d.
nonanian etylu	2	1,0- 2	2,0-3	b.d.	b.d.
octan 2-metylopropylu	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	130
octan butylu	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	110
octan etylu	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	11950
oktanian etylu	160-180	110-170	100-110	43400	370
pentanian etylu	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
tetradekanian etylu	b.d.	b.d.	b.d.	8250	b.d.

b.d. – brak danych

3.2 Alkohole

Najprostszym alkoholem będącym produktem fermentacji alkoholowej jest alkohol metylowy. Charakteryzuje się on silnym alkoholowym zapachem i smakiem zbliżonym do właściwości sensorycznych alkoholu etylowego. Nie wpływa on na jakość sensoryczną trunków, natomiast jego estry metylowe nadają produktom spirytusowym owocowy aromat. Z uwagi na podobieństwo zapachu i smaku metanolu i etanolu bardzo trudno jest je odróżnić organoleptycznie. Działanie na organizm ludzki tych dwu związków jest skrajnie różne. Etanol należy do środków odurzających, który po spożyciu wywołuje stan pobudzenia i ogólną poprawę nastroju. Spożycie metanolu natomiast powoduje nudności, zawroty głowy, nieodwracalne uszkodzenie nerwu centralnego, a czasem nawet śmierć [50]. Z uwagi na następstwa spożycia metanolu, stężenie tego związku podlega monitorowaniu. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13.01.2003 r. określa maksymalne dopuszczalne poziomy zawartości metanolu produktach alkoholowych [51].

Źródłem powstawania metanolu jest metyloesteraza pektyn znajdująca się w owocach, zwłaszcza jabłkach i śliwkach. Zawarte w surowcu enzymy powodują hydrolizę estru metylowego kwasu poligalakturonowego. W jej następstwie powstają wolne grupy

karboksylowe oraz metanol. Z uwagi na brak pektyn w melasie, metanol nie występuje w produktach powstałych na bazie melasy. Inną przyczyną powstawania metanolu może być redukcja formaliny, która dodawana jest do zacierów w celu ochrony przed zakażeniem bakteryjnym [6, 17, 18].

W procesie fermentacji alkoholowej oprócz metanolu i etanolu tworzą się również inne alkohole. Alkohole wyższe, tzw. oleje fuzlowe, są to związki powstałe w wyniku dezaminacji aminokwasów, głównie izoleucyny, leucyny i waliny. Drożdże wykorzystując odszczepiony z aminokwasów amoniak syntetyzują własne białka. Reszty wydzielane są z komórki w postaci wyższych alkoholi (teoria Ehrlicha) [6, 17, 18].

Związki te charakteryzują się temperaturą wrzenia wyższą od temperatury wrzenia etanolu. Najważniejszymi przedstawicielami tej grupy są: propan-1-ol, butan-1-ol, pentan-1-ol oraz 3-metylobutan-1-ol. Substancje te są palne oraz trujące, a ich cechą charakterystyczną jest nieprzyjemny zapach.

Alkohole fuzlowe to związki niepożądane, a ich ilość jest zależna od tego, w jakich warunkach prowadzony jest proces fermentacji. Na syntezę ich wpływa rodzaj fermentowanego surowca, temperatura, obecność tlenu, azotu, ditlenku siarki jak również rasa drożdży [52, 53]. W zależności od rasy drożdży użytych do fermentacji można spodziewać się innych proporcji alkoholi fuzlowych, tak na przykład drożdże rasy *Saccharomyces cerevisiae* syntetyzują najwięcej 3-metylobutan-1-olu, a *Saccharomycodes ludwigii* 2-metylopropan-1-olu [54]. Zawartość alkoholi fuzlowych w napojach alkoholowych jest zróżnicowana. Niewielka ich ilość pozytywnie wpływa na właściwości sensoryczne napojów alkoholowych. Gdy ich stężenie w winie utrzymuje się poniżej 300 mg/dm^3 , alkohole fuzlowe nadają tym produktom charakterystyczny przyjemny aromat. Natomiast w przypadku stężenia alkoholi fuzlowych utrzymującego się powyżej 400 mg/dm^3 obserwowana jest negatywna zmiana charakteru zapachu, a tym samym obniżenie jakości napoju [33]. Syntezą wyższych alkoholi można również sterować poprzez dodawanie do medium fermentacyjnego aktywatorów (dodatków wzbogacających), takich jak np. siarczan cynku, olej sojowy czy mąka sojowa. Dodatek oleju sojowego zmniejsza o ok. 37 % wydajność tworzenia się fuzli, natomiast dodatek mąki sojowej powoduje odwrotny skutek, głównie przez zwiększenie stężenia alkoholu amyłowego [55]. Duży wpływ na zawartość tych związków ma też macerowanie surowca [56]. Powoduje ono wzrost stężenia 3-metylobutan-1-olu, 2-fenyletanolu, propan-1-olu, butan-1-olu, 2-metylopropan-1-olu i metanolu. Wino jabłkowe wyprodukowane z niemacerowanego soku zawiera mniej alkoholi fuzlowych [57].

Zawartość alkoholi fuzlowych, podobnie jak zawartość estrów jest zróżnicowana, w zależności od typu napoju alkoholowego. Ich stężenie w wybranych produktach alkoholowych przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Typowe poziomy stężenie wybranych alkoholi w produktach alkoholowych [57-62]

Nazwa związku	Stężenie [mg/dm ³]			
	wino jabłkowe	piwo	białe wino	różowe wino
2-fenyletanol	1,3-2,4	20-27	18,6	22,3
2-metylobutanol	b.d.	46-71	b.d.	b.d.
2-metylopropanol	7,1-16,8	7,0-14	27,4	29,9
3-metylobutanol	64,7-91,4	b.d.	180	200
butan-1-ol	2,1-22,3	b.d.	b.d.	b.d.
metanol	28,6-181	b.d.	b.d.	b.d.
propan-1-ol	13,2-18,3	8,0-15	26,2	26,5
Nazwa związku	Stężenie [mg/dm ³]			
	czerwone wino	Chińskie czerwone wino	destylat z melona	destylat rolniczy
2-fenyletanol	23,4	6,09	b.d.	b.d.
2-metylobutanol	b.d.	b.d.	14,2-41,8	400-1630
2-metylopropanol	42,1	9,21	21,5-31	510-12220
3-metylobutanol	230	b.d.	b.d.	1060-2360
butan-1-ol	b.d.	0,57	0-0,34	b.d.
metanol	b.d.	b.d.	61,8-475	20
propan-1-ol	29,5	3,64	b.d.	220-450

b.d. – brak danych

3.3 Związki karbonylowe

Większość związków karbonylowych nadaje produktom nieprzyjemny smak i zapach, są więc również odpowiedzialne za pogorszenie właściwości organoleptycznych napojów spirytusowych. Właściwości niektórych aldehydów wraz z progami wyczuwalności sensorycznej przedstawiono w tabeli 8 (str. 36), a typowe poziomy stężenie wybranych związków karbonylowych występujących w produktach alkoholowych w tabeli 5.

Źródłem formowania się aldehydów są enzymatyczne i nieenzymatyczne reakcje degradacji tłuszczów. W procesie tworzenia aldehydów dużą rolę odgrywają, jak w przypadku tworzenia się pozostałych grup związków, również warunki prowadzenia procesu technologicznego. Głównego źródła powstawania tych związków nie da się jednoznacznie określić. Do najważniejszych parametrów prowadzenia procesu, pozwalających na ograniczenie wydajności tworzenia się aldehydów, należą temperatura i pH fermentacji. Wraz ze wzrostem pH zacierów powyżej 5,3 zwiększa się zawartość aldehydów, glicerolu oraz kwasu octowego [63, 64]. Niebagatelny wpływ na zawartość aldehydów w spirytusie surowym ma rodzaj surowca, zakażenia mikrobiologiczne, rasa i wielkość wysiewu drożdży, jak również kontakt ze skorodowaną aparaturą oraz nadmierne napowietrzenie zacierów [63]. Destylaty rolnicze wyprodukowane z melasy charakteryzują się największą (ok. 7 razy większą), w porównaniu do destylatów wyprodukowanych ze zboża, ziemniaków czy tapioki, zawartością aldehydu octowego. Natomiast zbożowe spirytusy rektyfikowane zawierają ok. 100 razy mniejszą, niż rektyfikaty ziemniaczane, zawartość metanal [65, 66]. Zbyt duża dawka drożdży skutkuje zwiększeniem zawartości komórek obumierających i rozkładających się w zacierze fermentującym, co powoduje aż trzykrotny wzrost stężenia sumy wszystkich aldehydów. Również bakterie występujące w zacierze fermentującym mogą metabolizować część węglowodanów do aldehydów. Obecność metali ciężkich, np. ołowiu oraz niedobór jonów magnezu, także może stanowić bogate źródło aldehydów [67].

Z szeregu związków karbonylowych, powstających w wyniku fermentacji alkoholowej, można wyselekcjonować kilkanaście tych, które występują najczęściej. Do tej grupy należy zaliczyć metanal, etanal, propanal, butanal, pentanal, heksanal, 2-metylopropanal, aceton, prop-2-enal, but-2-enal, glioksal, furfural, butan-2-on oraz 3-metylobutanal [68]. Największy wzrost powstawania aldehydów obserwowany jest w pierwszym okresie fermentacji, w momencie powstawania największych ilości etanolu. W dalszych godzinach fermentacji następuje zmniejszenie ilości aldehydów, gdyż wraz ze

spadkiem dynamiki fermentacji równowaga reakcji metabolicznych drożdży zostaje przesunięta w kierunku redukcji aldehydu octowego [35].

Aldehyd octowy, produkt ostatniego stadium procesu fermentacji, jest prawie całkowicie zredukowany do etanolu w końcowej fazie procesu. Poprzez proces napowietrzania, śladowe ilości aldehydu powstającego podczas procesu fermentacji mogą ulec zwiększeniu wskutek utleniania etanolu do aldehydu. Stwierdzono, że z uwagi na wysokie progi wyczuwalności sensorycznej, nasycone aldehydy (do 4 atomów węgla w cząsteczce) nie mają istotnego wpływu na właściwości sensoryczne [66]. Warto więc zwrócić uwagę na aldehydy nienasycone, np. akroleinę – najprostszy aldehyd nienasycony, zaliczany do trucizn. Jest to substancja o nieprzyjemnym zapachu chrzanu, występująca głównie w zacierach z owoców pestkowych. W przypadku występowania w wyrobach spirytusowych, w podwyższonej ilości przyczynia się do znacznego pogorszenia ich właściwości sensorycznych. Jej obecność w rektyfikatach wywołuje ok. 100 razy większy wpływ na jakość rektyfikatów niż metanol i aldehyd octowy [69]. Akroleina, jest bardzo trudna do usunięcia z zacieru gorzelniczego. Z uwagi na niską temperaturę wrzenia tego związku i wyższą niż etanol prężność par, oddestylowuje razem z etanolem. Przymuszczalnie związek ten powstaje podczas enzymatycznego procesu bakteryjnego metabolizmu pewnych cukrów i gliceryny [6]. Do bakteryjnych prekursorów prop-2-enalu należą bakterie przetrwalnikujące *Bacillus amarae* [70].

Oprócz aldehydów, do związków karbonylowych, występujących w wyrobach spirytusowych, zalicza się również acetale powstające w wyniku kondensacji aldehydów z alkoholami. Pomimo tego, że jest ich bardzo mało w produkcie końcowym, ich obecność nie jest bez wpływu na aromat napoju. Wysokie stężenie acetalu dietylowego acetaldehydu skutkuje niepożądanym zapachem alkoholu, czyli obniżeniem jego jakości. Grupa ta jest niezwykle ważna z uwagi na fakt, iż przed procesem rektyfikacji ok. 90 % (v/v) destylat rolniczy rozcieńczany jest do ok. 20 % (v/v). Acetale, w obecności wody (lub dodatku rozcieńczonych mocnych kwasów nieorganicznych, np. H₂SO₄) bardzo szybko ulegają hydrolizie do formy karbonylowej. Zwiększa to sumaryczną zawartość aldehydów, a co za tym idzie, powoduje pogorszenie jakości spirytusu [17].

Tab. 5. Typowe poziomy stężenia wybranych aldehydów w produktach alkoholowych [18, 71-74]

Nazwa związku	Stężenie [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]						
	wódka	destylat rolniczy	białe wino	czerwone wino	koniak	Calvados	piwo
2-metylopropanal	4,26-74,9	1700-6800	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	68,28
3-metylobutanal	24,5-26,1	400-20300	4,45-7,42	6,46-13,3	1540-5500	170-1220	16,64
but-2-enal	6,01-56,4	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
butanal	1,5-9,5	100-900	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	0,437
dekanal	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	7,6-46	4,6-29,6	0,82
etanal	263-1095	19500-71400	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
heptanal	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	3,6-11,6	1,4-14	1,34
heksanal	3,09-74,9	300-700	b.d.	b.d.	112-384	90-560	3,27
metanal	5,48-8,72	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
nonanal	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	6,2-28	2,4-48	5,86
oktanal	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	1,6-6,4	2,4-30,2	0,91
pentanal	1,36-14,9	b.d.	b.d.	b.d.	22,6-132	12,4-98	0,66
prop-2-enal	2,61-9,39	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	1,37	b.d.
propanal	0,346-74,4	2300-9700	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	4,56
<i>trans</i> -2-heptenal	b.d.	b.d.	0,82	0,69-1,29	b.d.	b.d.	b.d.
<i>trans</i> -2-hexenal	b.d.	b.d.	0,22-0,75	0,73-1,18	b.d.	b.d.	b.d.
<i>trans</i> -2-oktanal	b.d.	b.d.	0,66-1,09	0,19-0,97	b.d.	b.d.	b.d.

b.d. – brak danych

3.4 Związki siarki

W różnego rodzaju napojach alkoholowych zidentyfikowano ponad 40 związków zawierających siarkę. Związki te charakteryzują się nieprzyjemnym zapachem czosnku, cebuli, kapusty i gotowanych warzyw. Tak więc obecność również związków siarki uważana jest za przyczynę złej jakości napoju alkoholowego.

Za powstawanie niektórych związków siarki, m.in. metanotolu (zapachu gotowanej kapusty), sulfidu dimetylu, disulfidu dimetylu i trisulfidu dimetylu (zapach kapusty, kalafiora, czosnku), tioestrów metylowych (zapach chrzanu, szczypiorku) oraz tioli (zapachy grejpfruta, agrestu), odpowiedzialne są mikroorganizmy [69]. Związki siarki mogą powstawać w wyniku reakcji enzymatycznych zachodzących w procesie metabolizmu drożdży, jak również podczas

nieenzymatycznych reakcji w wyniku działania temperatury i światła. Ponadto aminokwasy siarkowe pośredniczą w produkcji organicznych związków siarki w winach, a w następstwie w reakcji Ehrlicha [75, 76]. Prekursorami związków siarki mogą być również zepsute surowce roślinne oraz zawierające siarkę, środki ochrony roślin [77].

Obecność octanu 2-merkaptotoluenu i octanu 3-merkaptopropylu powoduje „przypieczony” zapach w winach, a podwyższona ilość trisulfidu dimetylu jest przyczyną dyskwalifikacji destylatów rolniczych - surowców do produkcji napojów spirytusowych [78]. Lotne związki siarki są trudne do identyfikacji metodą chromatografii gazowej połączonej z konwencjonalnymi detektorami FID i MS, natomiast dzięki zastosowaniu detektorów selektywnych, takich jak detektor FPD i SCD, ich oznaczanie jest ułatwione [79].

Tab. 6. Typowe poziomy stężenia wybranych związków siarki w produktach alkoholowych [80, 81]

Nazwa związku	Stężenie [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]				
	wino	piwo bezalkoholowe	piwo Pilsner	piwo pszeniczne	piwo lager
disulfid dietylu	4,3-40	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
disulfid dimetylu	20-45	0,081	0,306	0,17	0,247
disiarczek węgla	b.d.	0,068	0,167	0,267	0,398
etanotiol	1,1	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
1,1-tiobisetan	0,93-18	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
2-tiapropan	10-160	5,112	70,52	47,78	59,18

b.d. – brak danych

3.5 Kwasy organiczne

Do otrzymywania etanolu wykorzystuje się fermentację cukrów przy użyciu drobnoustrojów, głównie z gatunku *Saccharomyces*. W wyniku różnych procesów ubocznych drobnoustroje mogą wytwarzać kwasy organiczne takie jak: kwas mlekowy, octowy czy masłowy (sporadycznie). Ilość tych produktów ubocznych zależy od warunków procesu, głównie pH [82]. Znaczny wzrost temperatury lub pH środowiska, warunków aerobowych lub nadmierny wzrost beztlenowości, ułatwiają rozwój w surowcu różnych grup bakterii, które wytwarzają kwasy – niepożądane wtórne produkty fermentacji [83]. Jeśli proces technologiczny prowadzony jest w warunkach sterylnych, nie dochodzi do znacznego przyrostu kwasów organicznych spowodowanego rozwojem niepożądanego mikroflory.

W przypadku obniżania się pH wskutek produkcji nadmiernej ilości kwasów organicznych może nastąpić zablokowanie aktywności amylolytycznej preparatów enzymatycznych i spadek wydajności alkoholu [6]. Krótkołańcuchowe lotne kwasy organiczne (C2-C6) powstają w trakcie nieprawidłowego przechowywania napojów alkoholowych wskutek beztlenowego rozkładu materii organicznej. Natomiast wyższe kwasy tłuszczowe pochodzą z wyłocznym z winogron. Ich ilość zależy od warunków prowadzenia procesu fermentacji, a ich stężenie związane jest z ilością biomasy drożdży zawartej w materii podczas destylacji [84].

Zawartość kwasów w surowym spirytusie jest limitowana normą, dlatego tak ważny jest dobór odpowiednich parametrów prowadzenia procesu fermentacji. Lotne kwasy organiczne, takie jak kwas octowy, są przenoszone do surówki gorzelniczej, natomiast kwasy o małej lotności zostają w wywarze [6]. Z badań wynika, że w trakcie okresu magazynowania wyrobów alkoholowych (destylatów z wyłoków winogron), już po ok. 4 miesiącach następuje spadek zawartości kwasów, w szczególności kwasu octowego [84].

Tab. 7. Typowe poziomy stężenie wybranych kwasów organicznych w produktach alkoholowych [18, 60, 61, 85]

Nazwa związku	Stężenie [mg/dm ³]						
	Chińskie czerwone wino	białe wino	różowe wino	czerwone wino	piwo	wódki smakowe	destylat rolniczy
kwas 2-metylopropionowy	0,035	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	1,7-6,8
kwas 3-metylobutanowy	b.d.	1,73	1,78	1,94	b.d.	b.d.	0,4-20,3
kwas butanowy	b.d.	4,95	5,02	4,77	b.d.	b.d.	0,1-0,9
kwas dekanowy	0,076	1,03	1,25	0,60	0,1-5,2	0,6-27,9	b.d.
kwas dodekanowy	0,005	b.d.	b.d.	b.d.	0,05-0,7	2,5-7,9	b.d.
kwas heksanowy	0,12	4,51	4,02	2,31	1,0-22,8	0,3-15,0	0,3-0,6
kwas hexadekanowy	0,0011	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
kwas octowy	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	5,5-84,6
kwas oktanowy	0,555	5,22	5,17	2,26	1,8-14,7	1,3-24,4	b.d.
kwas tetradekanowy	0,0001	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.

Tab. 8. Progi wyczuwalności sensorycznej wybranych związków [86-93]

Związek	Opis zapachu	Próg wyczuwalności sensorycznej [mg/dm ³]	
		zapach	smak
ESTRY			
2-metylobutanian etylu	ostry, słodki, zielony/roślinny, owocowy, jabłka	0,001 ^a	b.d.
2-metylopropionian etylu	słodki, eteryczny, owocowy, rumowy, fuzłowy	0,015 ^a	b.d.
3-hydroksybutanian etylu	owocowy, zielony/roślinny, winogron, tropikalny, skórki jabłka	67 ^b	b.d.
3-metylobutanian etylu	owocowy, słodki, jabłka, ananasa, tutti frutti	0,003 ^a	b.d.
butanian etylu	owocowy, świeży, ananasowy, koniaku	0,02 ^a	b.d.
butanian metylu	ostry, eteryczny, owocowy, perfum, fuzłowy z nutą kremową	1 ^b	b.d.
dekanian etylu	słodki, owocowy, jabłkowy, winogronowy, brandy	0,2 ^b	0,9 ^e
etanolan 3-metylobutyłu	słodki, owocowy, bananowy, rozpuszczalnikowy	0,23 ^a	b.d.
heksanian etylu	słodki owocowy, ananasa, zielony/roślinny, banana	0,005 ^b	0,23 ^e
merkaptan metylu	rozkładającej się materii, czosnku, kapusty	0,001 ^a	b.d.
mleczan etylu	ostry, cierpki, karmelu, maślany, owocowy	100 ^b	b.d.
octan 3-metylobutyłu	słodki owocowy banana, rozpuszczalnika	0,03 ^b	b.d.
octan etylu	słodki, owocowy, rumowy	7,5 ^a	33 ^e
octan propylu	rozpuszczalnikowy, selera, owocowy, gruszkowy, malin	65 ^b	30 ^e
oktanian 2-fenyletylu	słodki, woskowy, zielony/roślinny, owocowy, kakao	10 ^b	b.d.
oktanian etylu	słodki, morelowy, bananowy, brandy, wina, gruszkowy	0,002 ^b	b.d.
propionian etylu	słodki, owocowy, rumowy, winogronowy, ananasowy	5 ^b	b.d.
tetradekanian etylu	słodki, woskowy, fioletowego irysa	494 ^b	b.d.

(^a – w 10 %, ^b – w 14 %, ^c – w 100 %, ^d – w 11 % v/v) wodnym roztworze etanolu, ^e – w piwie, ^f – w winie, b.d. – brak danych

Tab. 8. Ciąg dalszy

Związek	Opis zapachu	Próg wyczuwalności sensorycznej [mg/dm ³]	
		zapach	smak
ALKOHOLE			
propan-1-ol	alkoholowy, jabłkowy, stęchły, orzechowy, słodki, ziemisty	830 ^b	800 ^e
2-metylopropan-1-ol	winny, eteryczny	40 ^b	200 ^e
3-metylopentan-1-ol	koniaku, fuzlowy, wina, kakao, zielony/roślinny, owocowy	50 ^b	b.d.
4-etylofenol	dymu, fenolowy, cząbr	140 ^b	b.d.
alkohol benzylowy	chemiczny, owocowy, roślinny	900 ^b	b.d.
butan-1-ol	medyczny, waniliowy	820 ^b	b.d.
butan-2-ol	słodki, moreli	1000 ^b	b.d.
dekan-1-ol	tłuszczu, woskowy, kwiatowy, pomarańczowy, słodkiej wody	5 ^b	b.d.
heksan-1-ol	zielony/roślinny, kwiatowy	8 ^b	b.d.
metanol	spirytusowy, ostry	668 ^b	b.d.
oktan-1-ol	zielony/roślinny, aldehydowy, różany, grzybów	10 ^b	b.d.
ZWIĄZKI KARBONYLOWE			
metanal	ostry, cierpki, drażniący	1000 ^c	1000 ^c
2-metylopropanal	charakterystyczny, aldehydowy, roślinny	50 ^c	50 ^c
3-metylobutanal	cierpki, eteryczny, owocowy, aldehydowy, kakao	1 ^c	5 ^c
aceton	rozpuszczalnikowy, eteryczny, jabłkowy, gruszkowy	50 ^c	50 ^c
but-2-enal	gryzący, drażniący, duszący	10 ^c	10 ^c
etanal	cierpki, ostry, eteryczny, aldehydowy z nutą owocową	100 ^c	1000 ^c
heksanal	zielony/roślinny, aldehydowy, liści, potu	1 ^c	1 ^c
pentanal	ostry, chleba, fermentacji, owoców, orzechów	5 ^c	5 ^c
prop-2-enal	nieprzyjemny, ostry, gryzący, duszący	10 ^c	10 ^c
propanal	ziemisty, alkoholowy, wina, whisky, kakao, orzechowy	50 ^c	50 ^c

(^a – w 10 %, ^b – w 14 %, ^c – w 100 %, ^d – w 11 % v/v) wodnym roztworze etanolu, ^e – w piwie, ^f – w winie, b.d. – brak danych

Tab. 8. Ciąg dalszy

Związek	Opis zapachu	Próg wyczuwalności sensorycznej [mg/dm ³]	
		zapach	smak
KWASY ORGANICZNE			
kwas 2-metylopropionowy	kurzu, kwaśny	20 ^b	-
kwas 3-metylobutanowy	kwaśny, cuchnących stóp, potu, sera	3 ^b	-
kwas butanowy	ostry, octowy, owocowy, masła, sera	10 ^a	-
kwas dekanowy	nieprzyjemny, zjełczały, kwaśny, tłuszczowy, cytrusowy	15 ^a	-
kwas heksanowy	zjełczanego tłuszczu, serowy, kwaśny	3 ^a	-
kwas octowy	ostry, gryzący, kwaśny, octu	200 ^a	-
kwas oktanowy	tłuszczowy, woskowy, zjełczały, oleju roślinnego, serowy	8,8 ^b	-
ZWIĄZKI SIARKI			
siarkowodór	zgniłych jaj, kanalizacji	0,0009 - 0,0015 ^f	-
disiarczek dietylu	cebuli, czosnku, palonej gumy	0,0036 - 0,0043 ^f	-
disiarczek dimetylu	siarkowy, cebuli, kapusty, warzyw	0,0098 - 0,0102 ^f	-
etanotiol	ziemisty, spalonej zapalki	0,0011 - 0,0018 ^f	-
metylotiol	zgniłej kapusty, spalonej gumy	0,0015 ^f	-
siarczek dietylu	etryczny, siarkowy	0,0009 - 0,0013 ^f	-
siarczek dimetylu	kukurydzy konserwowej, gotowanej kapusty, szparagów	0,017 - 0,025 ^f	-

(^a – w 10 %, ^b – w 14 %, ^c – w 100 %, ^d – w 11 % v/v) wodnym roztworze etanolu, ^e – w piwie, ^f – w winie, b.d. – brak danych

4 POLIMEROWE CIECZE JONOWE – SORBENTY NOWEJ GENERACJI W SPME

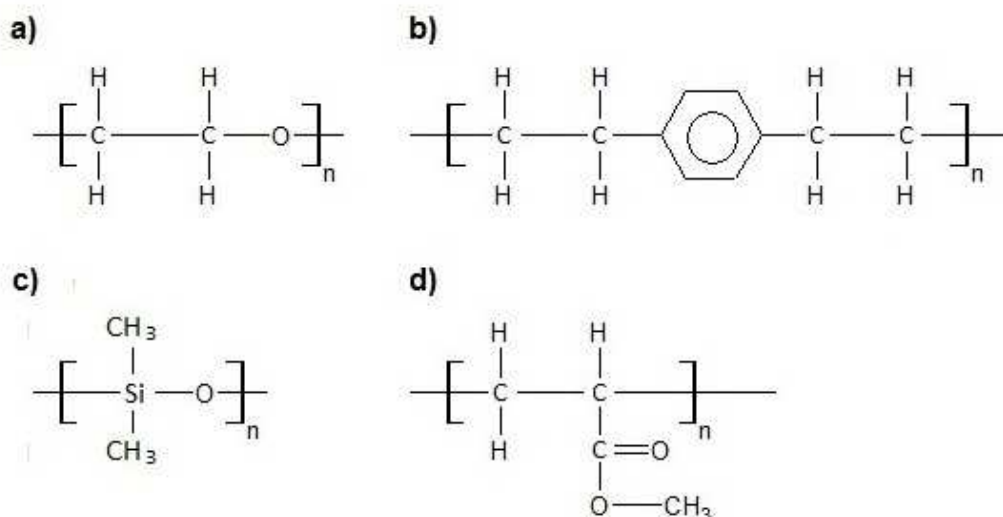
Oznaczanie produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej jest stosunkowo trudnym zadaniem i bardzo często wymaga etapu wstępnego przygotowywania próbki. Bezpośrednia analiza próbek zwykle nie przynosi zadowalających rezultatów. Konieczność izolacji i wzbogacania analitów z próbek wyrobów alkoholowych może wynikać z ich niskiego stężenia i zróżnicowania poziomów stężeń, na których występują (w zakresie ng/dm^3 – mg/dm^3) oraz konieczności zminimalizowania wpływu matrycy na oznaczenia.

Procedura przygotowywania próbek do analizy, ze względu na fakt, iż to ona właśnie odpowiedzialna jest za główne źródło strat analitów, do dziś spędza sen z oczu wielu analitykom. Dąży się do zastosowania odpowiedniej techniki, która zapewni selektywność i wysoką wydajność ekstrakcji oznaczanych substancji nawet ze skomplikowanej matrycy. Widząc wady dotychczas stosowanych metod, ich wieloetapowość, praco- i czasochłonność oraz konieczność stosowania dużych ilości toksycznych rozpuszczalników, zaczęto skupiać się na opracowywaniu nowych technik. I tak, w latach 90-tych J. Pawliszyn wraz ze współpracownikami, wprowadził nową technikę przygotowywania próbek – mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME). Polega ona na ekstrakcji analitów będących przedmiotem zainteresowania analityka przy pomocy specjalnego włókna ze stopionej krzemionki pokrytego określoną fazą stacjonarną. Technika ta wykorzystuje równowagę pomiędzy analitami znajdującymi się w próbce, a fazą stacjonarną włókna ekstrakcyjnego. Procedurę absorpcji/adsorpcji analitów można przeprowadzić w dwóch wariantach (rys. 6.). Pierwszą możliwością jest ekstrakcja analitów do fazy stacjonarnej włókna z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME). W tej wersji włókno umieszcza się nad powierzchnią próbki ciekłej bądź stałej. Drugą możliwością jest bezpośrednia ekspozycja włókna sorpcyjnego w ciekłej próbce (DI-SPME) [94]. Technika SPME, z uwagi na niewielką „manipulację” próbką, a co z tym związane łatwość przeprowadzenia procedury oraz możliwość równoczesnej izolacji i wzbogacania składników próbki, od ponad dwudziestu lat cieszy się niegasnącą popularnością. Jej wysoka czułość umożliwia zachowanie liniowości odpowiedzi w szerokim zakresie stężeń. Ponadto technika ta z uwagi na ograniczoną manipulację próbką zapewnia zachowanie jej stałego składu.



Rys. 6. Sposoby prowadzenia mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej: a) HS-SPME, b) DI-SPME

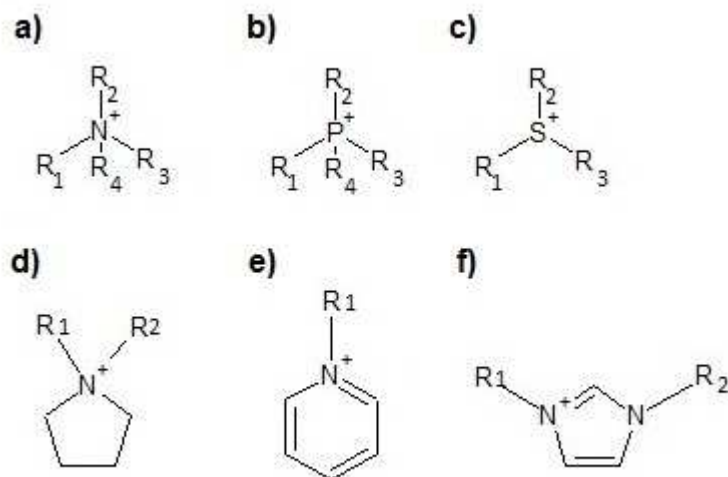
Jedną z wad mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej jest stosunkowo mała ilość komercyjnie dostępnych faz stacjonarnych (rys. 7.). Do ekstrakcji związków polarnych zazwyczaj stosowane jest włókno ze związaną fazą stacjonarną typu PA (poliakrylan), bądź PEG (glikol polietylenowy), natomiast do ekstrakcji związków niepolarnych włókno z fazą stacjonarną typu PDMS (polidimetylosiloksan). Dostępne są również włókna mieszane takie jak, PDMS/DVB, CAR/PDMS oraz PDMS/CAR/DVB. Pomimo, iż komercyjnie dostępne są włókna o różnych grubościach (PA: 85 μm , PEG: 60 μm ; PDMS: 7 μm , 30 μm , 100 μm , PDMS/DVB 60 μm , 65 μm , CAR/PDMS: 75 μm , 85 μm oraz PDMS/CAR/DVB: 50/30 μm), czasem wydajność ekstrakcji z zastosowaniem takich włókien jest zbyt niska. Dlatego też, widząc potencjał techniki SPME i osiągnięcia w dziedzinie chemii polimerów, w ostatnim czasie skupiono się na poszukiwaniu nowych, innowacyjnych sorbentów, które poprzez selektywność i wysoką wydajność ekstrakcji różnych grup związków pozwolą na obniżenie granic wykrywalności i rozszerzenie spektrum zastosowań tej techniki.



Rys. 7. Przykład polimerów wykorzystywanych jako komercyjne fazy stacjonarne w SPME: a) CAR, b) DVB, c) PDMS, d) PA

Coraz częściej w najnowszej literaturze pojawia się termin ciecze jonowe [95-106]. Pomimo, iż odkrycia cieczy jonowych dokonał w 1914 r. P. Walden [107], to dopiero w latach 90-tych wzbudziły one większe zainteresowanie. Ciecze jonowe są to sole organiczne, które charakteryzują się temperaturą topnienia niższą niż 100 °C, niską prężnością par, wysoką stabilnością termiczną oraz ponad dwukrotnie większą lepkością niż tradycyjne rozpuszczalniki. Posiadają również zdolność rozpuszczania szerokiej gamy substancji [108]. Uznaje się je czasem za „zielone rozpuszczalniki”, gdyż spełniają zasady zielonej chemii wprowadzone w 1991 r. przez Anastasa [109].

Ciecze jonowe, jak nazwa wskazuje, składają się jedynie z jonów, dużego organicznego, niesymetrycznego kationu i mniejszego organicznego bądź nieorganicznego anionu. Najczęściej stosuje się kationy alkilimidazoliowe, alkilopirydyniowe, alkilopirrolidyniowe oraz alkilofosfoniowe (rys. 8). Natomiast do często stosowanych anionów należą aniony halogenkowe: Cl^- , Br^- , I^- , anion tetrafluoroboranowy: BF_4^- , heksafluorofosforanowy: PF_6^- bądź też bis(trifluorometylo-sulfonylo)imidkowy: NTf_2^- .



Rys. 8. Przykładowe kationy cieczy jonowych: a) aminiowy, b) fosfoniowy, c) sulfoniowy, d) piroldyniowy, e) pirydyniowy, f) imidazoliowy

Stosując różne kombinacje kation-anion można uzyskać aż 10^{18} różnych struktur cieczy jonowych [110]. Ciecze jonowe mogą wykazywać właściwości hydrofilowe bądź hydrofobowe, w zależności od kationu i anionu z jakiego są zbudowane. Dzięki połączeniu odpowiednich kationów i anionów można z łatwością przewidywać ich właściwości fizykochemiczne i solwatacyjne. Zmiana jednego anionu może spowodować poprawę lub pogorszenie stabilności termicznej, zmiany w lepkości czy też rozpuszczalności (tab. 9). Z tego powodu ciecze jonowe są często nazywane „projektowanymi rozpuszczalnikami”. Można tak zaprojektować ciecz jonową, aby nadawała się do ściśle określonych zadań, takich jak uzyskanie unikalnych interakcji pomiędzy analitem i rozpuszczalnikiem. Ciecze jonowe znalazły zastosowanie w elektrochemii [111], syntezie organicznej [112] oraz technikach przygotowywania próbek takich jak ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE) [113], dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz (DLLME) [114], ekstrakcji do pojedynczej kropli (SDME) [115] oraz mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) [116].

Tab. 9. Rozpuszczalność polimerowych cieczy jonowych [108,117]

Kation	Anion	Rozpuszczalność			
		H ₂ O	Aceton	Octan etylu	THF
poli(1-winylo-3-etyloimidazoliowy)	Br ⁻	+	-	-	-
	PF ₆ ⁻	-	+	-	-
	(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻	-	+	-	+
	(CF ₃ CF ₂ SO ₂) ₂ N ⁻	-	+	+	+
poli(4-winylopirydyniowy)	Br ⁻	+	-	-	-
	PF ₆ ⁻	-	+	-	-
	(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻	-	+	+	+
	(CF ₃ CF ₂ SO ₂) ₂ N ⁻	-	+	+	+

znak „+” – rozpuszczalny, „-” – nierozpuszczalny

Bardzo trudnym zadaniem jest znalezienie odpowiedniego materiału nadającego się na powłoki sorpcyjne. Fazy stacjonarne włókien do SPME muszą być odporne na zmiany pH, obecność soli, rozpuszczalników organicznych i modyfikatorów. Ponadto ich powłoka powinna być stabilna termicznie, aby unikać nadmiernych strat sorbentu podczas desorpcji. Wykorzystanie cieczy jonowych jako powłok sorpcyjnych w chemii analitycznej jest stosunkowo nowym zastosowaniem i wciąż znajduje się w sferze badań. Najnowsze badania wykazują ogromne możliwości jakie daje stosowanie cieczy jonowych jako sorbentów. Z uwagi na możliwość „dostrajania” ich właściwości fizycznych i chemicznych do określonej aplikacji, ciecze jonowe wykazują ogromny potencjał [118, 119]. Po raz pierwszy ciecze jonowe zostały wykorzystane w SPME w 2005 roku. Na początku do wiązania cieczy jonowej z włóknem wykorzystywało tylko właściwości fizyczne. Pokrycie włókna następowało poprzez proste zanurzenie włókna w cieczy jonowej. Wadą tego sposobu była jednak konieczność usuwania po każdorazowej ekstrakcji powłoki sorpcyjnej przy pomocy rozpuszczalników. W wyniku tego powtarzalność analiz nie była zadowalająca [120]. Następnie, w celu zwiększenia stabilności powłoki, przed nałożeniem warstwy cieczy jonowej, włókno pokrywano tworzywem typu Nafion [121]. Dopiero pokrywanie włókna spolimeryzowaną cieczą jonową stało się swego rodzaju przełomem. W ten sposób udało się zminimalizować niektóre ograniczenia związane z wykorzystaniem niespolimeryzowanych cieczy jonowych bez utraty ich właściwości. Podczas gdy włókna pokryte cieczami jonowymi (IL) można stosować tylko w wersji analizy fazy nadpowierzchniowej, to włókna pokryte ich

polimerowymi odpowiednikami (PIL) można stosować w obu wariantach techniki SPME – DI oraz HS [122].

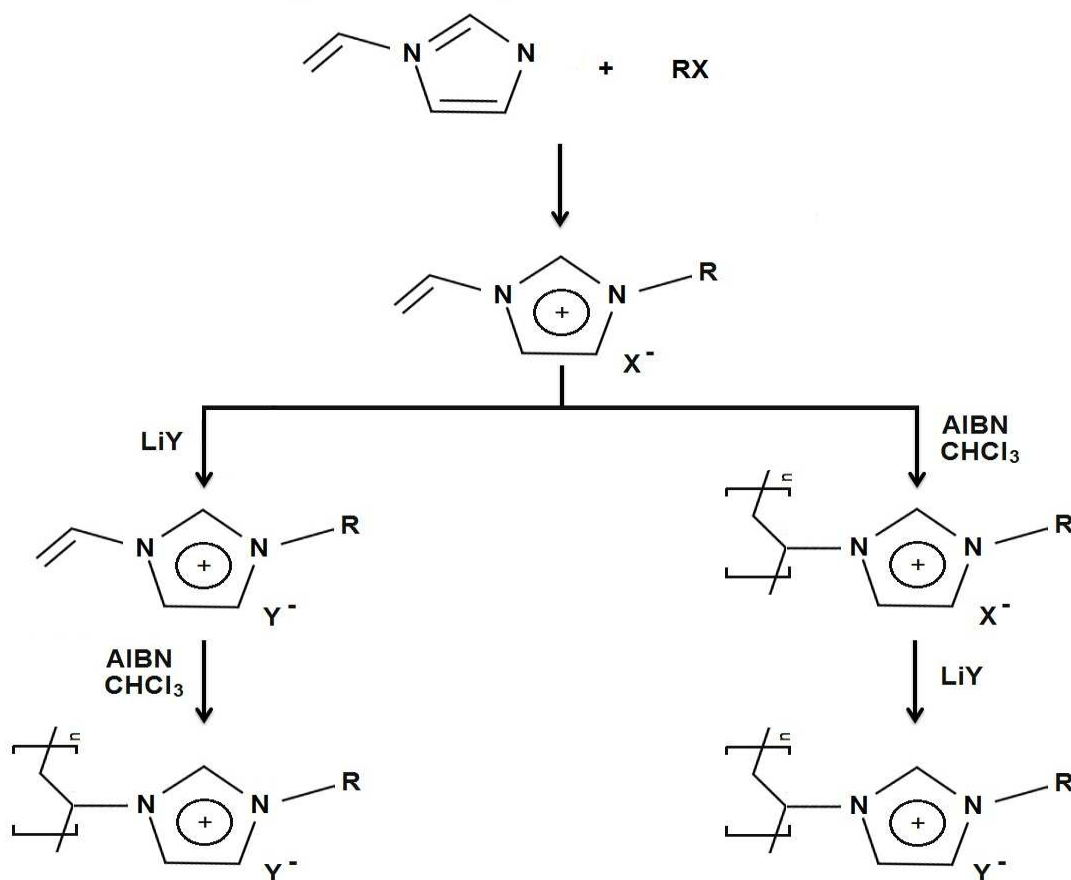
Stabilność termiczna włókien pokrytych polimerową cieczą jonową jest dużo wyższa niż włókien pokrytych niespolimeryzowaną cieczą jonową, dzięki czemu nie ma potrzeby każdorazowego nakładania polimeru [123]. Stabilność termiczna polimerowych cieczy jonowych jest jednym z kluczowych parametrów determinujących przydatność powłoki w SPME. Faza stacjonarna włókna ekstrakcyjnego powinna być wystarczająco odporna na wysokie temperatury pracy dozownika. W przeciwnym razie w wyniku degradacji powłoki, na chromatogramie mogą pojawiać się dodatkowe piki, tzw. piki duchy. Stopniowy rozkład termiczny fazy sorpcyjnej włókna ekstrakcyjnego sprawi, że wyniki poszczególnych analiz nie będą precyzyjne. Na stabilność termiczną cieczy jonowych ma wpływ zarówno anion jak i kation. Analizy DSC i TGA/SDTA imidazoliowych cieczy jonowych potwierdziły, że ciecze te mają stosunkowo wysoką odporność termiczną. Wydłużenie liniowego łańcucha alkilowego powoduje wzrost ich stabilności termicznej, natomiast wprowadzenie do pierścienia drugorzędowego, bądź trzeciorzędowego podstawnika alkilowego powoduje znaczący spadek stabilności termicznej cieczy jonowej [124, 125]. Jednak w głównej mierze to właśnie anion determinuje stabilność termiczną. Ciecze jonowe zbudowane z organicznych anionów wykazują lepszą stabilność termiczną niż zawierające aniony halogenkowe [126, 127]. Podobną tendencję wykazują spolimeryzowane ciecze jonowe [128].

Do niewątpliwych zalet polimerowych cieczy jonowych (PIL) należy również zaliczyć ich lepkość, za którą odpowiedzialne są m.in. oddziaływania Van der Waalsa, obecność wiązań wodorowych, a także oddziaływania elektrostatyczne [129]. Dzięki wysokiej lepkości polimerowych cieczy jonowych można stosować wyższe temperatury ekstrakcji, bez obawy strat powłoki w dozowniku chromatografu. Zazwyczaj lepkość cieczy jonowych (np. tetrafluoroboranu – BF_4^- , bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidku – NTf_2^- czy heksafluorofosforanu – PF_6^- 1-etylo-3-metyloimidazolu – EMIM oraz 1-butylo-3-metyloimidazolu – BMIM) utrzymuje się w granicach 10-500 cP [130]. Udowodniono, że zwiększenie długości łańcucha alkilowego w pierścieniu imidazoliowym, a także jego rozgałęzienie powoduje wzrost lepkości cieczy [116]. Za charakterystyczną lepkość cieczy jonowej w dużej mierze odpowiedzialny jest również anion. Huddleston wykazał, iż geometria anionu, jak również jego masa molowa, istotnie wpływają na lepkość cieczy jonowej (np. lepkość $[\text{C4MIM}][\text{NTf}_2]$ wynosi 69 cP, a lepkość $[\text{C4MIM}][\text{PF}_6]$ aż 450 cP) [127].



Rys. 9. Właściwości fizyczne imidazoliowych cieczy jonowych [124,125,127]

Podstawowy schemat syntezy imidazoliowej polimerowej cieczy jonowej przedstawiono na rysunku 10.



Rys.10. Ogólny schemat syntezy polimerowych cieczy jonowych

Niezależnie od charakteru syntezowanej cieczy jonowej wyróżnić można dwa zasadnicze podejścia. Pierwsze podejście wykorzystuje syntezę oczekiwanej struktury monomeru cieczy jonowej w reakcji wymiany anionu w monomerze (np. halogenku 1-winylo-3-alkiloimidazolu), po której następuje polimeryzacja (rys. 10). Drugie podejście prowadzi do wymiany jonowej anionu poprzez uprzednią polimeryzację monomeru cieczy jonowej. Synteza pierwszej z metod jest bardziej skomplikowana, z uwagi na etapy oczyszczania monomeru jak również konieczność kontrolowania etapu polimeryzacji. Umożliwia ona jednak syntezę zarówno homo- jak i kopolimerów. Natomiast ograniczenie drugiej z metod może pojawić się w przypadku syntezy bardziej skomplikowanych struktur polimerowych w postaci nieilościowej reakcji wymiany jonowej [108].

Ważną zaletą jest możliwość rozpatrywania polimerowej cieczy jonowej jako sorbentu o dwojakim powinowactwie, powinowactwie warunkowanym zarówno przez kation jak i anion. Ta specyficzna zaleta spowodowała, że włókna wykorzystujące do ekstrakcji projektowane polimerowe ciecze jonowe mogą być dedykowane do określonych celów. Możliwa jest równoczesna ekstrakcja zarówno związków polarnych jak i niepolarnych nawet ze skomplikowanej matrycy. Dlatego też włókna pokryte polimerowymi cieczami jonowymi zostały z powodzeniem wykorzystane do ekstrakcji wielu grup związków, m.in. fenoli, alkoholi, estrów, kwasów organicznych, amin czy związków z grupy WWA z wody oraz z matrycy alkoholowej [118, 120, 121, 123, 131, 132].

II CEL PRACY

Jakość, konkurencyjność oraz zgodność z unijnymi przepisami prawnymi jest największym wyzwaniem producentów artykułów spożywczych. Przedstawiciele przemysłu spirytusowego napotykają na liczne trudności w dążeniu do spełnienia unijnych i konsumenckich standardów. Stawiane producentom i nakładane przez nich same zadania i cele stanowiły impuls do podjęcia zagadnienia badawczego ukierunkowanego na problematykę związaną z analizą produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej w półproduktach i produktach spirytusowych, wykorzystując do tego celu analizę instrumentalną. Realizowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania obejmowały trzy zasadnicze problemy badawcze:

- opracowanie metod klasyfikacji destylatów rolniczych różnego pochodzenia botanicznego na podstawie analizy składu produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej,
- ilościowe oznaczanie wybranych związków karbonylowych oraz próbę korelacji otrzymanych wyników z jakością sensoryczną wódek czystych,
- określenie możliwości wykorzystania włókien SPME pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi do izolacji i wzbogacania głównych produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej.

W trakcie realizacji badań wykorzystano następujące techniki analityczne:

- mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME) na etapie izolacji i wzbogacania analitów poprzedzoną derywatyzacją w przypadku oznaczania związków karbonylowych,
- kapilarną chromatografię gazową (GC) jako technikę oznaczeń końcowych.

Realizacja założonych celów badawczych obejmowała następujące cząstkowe zadania badawcze:

- określenie optymalnych warunków pracy układu chromatograficznego (m.in. dobór kolumny chromatograficznej, programu temperaturowego, temperatury i trybu pracy dozownika oraz warunków pracy detektorów MS, FID i ECD),
- określenie optymalnych parametrów prowadzenia procesu izolacji i wzbogacania analitów,
- wyznaczenie wybranych parametrów walidacyjnych stosowanych procedur,
- określenie składu produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej
- opracowanie metod grupowania destylatów rolniczych i wódek czystych w oparciu chemometryczne metody interpretacji wyników.

III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1 MATERIAŁY DO BADAŃ

1.1 Destylaty rolnicze

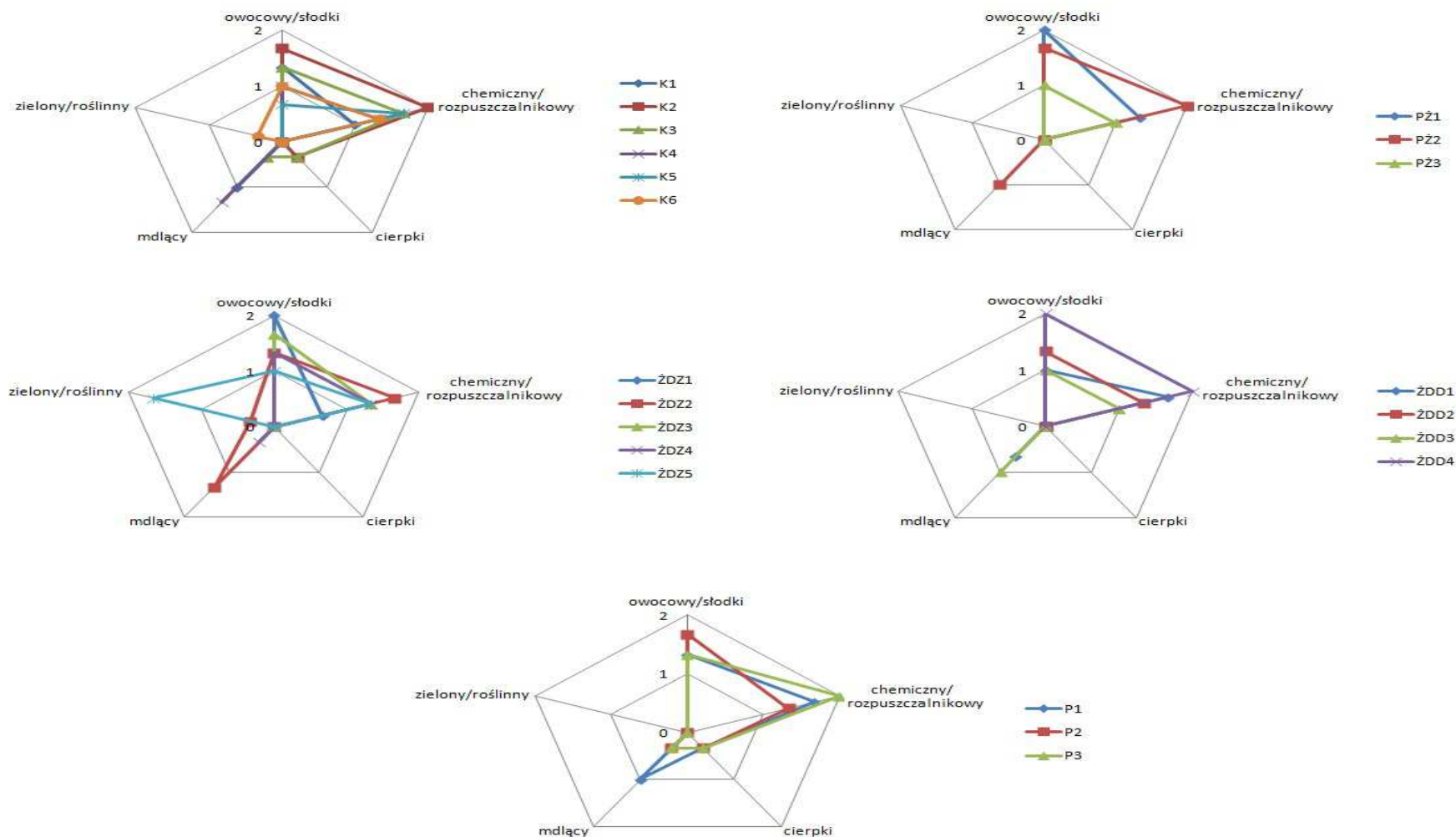
Do badań wybrano 290 próbek destylatów rolniczych różnego pochodzenia botanicznego. Destylaty pobranych próbek wyprodukowane zostały z pszenicy, pszenżyta, kukurydzy oraz żyta (odmiana Dankowskie Złote oraz Dankowskie Diament). Wykorzystane w badaniach próbki destylatów rolniczych zawierały około 90-92 % (v/v) etanolu i pochodziły z lokalnych gorzelnii z województwa pomorskiego, kujawsko-pomorskiego oraz zachodnio-pomorskiego. Jakość sensoryczna badanych destylatów została określona jako zgodna z normą PN-A-79528-2:2002. Oznaczenia zostały przeprowadzone przez 5-osobowy wykwalifikowany zespół osób oceniających w laboratorium zakładowym Destylarni Sobieski S.A. w Starogardzie Gdańskim. Ponadto na podstawie norm powołanych: PN-A-79528-4:2000 oraz PN-A-79528-7:2001 w każdej próbce destylatu rolniczego zostały określone podstawowe parametry takie jak: kwasowość oraz całkowita zawartość aldehydów [133-135]. Kwasowość próbek wahała się w granicach 0,02-0,05 g/dm³, a całkowita zawartość aldehydów 0,02 do 0,06 g/dm³.

Dodatkowo zdecydowano się określić właściwości sensoryczne destylatów rolniczych metodą klasycznej analizy sensorycznej – metodą profilowania. Dodatkowa charakterystyka sensoryczna miała na celu określenie ewentualnych różnic w profilu zapachowym destylatów wyprodukowanych z różnych surowców. Analizy zostały wykonane przez trzy przeszkolone osoby oceniające. Paneliści oceniali intensywność zapachu w skali od 0 (zapach niewyczuwalny) do 3 (zapach bardzo intensywny). Wszystkie analizowane próbki destylatów rozcieńczano wodą demineralizowaną do stężenia 20 % etanolu (v/v). Analizy były przeprowadzane w temperaturze 20 °C. Próbkę analizowano w dwóch powtórzeniach w losowej kolejności. Do oceny wybrano 5 deskryptorów zapachu: owocowy/słodki, chemiczny/rozpuszczalnikowy, mdły, zielony/roślinny i cierpki. Deskryptory zostały wybrane na podstawie wcześniejszych badań destylatów rolniczych przeprowadzonych w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej [136].

Uzyskane wyniki nie wykazały statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) w aromacie destylatów rolniczych różnego pochodzenia botanicznego. Lotne profile wszystkich

destylatów rolniczych są bardzo podobne. Deskryptory takie jak chemiczny/rozpuszczalnikowy i owocowy/słodki występują w każdej próbce destylatu. Charakterystyczną cechą tych zapachów jest stosunkowo wysoka ich intensywność. Inne deskryptory występują rzadko i o stosunkowo niskiej intensywności. Warto wspomnieć, że cierpki opis zapachu pojawił się tylko w przypadku kilku próbek i zawsze był obserwowany tylko przez jedną osobę. Przykładowe profile sensoryczne przedstawiono na rysunku 11.

Brak odczuwanych różnic w zapachu destylatów rolniczych wyprodukowanych z różnych surowców może zostać wyjaśniony przez zbyt niską czułość „detektora” jakim jest ludzki nos oraz specyficzne interakcje zachodzące pomiędzy wszystkimi lotnymi związkami obecnymi w destylatach. Przeprowadzona analiza sensoryczna metodą profilowania wykazała, iż nie jest możliwe na jej podstawie rozróżnienie pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych.



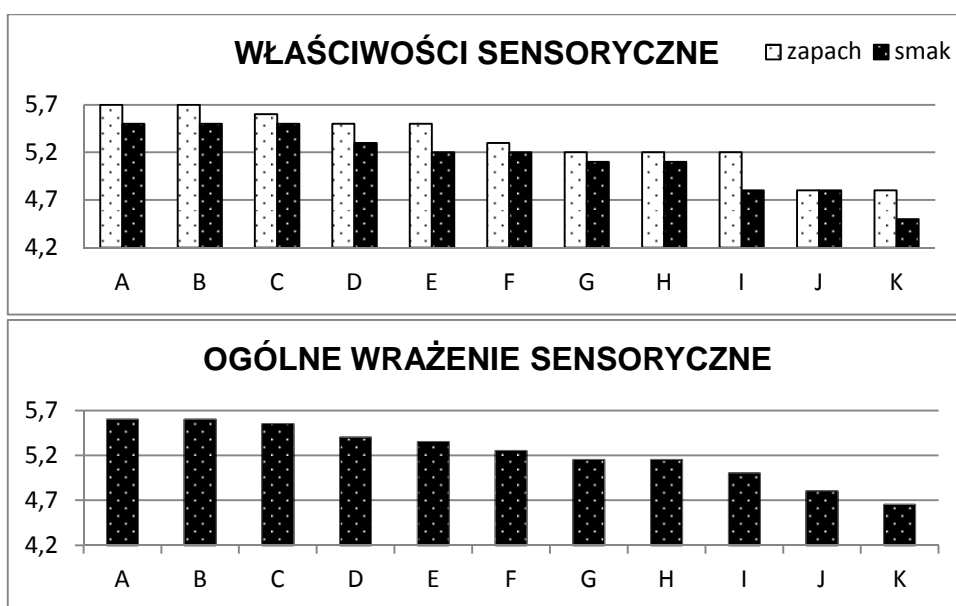
Rys. 11. Profile sensoryczne destylatów rolniczych różnego pochodzenia botanicznego. Destylaty wyprodukowane odpowiednio z kukurydzy (K1-6), pszenżyta (PŻ1-3), żyta odmiany Dankowskie Żółte (ŻDZ1-5), żyta odmiany Dankowskie Diament (ŻDD1-4) oraz pszenicy (P1-3)

1.2 Wódki

Do badań dotyczących oznaczania związków karbonylowych wybrano 11 komercyjnie dostępnych wódek czystych (Finlandia, Wyborowa, Bols, Starogardzka, Absolut Blue, Danzka, Stock, Smirnoff, Luksusowa, Żołądkowa Gorzka Czysta de Luxe oraz Sobieski). Jakość sensoryczna badanych napojów alkoholowych została określona, przez pięciu oceniających, wobec wzorca (ocena 6) w oparciu o klasyczną analizę sensoryczną (wg normy PN-A-79529-2:2005) wykorzystującą sześciopunktową skalę (tab. 10) [137]. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 12. Aby nie reklamować niepotrzebnie poszczególnych produktów, w tabeli wyników nazwy poszczególnych wódek czystych zostały zastąpione symbolami.

Tab. 10. Skala ocen wykorzystywana podczas oceny sensorycznej wódek czystych

Klasyfikacja sensoryczna	Ocena	Smak/zapach
Pożądana	6,0	Idealny, brak nawet najmniejszych odchyień
	5,0	Typowy, charakterystyczny, bez wyczuwalnych odchyień
Tolerowana	4,0	Odpowiedni, z wyczuwalnymi niewielkimi odchyleniami smaku i/lub zapachu
	3,0	Wyczuwalne odchylenia
Niepożądana	2,0	Wyczuwalne silne odchylenia
	1,0	Wyczuwalne bardzo silne odchylenia



Rys. 12. Wyniki analizy sensorycznej próbek wódek czystych, oznaczenia A-K – symbol próbki

2 ODCZYNNIKI CHEMICZNE

Stosowane do badań związki wzorcowe, ich stopień czystości i nazwę producenta zestawiono w tabeli 11.

Tab. 11. Substancje wykorzystywane jako wzorce przy opracowaniu procedury analitycznej

Nazwa związku	Stopień czystości [%]	Producent
ESTRY		
butanian etylu	99/99/98	Acros Organics/ Sigma-Aldrich/ Fluka
butanian heksylu	98	Sigma-Aldrich
dekanian etylu	99/99	Acros Organics/ Sigma-Aldrich
dodekarian etylu	98	Sigma-Aldrich
etanolan 3-metylo-1-butylu	97	Fluka
heksanian etylu	99/98	Sigma-Aldrich/Fluka
heptanian etylu	99/99	Acros Organics/ Sigma-Aldrich
nonanian etylu	99/97	TCI/ Sigma-Aldrich
octan etylu	99,9/99,9/99,5	Fisher Scientific/ Fluka/Sigma-Aldrich
oktanian etylu	99/99/98	Acros Organics/ Sigma-Aldrich/ Fluka
oktanian metylu	99	Sigma-Aldrich
pentanian etylu	98	Sigma-Aldrich
propionian 2-metylopropylu	98/99	Fluka/ Sigma-Aldrich
propionian etylu	99	Sigma-Aldrich
tetradekanian etylu	98	Sigma-Aldrich
undekanian etylu	97/97	Sigma-Aldrich/ Acros Organics
ALKOHOLE		
2-metylobutan-1-ol	99	Sigma-Aldrich
2-metylopropan-1-ol	99,5/99,5	Fluka/ Sigma-Aldrich
3-metylobutan-1-ol	98/98,5	Sigma-Aldrich/ Fluka
butan-1-ol	99,9/99,8	Fisher Scientific/ Riedel-de Haën
butan-2-ol	99,5/99,5	Fluka/ Sigma-Aldrich
metanol	99,9.99,9	Fisher Scientific/ Sigma-Aldrich
pentan-1-ol	99/99	Fluka/ Sigma-Aldrich
propan-1-ol	99,7/99,5	Sigma-Aldrich/ Fluka
ZWIĄZKI KARBONYLOWE		
2-metylopropanal	99	Fluka
3-metylobutanal	98	Fluka
acetal dietylowy acetaldehydu	99	Sigma-Aldrich
acetal dietylowy akroleiny	96	Sigma-Aldrich
aceton	99,9/99,8/99,7	Fluka/ Sigma-Aldrich/ Fisher Scientific
aldehyd benzoesowy	98	Sigma-Aldrich
but-2-enal	99,5	Fluka
butanal	99	Fluka

Tab. 11. Ciąg dalszy

Nazwa związku	Stopień czystości [%]	Producent
ZWIĄZKI KARBONYLOWE		
butano-2,3-dion	99,4	Fluka
dekanal	95	Fluka
etanal	99,5	Fluka
furfural	99/98/98	Sigma-Aldrich/ Alfa Aesar/ SAFC
heksanal	97	Fluka
heptanal	95	Fluka
metanal	36,5	Fluka
nonanal	95	Fluka
oktanal	98	Fluka
pentanal	98	Fluka
pentano-2,3-dion	97	Sigma-Aldrich
prop-2-enal	99	Fluka
propanal	96	Fluka
<i>trans</i> -hept-2-enal	96	Fluka
<i>trans</i> -non-2-enal	97	Sigma-Aldrich
INNE		
(-)- α -pinen	99	Fluka
(+)-3-karen	98,5	Fluka
disulfid dimetylu	99	Sigma-Aldrich
s(-)-limonen	99	Fluka

Inne stosowane odczynniki i gazy:

- woda specjalnej czystości: destylowana i redestylowana (Millipore),
- spirytus rektyfikowany, 95 % (Polmos, Lublin)
- etanol, 99,8 % (Pharmaco-AAPER),
- wzorce węglowodorów alifatycznych C5 - C20 (Sigma-Aldrich),
- chlorek sodu, cz.d.a, (P.P.H. „STANDARD” Sp. z o.o. Polska),
- odczynnik derywatyzujący O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroksyloamina (PFBHA), > 98 % (Fluka),
- kwas siarkowy, 95 % do analizy śladowej *Trace Select* (Fluka),
- oktanian metylu, 99 % (Aldrich),
- deuterowany dimetylosulfotlenek DMSO- d_6), 99,9 % (Cambridge Isotope Laboratories Inc.),

- rozpuszczalniki: octan etylu, 99,9 % (Fisher Scientific), propan-2-ol, 99,5 % (Sigma-Aldrich), aceton, 99,7 % (Fisher Scientific), metanol, 99,9 % (Sigma-Aldrich, Fisher Scientific), heksan, 95 % (Merck), dichlorometan, 99,5 % (Fisher Scientific),
- gazy: wodór, powietrze, hel, azot.

3 APARATURA

W badaniach wykorzystano następujące urządzenia analityczne i sprzęt laboratoryjny:

- chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID):
 - AutosystemXL (Perkin Elmer),
 - Clarus 600 (Perkin Elmer),
 - 6890 Gas System (Agilent Technologies),
- chromatograf gazowy z detektorem wychwytu elektronów (GC-ECD):
 - HP 6890 series GC System (Hewlett Packard),
- chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas (GC-MS):
 - 7890A GC System 5975C Inert MSD (Agilent Technologies),
- kapilarne kolumny chromatograficzne:
 - DB-WAX ze związaną fazą stacjonarną typu glikol polietylenowy (Agilent):
 - (60 m × 0,53 mm × 1 μm),
 - (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm),
 - DB-1301 ze związaną fazą stacjonarną poli(6% - cyjanopropyl-fenyl/94 % metylosiloksanową):
 - (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm),
 - CP-WAX 57 CB ze związaną fazą stacjonarną typu PEG:
 - (50 m × 0,32 mm × 0,2 μm),
 - SPB-20 ze związaną fazą stacjonarną poli(20% - difenyl/80% - dimetylosiloksanową):
 - (30 m × 0,25 mm × 1 μm),
- włókna SPME (Supelco):
 - PDMS (grubość: 7, 30 oraz 100 μm, długość: 1 cm),
 - PDMS/CAR/DVB (grubość: 50/30 μm, długość: 2 cm),
 - PA (grubość: 85 μm, długość: 1 cm),

- włókna SPME pokryte polimerowymi cieczami jonowymi (grubość: 12-16 μm , długość: 1 cm):
 - chlorek poli(1-winylo-3-propylobenzyloimidazoliowy),
 - bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-(4-winylobenzylo)-4-dimetyloaminopirydyniowy),
 - bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-winylo-3-pentylocyjanoimidazoliowy),
 - bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-(4-winylobenzylo)-3-heksadecylomidazoliowy),
 - bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-winylo-3-heksadecyloimidazoliowy),
 - chlorek poli(1-winylo-3-heksyloimidazoliowy),
- urządzenie i statyw do mikroekstrakcji (Supelco),
- termostat z regulacją temperatury (Omnisfera) i aluminiowy blok grzejny (Supelco),
- aparat do otrzymywania wody specjalnej czystości MilliQ A10, Gradient, Elix System oraz QPLUS 185 (Millipore),
- mieszadła magnetyczne (IKA C-MAG HS 7, Corning),
- mikroskop,
- komora z lampą UV 365 nm (UVP High Intensity),
- waga analityczna XP 504 firmy (Mettler Toledo) oraz APX-200 (Denver Instrument),
- wyparka Buchi R-200,
- wytrząsarka,
- płaszcz grzejny,
- spektroskop NMR, 600 MHz Unity INOVA (Varian).

4 SZKŁO LABORATORYJNE I AKCESORIA

Poniżej przedstawiono szkło, naczynia laboratoryjne oraz akcesoria wykorzystywane w trakcie realizacji prac badawczych:

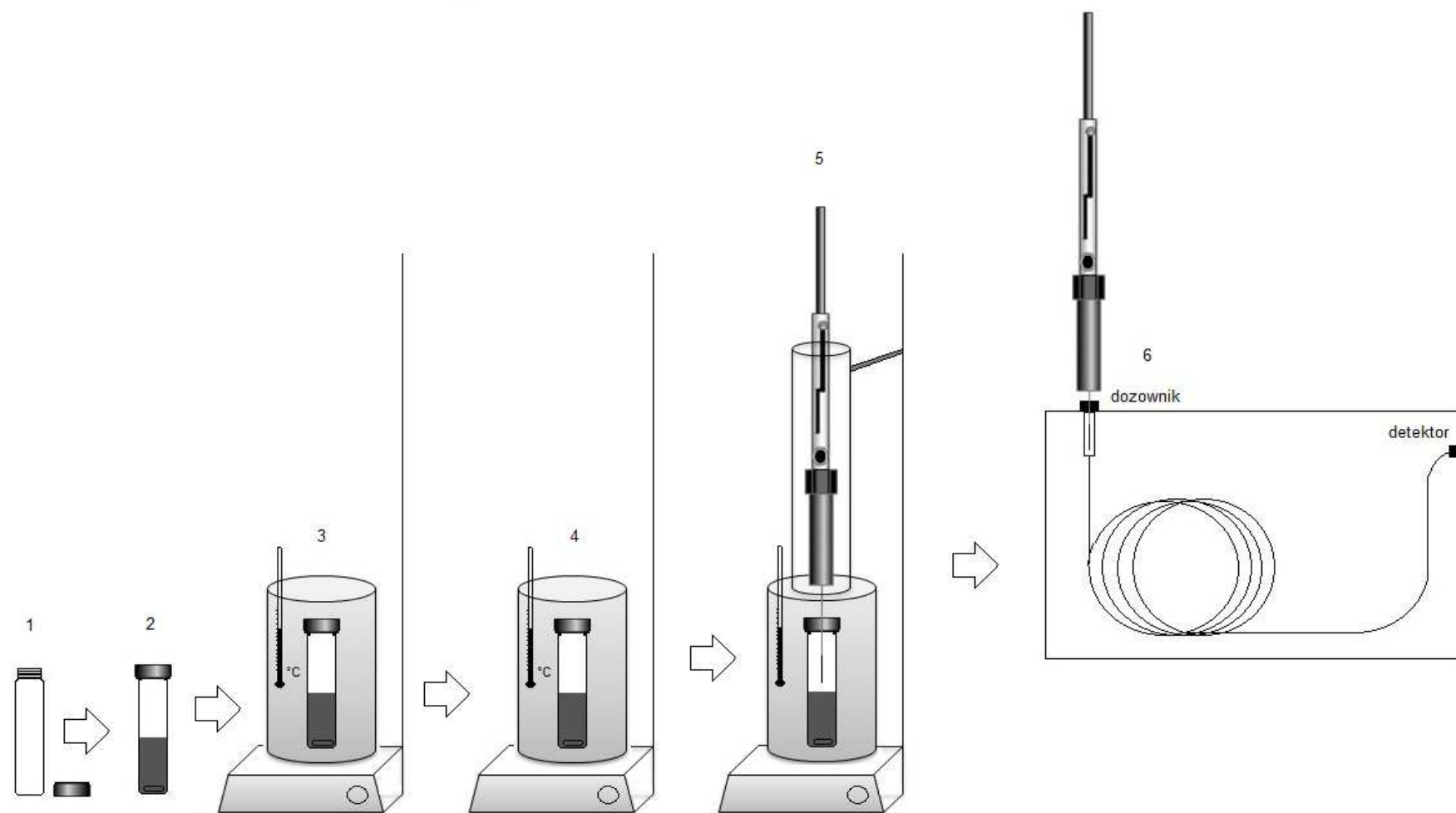
- Fiolki:
 - 1,5 cm³ z „białego” szkła do automatycznego podajnika próbek z plastikowymi zakrętkami i membranami uszczelniającymi z czerwonej gumy butylowej/PTFE (Perkin Elmer),
 - 15 cm³ z „białego” szkła z plastikowymi zakrętkami i membranami uszczelniającymi silikon/PTFE (Supelco),
 - 20 cm³ z ciemnego szkła z zakrętkami ze stali nierdzewnej i membranami uszczelniającymi z czerwonej gumy butylowej/PTFE (Supelco),
 - 20 cm³ z „białego” szkła o wymiarach 28 × 61 mm (Wheaton),
- mikrostrzykawki o objętości 5 µl i 10 µl (Hamilton),
- mikropipety automatyczne Transferpette (Brand) o zakresach objętości:
 - 0,5-10 µl,
 - 10-100 µl,
 - 100-1000 µl,
- pipety miarowe o objętości 0,1 cm³, 0,2 cm³, 1 cm³, 2 cm³, 10 cm³ oraz 25 cm³,
- pipety Pasteura,
- kolby miarowe o objętości 25 cm³, 50 cm³, 100 cm³, 200 cm³, 250 cm³ oraz 500 cm³,
- cylindry miarowe o pojemności 50 cm³,
- probówki szklane do NMR 4,97/4,20 × 178 mm (Duran group GmbH),
- rozdzielacz, chłodnica,
- termometry rtęciowe,
- mieszadła magnetyczne PTFE-POLYGON - z rdzeniem magnetycznym o wysokiej trwałości o wymiarach 3 × 10 mm (VIT-LAB GmbH),
- kapilara o średnicy 100 µm (Polymicro Technologies),
- dwuskładnikowy klej epoksydowy (GC Electronics),
- statyw, łąpy podtrzymujące,
- chusteczki laboratoryjne (KIMTECH Science),
- stoper, pęseta, szpatułki, pilnik, taśma teflonowa, kolorowe taśmy klejące, podstawka z korka, plastikowe pojemniki do ważenia.

5 PROCEDURA IZOLACJI I WZBOGACANIA ANALITÓW

W przeprowadzonych badaniach wykorzystywano mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej jako technikę izolacji i wzbogacania analitów z próbek oraz chromatografię gazową w połączeniu ze spektrometrem mas (MS), detektorem wychwytu elektronów (ECD) oraz detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Tylko w technice bezpośredniego dozowania w metodzie GC-FID nie stosowano etapu wstępnej izolacji i wzbogacania analitów. W celu poprawy czytelności rozprawy oraz uniknięcia powtórzeń opisów stosowanej procedury na rysunku 13 przedstawiono ogólny schemat procedury mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) wykorzystywanej w trakcie realizacji badań. Natomiast szczegółowe parametry każdej z zastosowanych procedur przedstawiono przed każdym zadaniem badawczym.

Procedurę SPME można przedstawić w kilku etapach:

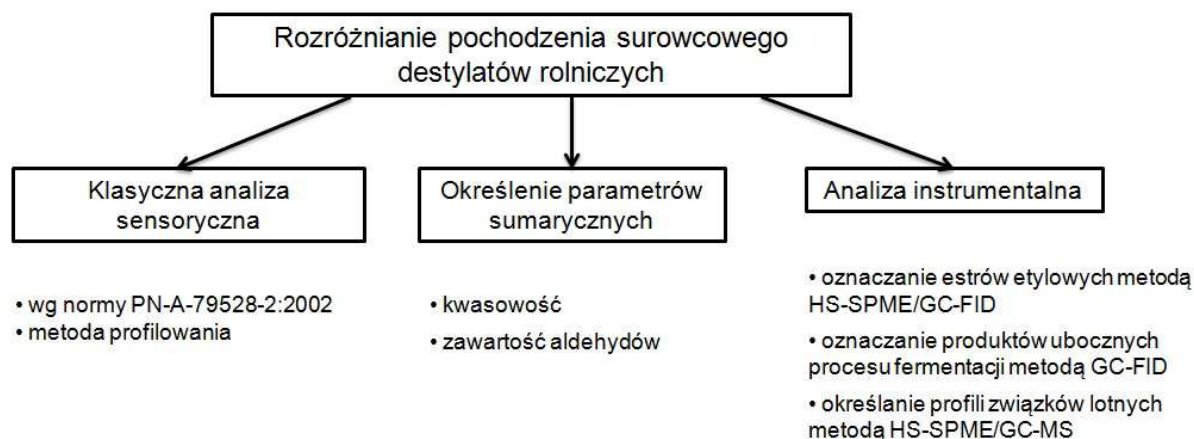
- **1, 2** – przygotowanie próbki o stężeniu 20 % etanolu (v/v) w fiolce o pojemności 15 cm³ bądź 20 cm³ (procentowa zawartość etanolu w przypadku opracowywania procedury PIL-SPME wahała się w granicach 10 – 40 %)
- **3** – etap termostatowania próbki w celu ustalenia się stanu równowagi międzyfazowej (od tego momentu procedury SPME, próbka jest mieszana ze stałą szybkością obrotów)
- **4** – etap derywatyzacji analitów. Etap ten obecny jest tylko w przypadku oznaczania związków karbonylowych w wódkach czystych, natomiast podczas oznaczania produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej w destylatach rolniczych oraz przy opracowywaniu procedury PIL-SPME etap ten jest pomijany
- **5** – ekstrakcja analitów z fazy nadpowierzchniowej próbki (10-50 min)
- **6** – desorpcja zasorbowanych analitów w dozowniku chromatografu gazowego 170 °C/ 250 °C/ 260 °C (w zależności od procedury) przez czas 5 min.



Rys. 13. Schemat procedury mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej wykorzystywanej w trakcie prowadzenia badań, etapy 1÷6 – objaśnienia w tekście

6 ROZRÓŻNIANIE POCHODZENIA BOTANICZNEGO DESTYLATÓW ROLNICZYCH

Działania podjęte w celu rozróżniania pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych przedstawiono w formie schematu (rys. 14), aby zwiększyć czytelność tej części rozprawy.

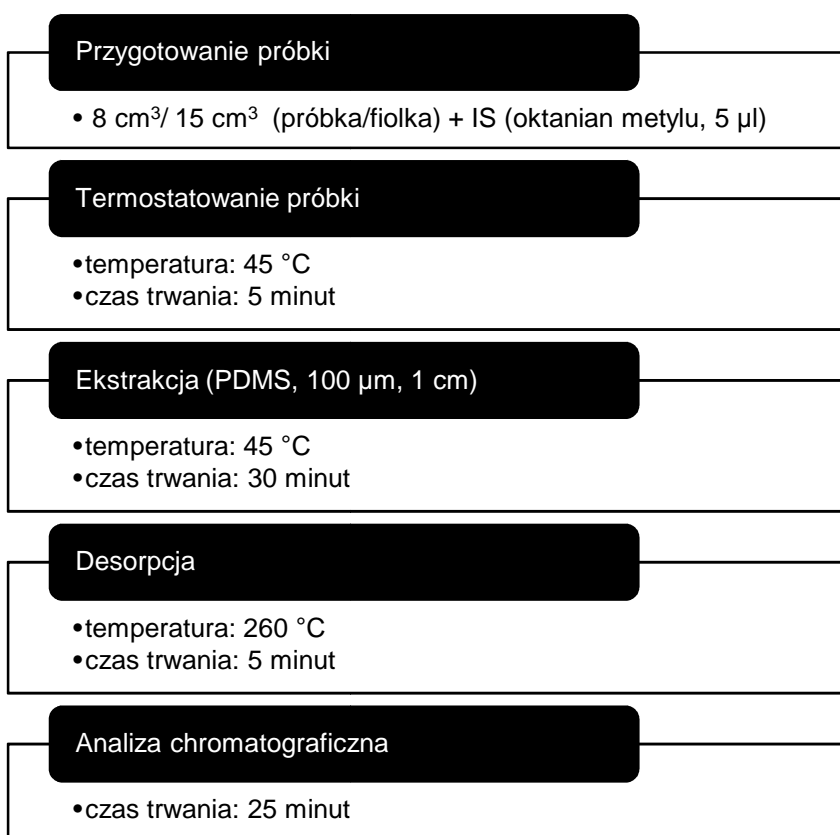


Rys. 14. Schemat przeprowadzonych badań dotyczących tematyki rozróżniania pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych

6.1 Oznaczanie estrów etylowych metodą HS-SPME/GC-FID

Estry są związkami, którym przypisuje się znaczący wpływ na walory smakowo-zapachowe napojów alkoholowych. W literaturze nie brak jest prac poświęconych oznaczaniu zawartości tej grupy związków. Wielu autorów opisuje genezę powstawania estrów, ich zróżnicowaną zawartość w produktach alkoholowych (w szczególności winach) oraz wpływ jaki wywierają na ich jakość [138-143]. W Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej również zajmowano się oznaczaniem tej grupy związków. Opracowaną procedurę oznaczania estrów etylowych wykorzystano do oznaczania ich zawartości w destylatach rolniczych i podjęto próbę określenia możliwości powiązania ich ilości z jakością sensoryczną badanych próbek. Jednakże wykonane badania nie wykazały statystycznie istotnych różnic w ilości estrów etylowych występujących w destylatach rolniczych złej i dobrej jakości [42]. W tej sytuacji podjęto prace nad sprawdzeniem istnienia związku pomiędzy pochodzeniem botanicznym destylatów rolniczych, a ilością estrów etylowych w nich obecnych. W pracy wykorzystano wspomnianą wcześniej procedurę [42].

Analizie poddano dwadzieścia jeden próbek destylatów rolniczych wyprodukowanych z żyta (9) kukurydzy (6), pszenicy (3) oraz pszenżyta (3). Wspólną cechą wszystkich analizowanych próbek była ich bardzo dobra jakość, zgodna z wymaganiami polskiej normy PN-A-79528-2:2002 [133]. W prezentowanej części badań dokonano ilościowych oznaczeń dziesięciu estrów etylowych, począwszy od octanu etylu (C2), a skończywszy na dodekaniu etylu (C12). Podstawowe parametry izolacji i wzbogacania analitów z zastosowaniem wspomnianej procedury przedstawiono na rysunku 15, a szczegółowe parametry pracy układu chromatograficznego przedstawiono w tabeli 12.



Rys. 15. Schemat procedury oznaczania estrów etylowych w destylatach rolniczych

Tab. 12. Warunki pracy układu chromatograficznego

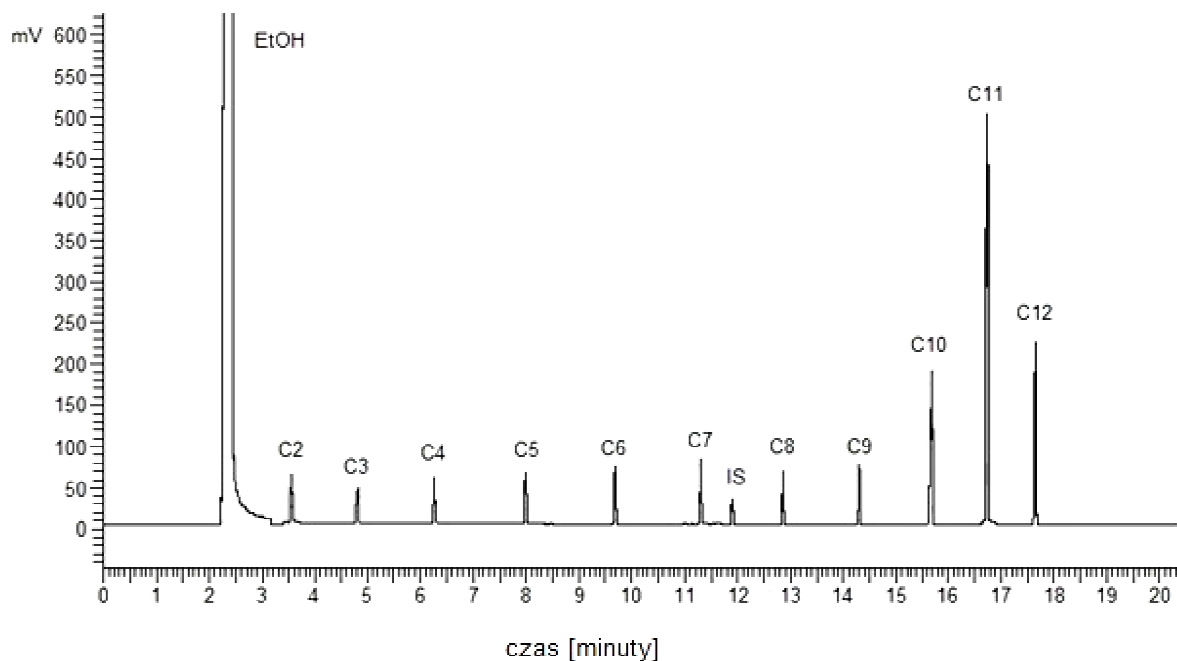
Parametr	Wartość
Kolumna	SPB-20 (30 m x 0,25 mm x 1 µm)
Program temperaturowy	60 °C (1 min) $\xrightarrow{10\text{ °C/min}}$ 200 °C $\xrightarrow{20\text{ °C/min}}$ 250 °C (7,5 min)
Gaz nośny	hel
Objętościowe natężenie gazu nośnego	1,5 cm ³ /min
Temperatura dozownika/ detektora	260 °C/ 250 °C
Tryb pracy dozownika	bez podziału strumienia

Roztwory wzorcowe sporządzono przy użyciu substancji wzorcowych (tab. 11 str. 53). Próbkę analizowaną były trzykrotnie, a otrzymane wyniki uśredniano. Wszystkie roztwory wzorcowe, substancje wzorcowe, jak również próbki rzeczywiste przechowywano w temperaturze 4 °C. Z uwagi na fakt, iż warunki prowadzenia przeze mnie badań były tożsame z warunkami i aparaturą wykorzystywanymi podczas opracowywania procedury analitycznej, przy ocenie wyników korzystano z obliczonych parametrów walidacyjnych (tylko granic wykrywalności i oznaczalności) [42, 144].

Tab. 13. Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOD) estrów etylowych z wykorzystaniem procedury HS-SPME/GC-FID [42, 144]

Nazwa związku	LOD [µg/dm ³]	LOQ [µg/dm ³]
octan etylu	26,8	80,4
propionian etylu	8,6	25,8
butanian etylu	3,09	9,27
pentanian etylu	0,797	2,39
heksanian etylu	6,68	20,0
heptanian etylu	0,0540	0,162
oktanian etylu	1,44	4,32
nonanian etylu	0,269	0,807
dekanian etylu	0,550	1,65
undekanian etylu	0,0470	0,141
dodekanian etylu	2,79	8,37

Do identyfikacji poszczególnych estrów użyto wzorców odpowiednich związków, dla których wyznaczono czasy retencji. Na rysunku 16 przedstawiono typowy chromatogram mieszaniny związków wzorcowych.



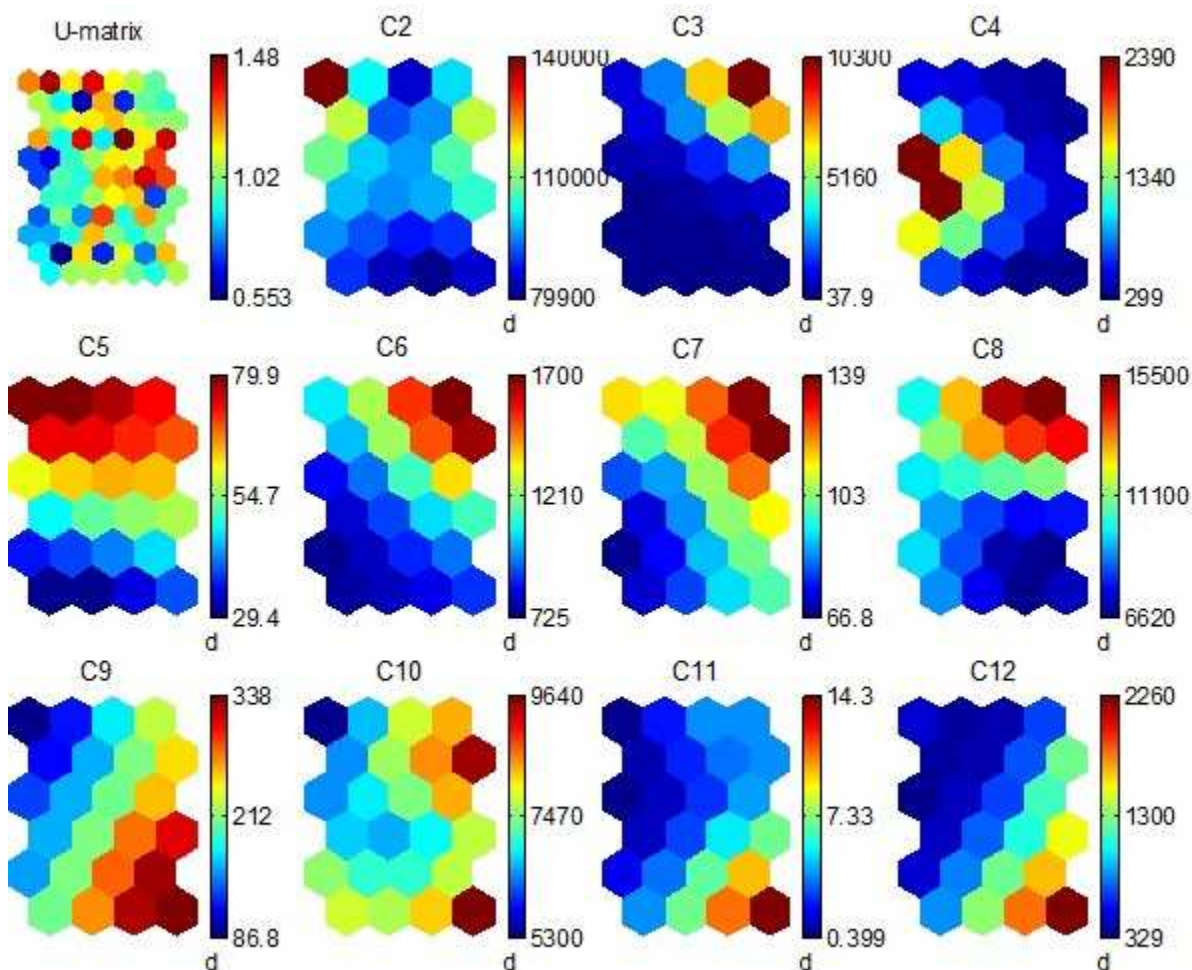
Rys. 16. Chromatogram wzorców estrów etylowych: C2 - octan etylu, C3 – propionian etylu, C4 – butanian etylu, C5 – pentanian etylu, C6 – heksanian etylu, C7-heptanian etylu, C8 – oktanian etylu, C9 – nonanian etylu, C10 – dekanian etylu, C11 – undekanian etylu, C12 - dodekanian etylu, IS – oktanian metylu

Zawartość estrów etylowych kwasów tłuszczowych w próbkach destylatów rolniczych różnego pochodzenia surowcowego przedstawiono w tabeli 14. Analizując dane przedstawione w tabeli można stwierdzić, iż trudno zaobserwować zależności występujące pomiędzy ilością estrów w poszczególnych próbkach. Mając powyższe na uwadze, do określenia różnic pomiędzy badanymi destylatami rolniczymi różnego pochodzenia botanicznego, zdecydowano się wykorzystać wprowadzoną przez Kohonena w latach 80-tych metodę samoorganizującego odwzorowania cech (SOM – Self Organizing Maps) [145].

Tab. 14. Zawartość estrów etylowych kwasów tłuszczowych w próbkach destylatów rolniczych różnego pochodzenia surowcowego (<LOD – poniżej granicy wykrywalności, <LOQ – poniżej granicy oznaczalności)

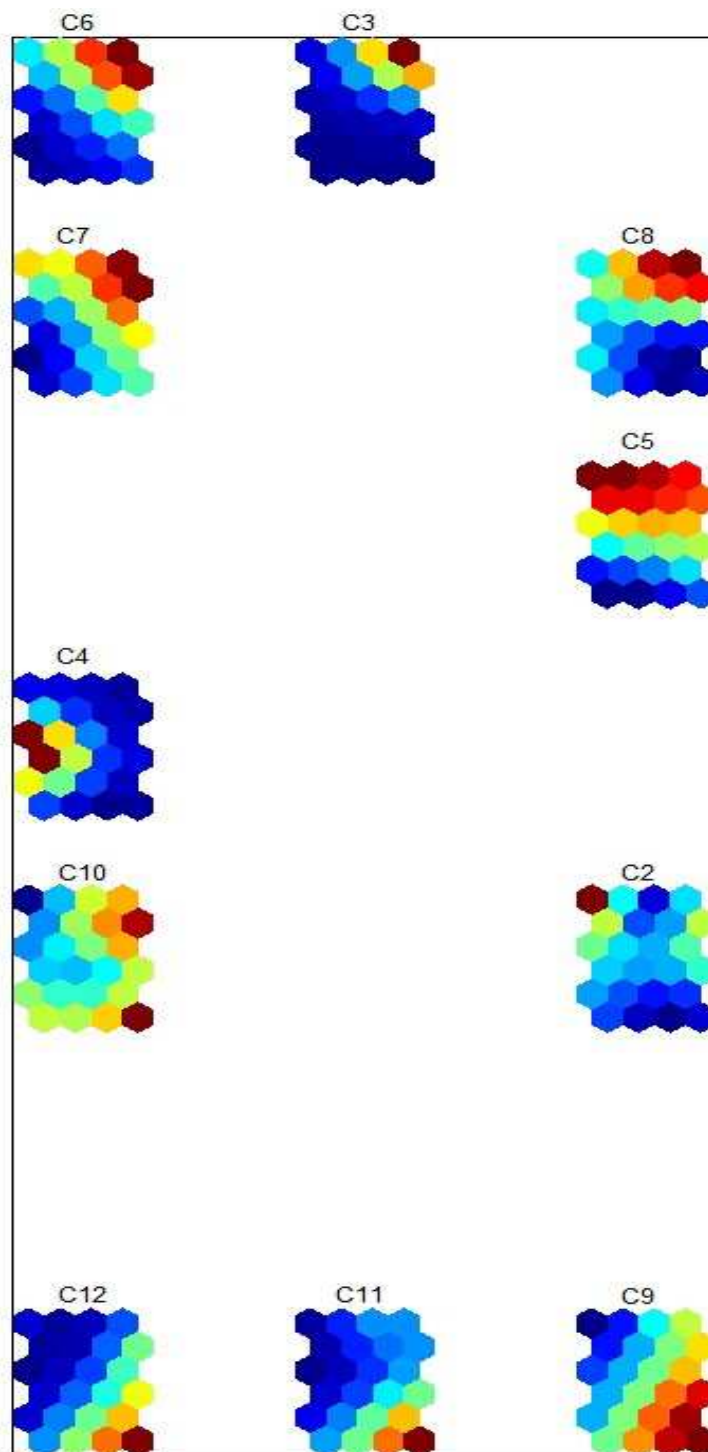
SUROWIEC	Stężenie [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$] [średnia \pm U(k=2)]										
	octan etylu [10^3]	propionian etylu [10^2]	butanian etylu [10]	pentanian etylu	heksanian etylu [10^2]	heptanian etylu	oktanian etylu [10^3]	nonanian etylu	dekanian etylu [10^2]	undekanian etylu	dodekanian etylu [10^2]
Kukurydza	147,3 \pm 3,5	<LOD	13,24 \pm 0,46	79,8 \pm 3,3	8,51 \pm 0,23	104,2 \pm 3,8	9,86 \pm 0,43	58,2 \pm 1,9	25,99 \pm 0,90	<LOD	<LOD
	88,0 \pm 2,1	<LOQ	11,91 \pm 0,39	68,0 \pm 2,9	13,41 \pm 0,36	158,3 \pm 4,3	11,71 \pm 0,50	212,1 \pm 8,3	100,2 \pm 3,5	2,84 \pm 0,11	3,52 \pm 0,18
	121,5 \pm 2,9	23,86 \pm 0,83	50,0 \pm 1,6	90,3 \pm 3,4	17,93 \pm 0,37	93,9 \pm 3,6	18,38 \pm 0,80	76,7 \pm 3,1	88,2 \pm 3,1	9,51 \pm 0,37	3,28 \pm 0,14
	88,0 \pm 2,1	<LOD	10,04 \pm 0,36	34,6 \pm 1,9	6,32 \pm 0,18	55,4 \pm 2,6	13,13 \pm 0,55	78,1 \pm 3,2	6 946 \pm 2,4	<LOD	<LOQ
	110,0 \pm 2,5	<LOQ	10,02 \pm 0,39	58,7 \pm 2,6	6,94 \pm 0,19	74,3 \pm 3,3	12,40 \pm 0,54	112,7 \pm 3,9	101,4 \pm 3,5	<LOD	3,16 \pm 0,13
	173,4 \pm 3,7	13,70 \pm 0,40	68,2 \pm 2,0	82,0 \pm 3,4	12,10 \pm 0,33	137,7 \pm 4,2	7,67 \pm 0,33	88,7 \pm 3,3	65,6 \pm 2,2	<LOD	10,45 \pm 0,43
Żyto (Dankowskie Złote)	94,9 \pm 2,2	<LOD	24,7 \pm 1,2	70,0 \pm 3,1	8,86 \pm 0,22	82,0 \pm 3,4	5,39 \pm 0,23	216,2 \pm 6,8	5 2,1 \pm 1,7	0,711 \pm 0,025	9,31 \pm 0,39
	103,7 \pm 2,3	6,25 \pm 0,19	54,3 \pm 1,8	41,1 \pm 2,2	12,76 \pm 0,33	113,5 \pm 4,0	7,07 \pm 0,32	260,3 \pm 8,5	4 8,8 \pm 1,7	3,72 \pm 0,13	6,68 \pm 0,29
	106,6 \pm 2,3	<LOD	12,05 \pm 0,41	27,0 \pm 1,4	6,29 \pm 0,19	60,4 \pm 2,8	10,89 \pm 0,48	135,4 \pm 4,8	115,0 \pm 3,4	<LOD	3,90 \pm 0,19
	126,3 \pm 2,7	5,11 \pm 0,17	56,0 \pm 1,8	64,4 \pm 2,9	11,83 \pm 0,32	102,8 \pm 3,9	7,20 \pm 0,32	304 \pm 10	74,1 \pm 2,3	4,64 \pm 0,20	14,67 \pm 0,62
	92,4 \pm 2,2	<LOQ	41,2 \pm 1,5	29,1 \pm 1,4	9,45 \pm 0,30	93,5 \pm 3,6	10,59 \pm 0,48	276,3 \pm 8,5	156,1 \pm 5,5	22,8 \pm 0,86	36,5 \pm 1,5
Żyto (Dankowskie Diament)	77,3 \pm 2,0	2,00 \pm 0,11	28,7 \pm 1,3	70,0 \pm 3,1	8,53 \pm 0,21	120,2 \pm 4,0	3,99 \pm 0,18	459 \pm 15	57,3 \pm 2,0	10,93 \pm 0,41	12,96 \pm 0,55
	61,5 \pm 1,9	<LOD	118,2 \pm 3,6	29,4 \pm 1,7	5,33 \pm 0,17	64,5 \pm 2,9	4,47 \pm 0,19	307 \pm 10	61,3 \pm 2,1	8,56 \pm 0,34	17,66 \pm 0,74
	58,2 \pm 1,7	<LOQ	16,12 \pm 0,44	20,8 \pm 1,1	6,56 \pm 0,18	91,9 \pm 3,6	4,19 \pm 0,18	381 \pm 12	64,4 \pm 2,2	13,51 \pm 0,53	20,33 \pm 0,87
	151,2 \pm 3,6	4,01 \pm 0,15	39,2 \pm 1,4	65,6 \pm 2,9	19,63 \pm 0,77	147,1 \pm 4,2	16,30 \pm 0,70	304 \pm 10	153,8 \pm 5,2	4,86 \pm 0,19	36,3 \pm 1,5
Pszenżyto	102,6 \pm 2,4	4,86 \pm 0,17	984 \pm 33	54,2 \pm 2,3	8,21 \pm 0,19	66,1 \pm 2,9	5,87 \pm 0,24	150,1 \pm 5,1	21,84 \pm 0,77	<LOD	0,880 \pm 0,037
	95,7 \pm 2,3	<LOQ	16,81 \pm 0,46	25,2 \pm 1,3	8,28 \pm 0,20	79,0 \pm 3,3	8,73 \pm 0,37	201,2 \pm 7,2	68,95 \pm 2,4	4,54 \pm 0,18	6,30 \pm 0,28
	94,5 \pm 2,3	<LOQ	16,34 \pm 0,44	12,72 \pm 0,61	9,68 \pm 0,29	81,9 \pm 3,4	10,67 \pm 0,46	273,4 \pm 8,6	106,9 \pm 3,9	6,65 \pm 0,26	13,23 \pm 0,55
Pszenica	104,2 \pm 2,5	107,2 \pm 3,5	27,5 \pm 1,2	67,4 \pm 3,7	19,26 \pm 0,77	166,5 \pm 4,4	14,34 \pm 0,63	257,2 \pm 8,4	56,2 \pm 2,0	4,68 \pm 0,19	0,728 \pm 0,030
	135,4 \pm 2,9	301,8 \pm 7,0	36,6 \pm 1,4	75,9 \pm 3,3	17,02 \pm 0,36	133,2 \pm 4,1	17,93 \pm 0,77	263,1 \pm 8,6	60,7 \pm 2,1	1,363 \pm 0,053	0,775 \pm 0,033
	81,5 \pm 2,1	9,20 \pm 2,8	45,0 \pm 1,7	85,8 \pm 4,4	10,34 \pm 0,35	83,7 \pm 3,4	14,71 \pm 0,55	144,5 \pm 4,6	62,9 \pm 2,1	<LOD	0,430 \pm 0,019

SOM jest siecią neuronową, modelem badania i schematem wizualizacji dużych zbiorów danych w przestrzeni. Metodę samoorganizującego odwzorowania cech można uznać za nieliniową technikę mapowania, która identyfikuje klastry w zbiorze danych bez sztywnych założeń liniowości lub normalności rozkładu tradycyjnych technik statystycznych. W przeciwieństwie do innych sieci neuronowych podejście SOM nie wymaga nauczyciela (wzorców wyjściowych), a jedynie danych wejściowych (uczących). Zadaniem samoorganizującego odwzorowania cech jest stworzenie takich wzorców uczących. Samoorganizujące odwzorowanie cech (SOM) składa się z dwóch warstw: warstwy wejściowej, która klasyfikuje dane według ich podobieństwa i warstwy wyjściowej neuronów ułożonych jako mapa dwuwymiarowa. Klasyfikacja odbywa się na podstawie wektorów n -wymiarowych, gdzie n jest liczbą mierzonych parametrów (zmienne). Po normalizacji, próbki z wielowymiarowego zbioru danych przypisuje się do określonego węzła. Szkolenie algorytmu klasyfikacji sieci Kohonena opiera się o zasadę "zwycięzca bierze wszystko", gdzie "zwycięzca" to węzeł, którego wektor jest najbardziej zgodny z wektorem próbek wejściowych. Zwycięski węzeł uzyskuje możliwość adaptacji swoich wag (w praktyce wagi neuronu zwycięzcy oraz neuronów sąsiadujących). Projekcja z wielowymiarowych danych w celu otrzymania postaci dwuwymiarowej zwykle odbywa się przez obliczenie stosunku pomiędzy dwoma największymi wartościami własnymi danych wejściowych zgodnie z wielkością i liczbą jednostek na mapie. „Przeszkolona mapa” może stanowić graficznie odwzorowanie klasyfikacji obiektów i dystrybucji zmiennych. Ta jednoczesna prezentacja sprawia, że metoda SOM jest odpowiednim narzędziem do ujawniania i identyfikacji "ukrytych" wzorów wśród mierzonych parametrów. Dodatkowo, metoda samoorganizującego odwzorowania cech wskazuje matrycę danych wejściowych (U-matrix), w której wizualizowane są odległości między węzłami. W przeprowadzonej w niniejszej rozprawie interpretacji danych wszystkie obliczenia dotyczące analizy SOM wykonane zostały z wykorzystaniem oprogramowania SOM Toolbox 2.0 [146, 147].



Rys. 17. Wizualizacja zależności/podobieństwa pomiędzy zmiennymi (estry etylowe od C2 do C12) oznaczanymi w destylatach rolniczych

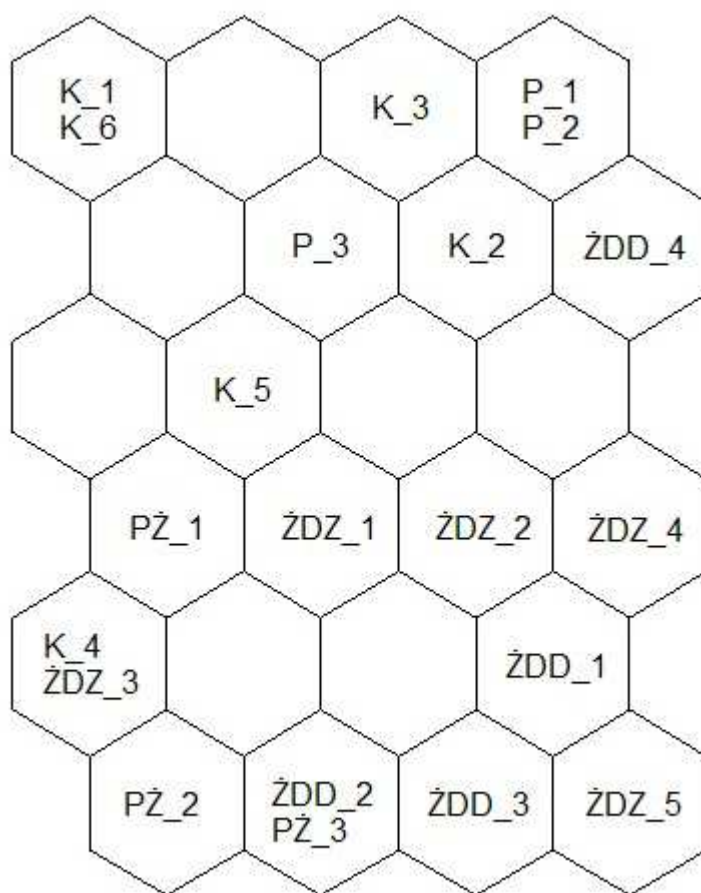
Na rysunku 17 przedstawiono matrycę danych wyjściowych (U-matrix) analizowanych próbek oraz wizualizację zależności występujących pomiędzy próbkami, a zawartością oznaczanych w nich związków. Używając skali kolorów na mapie SOM widoczne są odległości pomiędzy poszczególnymi węzłami oraz rozkład zmiennych. Analizując rysunek 17 można zaobserwować jak w przestrzeni rozkładają się poszczególne zmienne w badanych obiektach. Próbki charakteryzujące się wysoką zawartością propionianu etylu (C3), heksanianu etylu (C6), heptanianu etylu (C7) oraz oktanianu etylu (C8) usytuowane są w górnej prawej części mapy, podczas gdy próbki z wysoką zawartością nonanianu etylu (C9), undekanianu etylu (C11) oraz dodekanianu etylu (C12) położone są w prawym dolnym segmencie mapy. Ponadto próbki zawierające stosunkowo wysokie stężenie pentanianu etylu (C5) usytuowane są w górnej części mapy, w miejscu próbek o niskiej zawartości nonanianu etylu (C9), undekanianu etylu (C11) oraz dodekanianu etylu (C12).



Rys. 18. Korelacja zmiennych SOM na płaszczyźnie

Na rysunku 18 przedstawiona została korelacja oznaczanych związków na płaszczyźnie. Wysoko skorelowane estry (pozytywnie lub negatywnie) położone są w bliskiej odległości między sobą i mogą wykazywać wspólny rozkład. Pierwszą grupę estrów, jaka może być zaobserwowana na rysunku, stanowią estry o wysokiej masie cząsteczkowej: nonanian etylu (C9), undekanian etylu (C11) oraz dodekanian etylu (C12). Drugą grupę

stanowią propionian etylu (C3), heksanian etylu (C6) oraz heptanian etylu (C7). Charakterystyczną cechą tej grupy jest wysokie stężenie wyżej wymienionych estrów w lewej górnej części mapy. Kolejną, jest grupa zawierająca pentanian etylu (C5) i oktanian etylu (C8). Podwyższona zawartość tych związków sytuuje je w górnej części mapy SOM. Powodem istnienia ostatniej grupy (C4, C10) jest ujemna korelacja między oboma estrami. Stężenie ostatniego estru – octanu etylu, występującego na najwyższym poziomie w destylatach rolniczych jest wysoce zróżnicowane, dlatego też zmienna ta usytuowana jest na mapie oddzielnie.



Rys. 19. Klasyfikacja próbek destylatów rolniczych różnego pochodzenia botanicznego: K – kukurydza, P – pszenica, ŻDD – żyto Dankowskie Diament, ŻDZ – Żyto Dankowskie Żółte, PŻ - pszenżyto

Na rysunku 19 przedstawiony został rozkład próbek destylatów rolniczych wyprodukowanych z różnych surowców. Porównanie rozkładu próbek oraz planu rozkładu zmiennych może być wykorzystane do identyfikacji specyficznego „wzorca” estrów etylowych w poszczególnych destylatach rolniczych. Przykładowo, na podstawie stężenia estrów etylowych w destylatach rolniczych można dokonać podziału destylatów

wyprodukowanych z kukurydzy. Pięć z sześciu badanych próbek charakteryzuje się wysokimi stężeniami octanu etylu, propionianu etylu, pentanianu etylu, heksanianu etylu, heptanianu etylu i oktanianu etylu oraz umiarkowanie niskimi stężeniami pozostałych estrów. Taką samą zależność obserwuje się również w przypadku próbek pszenicy. Usytuowanie próbki K_6 w dolnym rogu mapy jest spowodowane niskimi stężeniami propionianu etylu, pentanianu etylu, heksanianu etylu oraz heptanianu etylu w tej próbce, w porównaniu do stężenia tych związków w innych próbkach destylatów rolniczych wyprodukowanych z kukurydzy oraz pszenicy. Drugą grupę próbek stanowią destylaty rolnicze wyprodukowane z żyta (odmian Dankowskie Żłote oraz Dankowskie Diament) oraz pszenżyta. Grupa ta znajduje się w dolnej części mapy SOM i charakteryzuje się wysoką zawartością nonanianu etylu (C9), undekanianu etylu (C11) oraz dodekanianu etylu (C12). Wyjątkiem jest tylko próbka ŻDD_4, która charakteryzuje się stosunkowo wysokimi zawartościami następujących estrów: octanu etylu, propionianu etylu, heksanianu etylu, heptanianu etylu oraz oktanianu etylu.

Głównym wnioskiem, który może być wyciągnięty z przeprowadzonych badań i chemometrycznej obróbki wyników jest możliwość podzielenia badanych destylatów rolniczych na dwie zasadnicze grupy. Pierwszą grupę stanowią próbki destylatów rolniczych wyprodukowanych z kukurydzy i pszenicy, natomiast drugą grupę stanowią destylaty rolnicze wyprodukowane z żyta i pszenżyta. Destylaty rolnicze wyprodukowane z kukurydzy i pszenicy charakteryzują się wysoką zawartością octanu etylu (C2), propionianu etylu (C3), pentanianu etylu (C5), heksanianu etylu (C6), heptanianu etylu (C7) oraz oktanianu etylu (C8). Natomiast destylaty wyprodukowane z żyta i pszenżyta charakteryzują się wysokimi stężeniami nonanianu etylu (C9), undekanianu etylu (C11) oraz dodekanianu etylu (C12). Rozróżnienia destylatów rolniczych nie można przeprowadzić na podstawie zawartości butanianu etylu (C4) oraz dekanianu etylu (C10) ze względu na różnorodność poziomów stężeń na jakich związki te występują w próbkach należących do poszczególnych grup. Ponadto duże podobieństwo profili estrów etylowych w destylatach obu grup sprawiło, iż nie udało się rozróżnić destylatów wyprodukowanych z żyta od tych wyprodukowanych z pszenżyta oraz destylatów kukurydzianych od pszenicznych.

6.2 Oznaczanie głównych produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej metodą GC-FID

Oznaczanie estrów etylowych w destylatach rolniczych wykazało pewne różnice w poziomach stężeń poszczególnych estrów występujących w destylatach rolniczych wyprodukowanych z różnych surowców. Jednakże przedstawione powyżej badania skłoniły mnie do poszukiwania także innych zależności. Zdecydowano się wykorzystać metodę GC-FID do oznaczania 25 głównych produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej. Zaproponowana przeze mnie metoda jest przedmiotem wdrożenia w firmie Destylarnia Sobieski S.A. w Starogardzie Gdańskim (załącznik 1), dlatego też szczegółowe dane procedury nie mogą być ujawnione. Wdrożona przeze mnie procedura jest bardzo podobna do opisanej w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2870/2000 [148]. Podstawowe parametry procedury zostały przekazane recenzentowi wewnętrznemu w sprawozdaniach rocznych.

Metoda GC-FID obejmowała oznaczanie ilościowe dwudziestu pięciu związków ubocznych procesu fermentacji alkoholowej. Oznaczone związki oraz podstawowe parametry walidacji opracowanej procedury znajdują się w tabeli 15.

W opracowanej metodzie zastosowano metodę kalibracji zewnętrznej. Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) obliczono w oparciu o wartości odchylenia standardowego zbioru sygnałów i kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej (równanie 1) [149].

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s}{b} \quad (1)$$

gdzie:

b – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

s – szczytkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej lub odchylenie standardowe wyrazu wolnego uzyskanej krzywej kalibracyjnej

Wartość granicy wykrywalności przedstawiono jako średnią obliczoną na podstawie granic wykrywalności obliczonych dwoma sposobami: na podstawie szczytkowego odchylenia standardowego krzywej kalibracyjnej oraz odchylenia standardowego wyrazu wolnego krzywej kalibracyjnej. Granica oznaczalności została natomiast wyznaczona jako trzykrotna wartość obliczonej uprzednio granicy wykrywalności. Określono również współczynniki regresji (*R*) i powtarzalność metody jako wartość współczynnika zmienności (*CV*). Otrzymane współczynniki regresji (*R*) są większe od wartości 0,993 i wskazują na dobrą liniowość metody, natomiast współczynniki zmienności wahają się w granicach

1,5-6,3 % (w zależności od oznaczanego związku) co świadczy o dobrej powtarzalności metody.

Współczynniki zmienności obliczono na podstawie poniższej zależności.

$$CV = RSD \cdot 100 \% \quad (2)$$

gdzie:

RSD – względne odchylenie standardowe

Tab. 15. Granice oznaczalności wybranych związków

Nazwa związku	LOD [mg/dm ³]	LOQ [mg/dm ³]
2-metylopropan-1-ol	0,70	2,10
2-metylopropanal	0,50	1,50
3-metylobutan-1-ol	0,35	1,05
acetal dietylowy acetaldehydu	0,33	1,00
acetal dietylowy akroleiny	0,36	1,08
aceton	0,29	0,87
but-2-enal	0,41	1,23
butan-1-ol	0,45	1,35
butan-2-ol	0,29	0,87
butanal	0,27	0,81
butanian etylu	0,37	1,11
etanal	0,39	1,17
etanolan 3-metylobutyłu	0,28	0,84
furfural	0,37	1,11
heksanal	0,32	0,96
heksanian etylu	0,20	0,60
metanol	0,66	1,98
octan etylu	0,39	1,17
oktanian etylu	0,36	1,08
pentan-1-ol	0,31	0,93
pentanal	0,39	1,17
prop-2-enal	0,23	0,69
propan-1-ol	0,40	1,20
propanal	0,10	0,30
propionian 2-metylobutyłu	0,70	2,10

Porównując wartości granic oznaczalności, wykrywalności oraz powtarzalności opracowanej metody z metodą o podobnych parametrach, opracowaną w innym ośrodku

naukowym, można zauważyć duże podobieństwo i uznać otrzymane wyniki za zadowalające [150].

Do tej części badań wykorzystano 281 próbek destylatów rolniczych do produkcji których użyto różnych surowców: żyta (256), pszenżyta (8), pszenicy (7) oraz kukurydzy (10). Destylaty wyprodukowano w lokalnych gorzelniach rolniczych województwa pomorskiego. Wszystkie próbki zakwalifikowane zostały jako dobrej jakości, spełniające wymagania Polskiej Normy PN-A-79528-2 [133].

Coraz częściej w analityce chemicznej do rozróżniania badanych obiektów i określania zależności pomiędzy analizowanymi wielkościami wykorzystuje się metody statystyczne m.in. kanoniczną i liniową analizę dyskryminacyjną (CDA – *Canonical Discriminant Analysis* oraz LDA - *Linear Discriminant Analysis*), metodę głównych składowych (PCA - *Principal Component Analysis*) oraz analizę skupień (CA – *Cluster Analysis*) [151-158]. W celu rozróżnienia pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych zdecydowano się zastosować analizę dyskryminacyjną z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 8.0. Proponowane podejście rozróżniania destylatów rolniczych na podstawie ilościowej analizy głównych produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej wraz z chemometryczną obróbką wyników jest ciekawą alternatywą dla dotychczas stosowanych metod, głównie ze względu na fakt, iż wykorzystuje ona sprzęt dostępny w każdym laboratorium przemysłowym. Do tej pory rozróżnianie destylatów (wyprodukowanych z żyta, kukurydzy i ziemniaków) opierało się głównie na metodzie SPME-MS [159]. Metoda ta niesie ze sobą pewien potencjał, jednakże wdrożenie jej do zakładowych laboratoriów będzie trudne, głównie ze względu na konieczność zakupu drogiej aparatury. O trafności wyboru metody świadczy fakt, iż autorzy innego ośrodka naukowego w ostatnim czasie również wybrali tę samą metodę do rozróżniania destylatów rolniczych wyprodukowanych z żyta, kukurydzy i ziemniaków [150].

Wybrana analiza chemometryczna (analiza funkcji dyskryminacyjnej) jest stosowana do rozstrzygania, które z oznaczanych związków (zmiennych) pozwalają w najlepszy sposób podzielić przypadki (próbki) na grupy [160]. Pierwszym krokiem do przeprowadzenia analizy było określenie zmiennych. Pod uwagę brane były wszystkie oznaczane związki (tab. 15). Jako zmienną grupującą wybrano surowiec z jakiego wyprodukowany został destylat. Następnie do modelu wybrano reprezentatywną liczbę próbek destylatów wyprodukowanych z żyta (grupa destylatów żytnich jest jednorodna), tak aby zbiór przypadków w grupach był zbliżony. Następnie sprawdzona została korelacja pomiędzy zmiennymi. W przypadku istnienia wysokiej korelacji między niektórymi z oznaczanych związków, pary silnie

korelujących zmiennych wykluczano z modelu statystycznego. Zmienne o istotnym statystycznie powiązaniu nie powinny pojawiać się jako zmienne dyskryminujące w tym samym modelu statystycznym. Korelacja pomiędzy zmiennymi została określona współczynnikiem korelacji liniowej Pearsona oraz współczynnikiem korelacji rang Spearmana. Następnie przeprowadzono wstępną analizę dyskryminacyjną metodą krokową. Analiza ta wykazała, dziesięć statystycznie istotnych zmiennych: propan-1-ol, acetal dietylowy acetaldehydu, metanol, prop-2-enal, aceton, butanal, butan-1-ol, propanal, etanolan 3-metylobutyłu oraz pentanal. Ostatecznie zdecydowano się wykorzystać następujące zmienne dyskryminacyjne (zmienne ułożone są w kolejności od najsilniej dyskryminującej):

- propanol,
- acetal dietylowy acetaldehydu,
- etanolan 3-metylobutyłu,
- metanol,
- prop-2-enal,
- aceton.

Następnie określono moc dyskryminacyjną modelu zdefiniowaną jako parametr λ_{Wilksa} . Jest to standardowe podejście wykorzystywane do określenia istotności statystycznej mocy dyskryminacyjnej modelu. Jej wartość liczbowa mieści się w zakresie od 1 (brak mocy dyskryminacyjnej) do 0 (maksymalna moc dyskryminacyjna) [161]. Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że parametr λ_{Wilksa} jest wystarczająco niski (0,00973) by stwierdzić, że model dyskryminacyjny z wyżej wymienionymi zmiennymi będzie dobrze różnicował rozpatrywane przypadki. Dodatkowo, każda ze zmiennych jest istotna jako zmienna dyskryminacyjna gdyż ma wystarczająco niskie wartości cząstkowe λ_{Wilksa} i poziom p dla statystyki F (istotności regresji). W celu zbadania związku pomiędzy wybranymi zmiennymi przeprowadzono analizę kanoniczną. W tabeli 16 przedstawiono współczynniki zmiennych kanonicznych.

Tab. 16. Współczynniki zmiennych kanonicznych

Zmienna	Współczynniki zmiennych		
	1	2	3
propanol (1)	0,10129	-0,022241	-0,037162
acetal dietylowy acetaldehydu (2)	0,05461	0,142462	-0,00023
etanolan 3-metylobutyłu (3)	0,07303	-0,037701	0,060975
metanol (4)	-0,23543	-0,08915	-0,010172
prop-2-enal (5)	0,00413	-0,13397	0,006671
aceton (6)	-0,067	0,092345	-0,142022
stała	-2,66945	1,207445	0,161959

Biorąc pod uwagę współczynniki dla zmiennych kanonicznych można zdefiniować trzy funkcje dyskryminujące o następujących postaciach:

$$D_1 = -2,66945 + 0,10129 \times c_1 + 0,05461 \times c_2 + 0,07303 \times c_3 - 0,23543 \times c_4 + 0,00413 \times c_5 - 0,067 \times c_6$$

$$D_2 = 1,207445 - 0,022241 \times c_1 + 0,142462 \times c_2 - 0,037701 \times c_3 - 0,08915 \times c_4 - 0,13397 \times c_5 + 0,092345 \times c_6$$

$$D_3 = 0,161959 - 0,037162 \times c_1 - 0,00023 \times c_2 + 0,060975 \times c_3 - 0,010172 \times c_4 + 0,006671 \times c_5 - 0,142022 \times c_6$$

gdzie:

c_1 - c_6 – stężenia zmiennych dyskryminujących (tab. 16.)

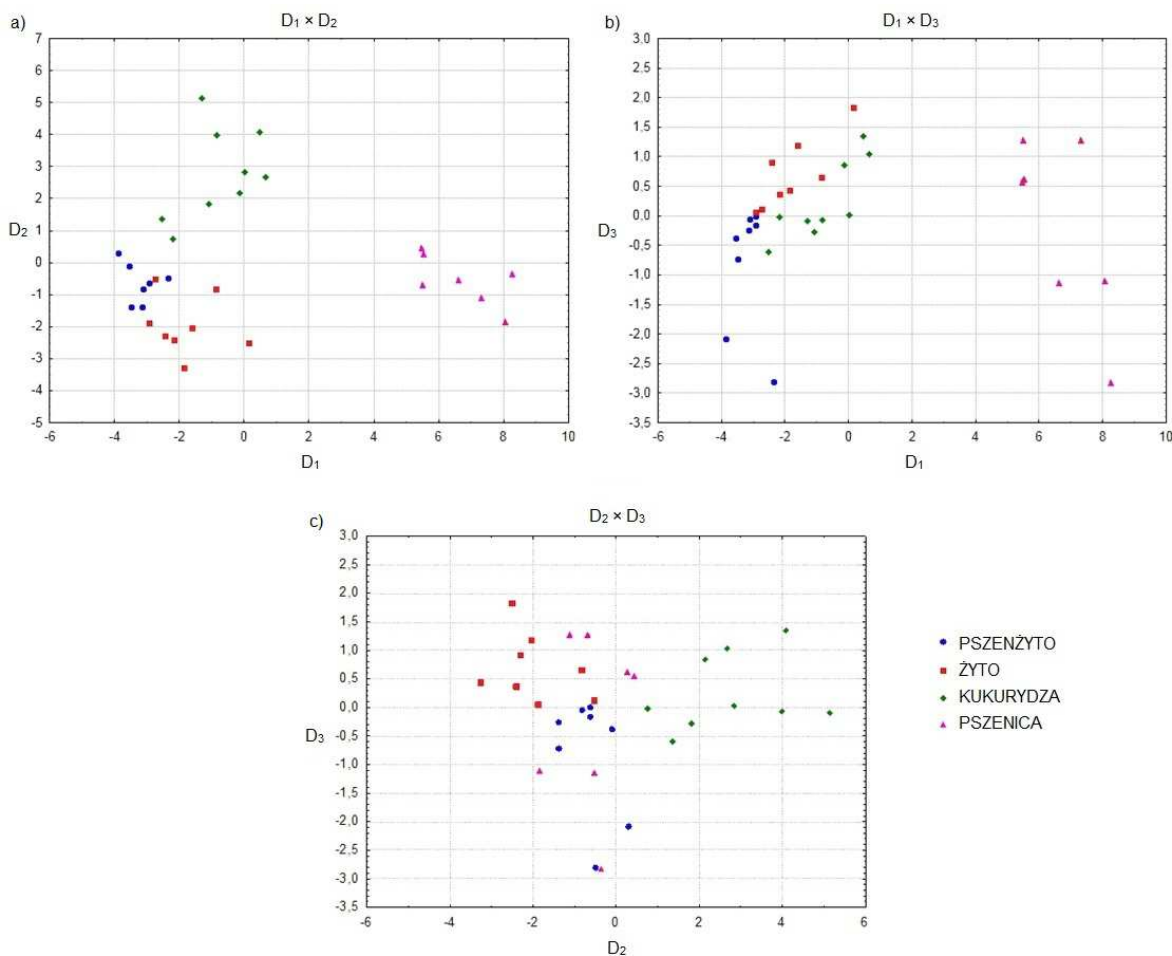
Test Chi-kwadrat (χ^2) kolejnych pierwiastków potwierdza istotność każdej ze zdefiniowanych funkcji kanonicznych, przy czym:

78,7% całej mocy dyskryminacyjnej jest wyjaśniona przez pierwszą funkcję kanoniczną, gdzie przypadki różnicowane są najlepiej przez metanol i propanol;

19,5% całej mocy dyskryminacyjnej jest wyjaśniona przez drugą funkcję kanoniczną, gdzie przypadki różnicowane są głównie przez zmienne: acetal dietylowy akroleiny oraz prop-2-enal;

1,8% całej mocy dyskryminacyjnej jest wyjaśniona przez trzecią funkcję kanoniczną, gdzie przypadki różnicowane są najlepiej przez aceton.

Średnie wartości zmiennych kanonicznych wskazują natomiast, iż pierwsza funkcja najlepiej wyróżnia przypadki z grupy destylatów produkowanych z pszenicy, druga funkcja z grupy kukurydzianych i żytnich, trzecia zaś rozróżnia destylaty produkowane z pszenżyta. Rozrzut poszczególnych przypadków w zależności od funkcji dyskryminacyjnych przedstawiono na rysunku 20.



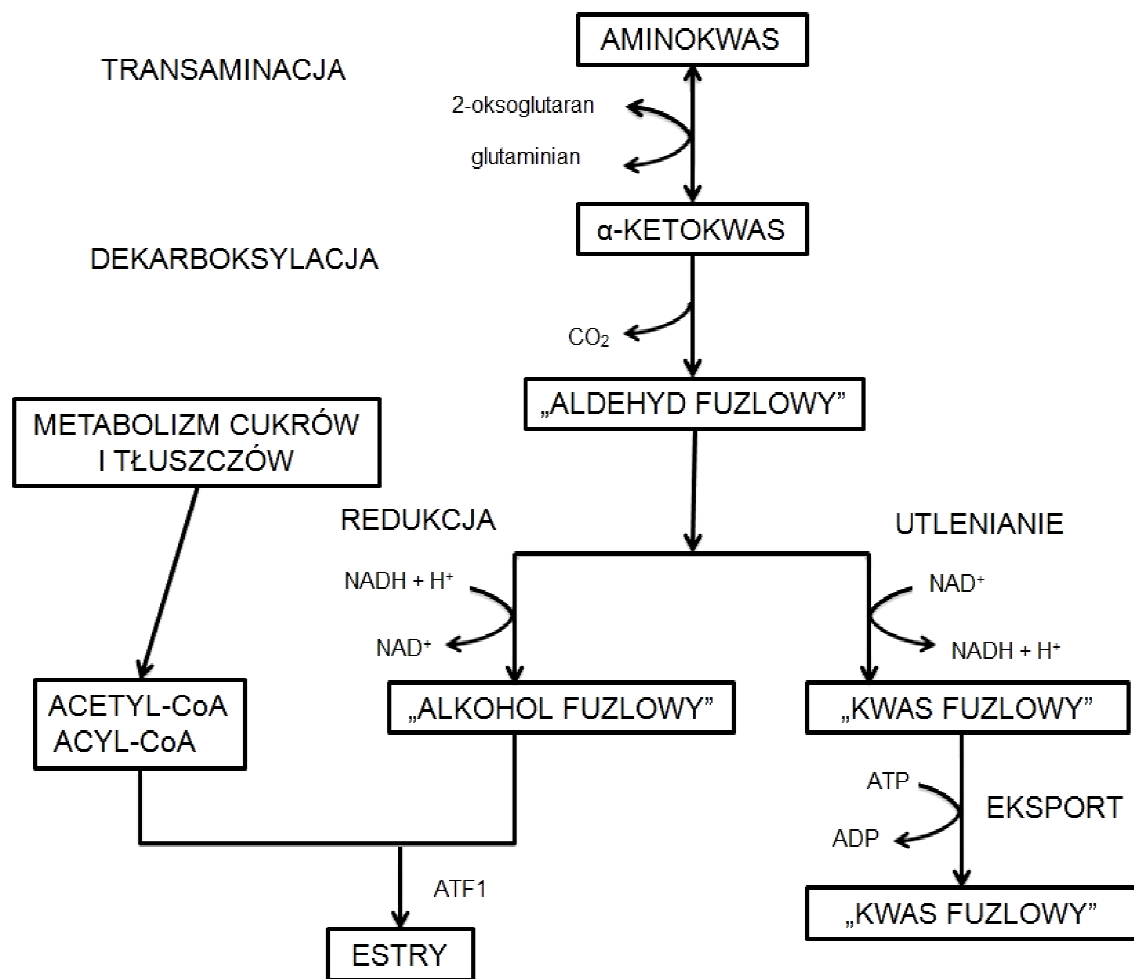
Rys. 20. Graficzny obraz analizy dyskryminacyjnej: a) rzut dwóch pierwszych funkcji na płaszczyznę, b) rzut pierwszej i ostatniej funkcji na płaszczyznę, c) rzut dwóch ostatnich funkcji na płaszczyznę

Przeprowadzone badania wykazały, iż zaproponowana metodyka pozwala na bardzo dobre rozróżnienie destylatów rolniczych wyprodukowanych z pszenicy. Na podstawie funkcji dyskryminacyjnych możliwe jest również stosunkowo dobre rozróżnienie destylatów wyprodukowanych z kukurydzy od destylatów otrzymanych z żyta. Natomiast grupa destylatów z pszenżyta jest najtrudniejsza do odróżnienia. Destylaty wyprodukowane z pszenżyta położone są na mapie analizy dyskryminacyjnej (rys. 20 a) w bliskim sąsiedztwie destylatów wyprodukowanych z żyta. Może być to spowodowane geną powstania pszenżyta, bowiem pszenżyto jest zbożem mieszańcowym (hybrydą), powstałym ze skrzyżowania żyta i pszenicy, zatem o cechach wspólnych obu tych zbóż. Wnioskować można, że destylat wyprodukowany z pszenżyta będzie posiadał cechy obu zbóż, zatem będzie trudny do rozróżnienia. Przeprowadzone badania wykazały, że na podstawie chemometrycznej analizy wyników nie da się jednoznacznie odróżnić destylatów wyprodukowanych z pszenżyta od destylatów wyprodukowanych z żyta. Badania te wskazały jednak na znacznie bliższe

podobieństwo destylatów wyprodukowanych z pszenżyta z destylatami rolniczymi wyprodukowanymi z żyta niż z destylatami wyprodukowanymi z pszenicy. Podobne wnioski zostały wyciągnięte na podstawie oznaczeń estrów etylowych. Destylaty żytnie oraz destylaty wyprodukowane z pszenżyta grupowane były w dolnej części mapy SOM. Z uwagi na niedostateczne rozdzielenie grupy destylatów wyprodukowanych z pszenżyta, kukurydzy i żyta, konieczna jest kontynuacja badań mająca na celu poszukiwanie innych potencjalnych związków markerowych. Wciąż jednak pozostaje „obawa” wykorzystywania w gorzelnictwie rolniczym innych hybryd zbożowych (np. *Tritordeum* będącego skrzyżowaniem jęczmienia *Hordeum chilense* i pszenicy *Durum*, mającego cechy obu gatunków - wydajność pszenicy oraz odporność na stres suszy i ciepła), co dodatkowo utrudni rozróżnianie destylatów zbożowych [162].

Różnice w ilości produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej surowców wynikają w dużej mierze ze składu surowca użytego do produkcji. Skład aminokwasów w zbożach przedstawiono w tabeli 17. Mając na uwadze fakt, iż powstawanie alkoholi fuzlowych zachodzi poprzez aminokwasy, a powstawanie estrów przez alkohol fuzlowy, można więc przypuszczać, iż to właśnie skład tych związków w zbożu będzie warunkował końcowy skład produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej surowców. Na rysunku 21 przedstawiono schemat tworzenia się estrów i alkoholi fuzlowych (wg Ehrlicha). Tak na przykład prekursorem tworzenia 3-metylobutanolu jest leucyna, 2-metylopropanolu – walina, a 2-metylobutanolu – izoleucyna. Tworzenie się tych alkoholi fuzlowych zachodzi przez α -keto kwasy, odpowiednio kwas 4-metylo-2-oksopentanowy, 3-metylo-2-oksobutanowy oraz 3-metylo-2-oksopentanowy [163]. Porównując zawartość poszczególnych aminokwasów w zbożach, spodziewać się można podwyższonej zawartości 3-metylobutanolu (oraz form pokrewnych) w destylatach wyprodukowanych z kukurydzy, a obniżoną zawartość w destylatach wyprodukowanych z jęczmienia bądź żyta. Przeprowadzone badania (GC-FID) nie wykazały jednak, iż związek ten jest jednym ze związków dyskryminujących, natomiast wykazały moc dyskryminującą estru etylowego tego związku (etanolan 3-metylobutyli). Tożsame badania przeprowadzone przez inny zespół wskazują na szereg związków dyskryminujących destylaty wyprodukowane z żyta, kukurydzy i ziemniaków. Są to m.in. metanol, propanol, butanol, furfural, 2-metylopropanol i 3-metylobutanol, octan etylu oraz acetaldehyd [150]. Natomiast przeprowadzone przeze mnie badania wskazują, również na metanol oraz propanol. Dodatkowo jako zmienne dyskryminujące w opracowanym modelu zostały wytypowane również: aceton, prop-2-enal, etanolan 3-metylobutyli oraz acetal dietylowy acetaldehydu. Warto również wspomnieć, że silnie skorelowane ze sobą zmienne,

zostały wykluczone podczas opracowywania modelu statystycznego. Do tych par zmiennych należą propanal ÷ propanol, propanal ÷ 2-metylopropanol, propanol ÷ 2-metylopropanol, propanal ÷ pentanal, pentanal ÷ propanol, propanol ÷ butan-2-ol oraz metanol ÷ furfural. Biorąc pod uwagę również odrzucone zmienne z opracowywanego modelu statystycznego oraz zmienne wybrane przez innych naukowców, można zauważyć, że oba zbiory zmiennych dyskryminujących są bardzo podobne.



Rys. 21. Schemat powstawania estrów i alkoholi fuzlowych (wg Ehrlicha) [36, 163,166]

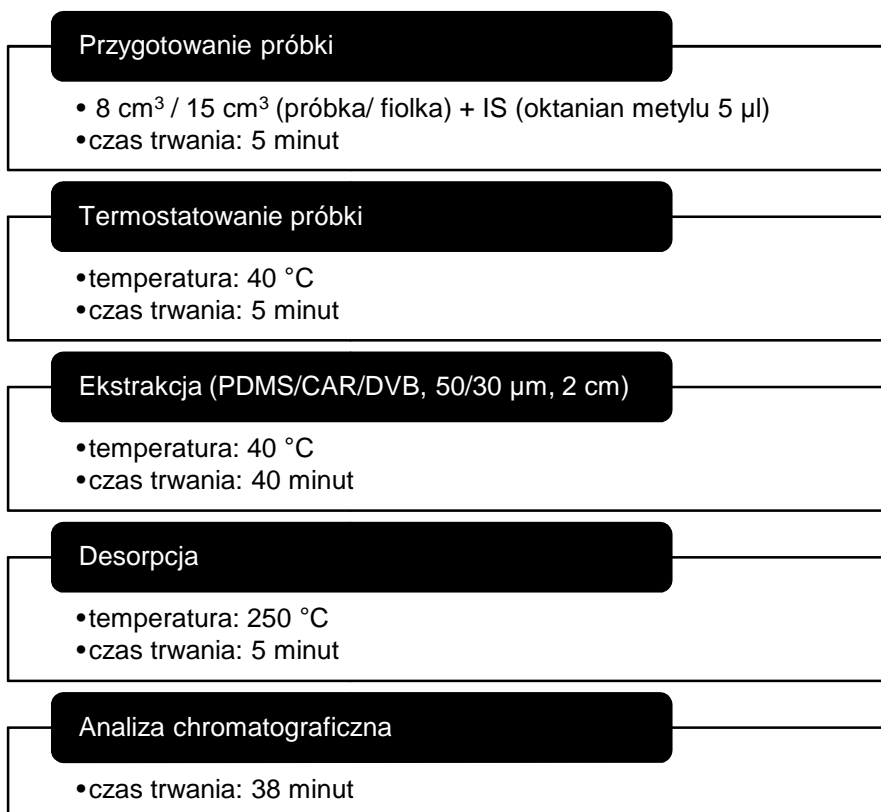
Tab. 17. Skład aminokwasów i białek w zbożach i ziemniakach [164, 165]

Składnik [g/kg ziarna]	Ziarno					ziemniaki
	żyto	pszenżyto	pszenica	kukurydza	jęczmień	
białko ogólne	95	122	119	94	110	b.d.
lizyna	3,7	4,1	3,6	2,6	3,8	5,2
metionina	1,6	1,8	1,9	2	1,8	0,5
cystyna	2,1	2,6	2,7	2,1	2,3	1,0
tryptofan	1	1,2	1,3	0,7	1,2	b.d.
treonina	3,2	3,9	3,6	3,3	3,6	3,0
izoleucyna	3,1	4	3,5	3,3	3,5	3,0
leucyna	5	7,8	8	11,1	0,2	4,9
walina	4,6	5,6	4,9	4,3	5,0	5,0
histydyna	2,4	2,0	3,0	2,5	2,3	1,6
arginina	4,9	5,9	6,2	4,2	5,3	3,3
fenyloalanina	4,3	5,5	5,5	4,3	5,4	3,6
tyrozyna	2,4	2,8	3,1	3,2	2,6	2,8

b.d. – brak danych

6.3 Określenie składu frakcji lotnej destylatów rolniczych z wykorzystaniem techniki HS-SPME/GC-MS

W celu poszukiwania innych potencjalnych związków markerowych określono skład frakcji lotnej wybranych destylatów rolniczych techniką HS-SPME/GC-MS. Zastosowanie mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej pozwoliło na izolację i wzbogacenie analitów frakcji lotnej destylatów rolniczych. Wybrana faza stacjonarna włókna ekstrakcyjnego PDMS/CAR/DVB pozwoliła na izolację szerokiej gamy analitów. Optymalizacja procedury oznaczania związków lotnych w destylatach rolniczych metodą HS-SPME/GC-MS była przedmiotem wcześniejszych prac prowadzonych w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, dlatego też ten etap pominięto [144]. Analizowano 24 próbki wyprodukowane z kukurydzy (7 próbek), żyta (11 próbek), pszenżyta (3 próbki) oraz pszenicy (3 próbki). Schemat procedury przedstawiono na rysunku 22. Ekstrakcji poddawano próbki uprzednio rozcieńczone wodą dejonizowaną do objętościowego stężenia etanolu równego 20 % (stosunek objętościowy próbki do wody 22:78). Do każdej próbki dodawano wzorca wewnętrznego (oktanianu metylu). Podstawowe parametry pracy układu chromatograficznego przedstawiono w tabeli 18.



Rys. 22. Schemat procedury oznaczania związków lotnych metodą HS-SPME/GC-MS

Tab. 18. Podstawowe parametry pracy układu chromatograficznego

Parametr	Wartość
Kolumna	DB-WAX (30 m × 0.25 mm × 0.5 µm)
Gaz nośny	hel
Objęściowe natężenie przepływu gazu nośnego	1,3 cm ³ /min
Temperatura dozownika	250 °C
Program temperaturowy	40 °C (1 min) $\xrightarrow{6\text{ °C/min}}$ 80 °C $\xrightarrow{5\text{ °C/min}}$ 180 °C $\xrightarrow{7\text{ °C/min}}$ 220 (7 min)
Temperatura strefy zewnętrznej	240 °C
Temperatura źródła jonu	220 °C
Temperatura analizatora	200 °C
Tryb pracy analizatora	Skanowanie w zakresie mas 40-400 m/z

W wyniku przeprowadzonych analiz wyodrębniono ponad 100 różnych związków chemicznych wchodzących w skład lotnej frakcji badanych próbek destylatów rolniczych (tab. 19). Zastosowana metoda izolacji i wzbogacania pozwoliła na selektywne (z uwagi na zastosowaną fazę stacjonarną włókna ekstrakcyjnego) określenie profili związków lotnych

w destylatach rolniczych. Zastosowana metoda pozwoliła na oznaczanie i identyfikację szeregu związków, których oznaczenie nie było możliwe w przypadku uprzednio zastosowanej procedury (GC-FID). Zjawisko to można wytłumaczyć faktem, iż mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME) jest techniką jednoczesnej izolacji i wzbogacania analitów.

Związki obecne w lotnej frakcji destylatów identyfikowano przede wszystkim na podstawie porównania widm masowych badanych związków z widmami dostępnymi w bibliotece widm NIST (National Institute of Standards and Technology). Identyfikacja niektórych związków została również potwierdzona na podstawie zgodności czasów retencji i widm masowych substancji wzorcowych (tab. 11 str. 52). Piki chromatograficzne były integrowane manualnie. Z uwagi na zbliżone czasy retencji niektórych związków i złożoność otrzymanych chromatogramów, postanowiono wybrać dla każdego związku charakterystyczny jon fragmentacyjny, dla którego określano pole powierzchni pod pikiem (charakterystyczne jony fragmentacyjne przedstawione są w tabeli 19 w nawiasach). Podejście to umożliwiło wiarygodne oznaczenie zawartości pojedynczych substancji, nawet w sytuacji niecałkowitego rozdzielenia sąsiadujących ze sobą pików. W celu wyeliminowania błędów w identyfikacji związków obliczono również indeksy retencji i porównano je z wartościami literaturowymi (tab. 19). Indeksy retencji Kovatsa obliczono w oparciu o szereg homologiczny alkanów od C₅ do C₂₀ korzystając ze wzoru [167]:

$$IR = 100 \cdot \left(\frac{t_a - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right) \quad (3)$$

gdzie:

IR – indeks retencji

t_a, *t_n*, *t_{n+1}* – czasy retencji odpowiednio: analitu, *n*-alkanu wymywanego z kolumny chromatograficznej bezpośrednio przed analitem oraz *n*-alkanu wymywanego z kolumny chromatograficznej bezpośrednio po analicie

n – liczba atomów węgla *n*-alkanu wymywanego z kolumny chromatograficznej bezpośrednio przed analitem

Tab. 19. Zidentyfikowane związki frakcji lotnej destylatów rolniczych

Lp.	Nazwa związku	IR _{obl.}	IR _{lit.} [168-195]
1	etoksyeten (44)	676	679
2	acetaldehyd (45)	717	706; 713; 721
3	mrówczan etylu (45)	720	728
4	1-etoksy-1-buten (57)	836	870
5	2-metylofuran (82)	891	876; 877; 893; 895
6	octan etylu (43)	895	893; 898; 902; 906; 908
7	1,1-dietoksyetan (73)	905	906
8	3-metylofuran (82)	911	915; 832
9	2-metylobutanal (47)	931	862; 914; 935; 936
10	3-metylobutanal (58)	933	912; 917; 935
11	2,5-dimetylofuran (96)	961	952; 974; 976
12	propionian etylu (57)	965	950; 957; 978
13	1,1-dietoksy-2-metylopropan (103)	973	969; 991
14	3-metylobutan-2-ol (103)	996	1094
15	2,3-dihydroksypropanal (61)	997	b.d.
16	octan n-propylu (61)	998	969; 976
17	octan 2-metylpropylu (56)	1028	1005; 1007
18	butan-2-ol (59)	1040	1020; 1022; 1026; 1035
19	α -pinen (93)	1041	1030; 1035
20	2-acetylofuran (95)	1042	b.d.
21	2-etylo-5-metylofuran (95)	1043	1028; 1052
22	butanian etylu (71)	1047	1036; 1037; 1047; 1057
23	toluen (91)	1051	1040; 1062; 1071
24	propan-1-ol (59)	1052	1035; 1038; 1045; 1052
25	1,1-dietoksy-2-metylo butan (103)	1058	1063; 1083
26	1,1-dietoksy pentan (103)	1059	b.d.
27	1,1-dietoksy-3-metylo butan (103)	1059	1068; 1086
28	disulfid dimetylu (94)	1080	1075; 1078; 1094
29	heksanal (56)	1085	1110; 1104
30	2-metylopropan-1-ol (43)	1096	1097; 1124
31	1-(1-etoksyetoksy)-pentan (73)	1106	b.d.

b.d. – brak danych

Tab. 19. Ciąg dalszy

Lp.	Nazwa związku	IR _{obl.}	IR _{lit.} [168-195]
32	β-pinen (93)	1107	1118; 1176
33	octan 3-metylobutyli (70)	1124	1140
34	p-ksylen (91)	1130	1127; 1149; 1162
35	etylobenzen (91)	1131	1124; 1125; 1149
36	2-butylofuran (81)	1132	1056; 1140; 1151
37	m-ksylen (91)	1140	1132; 1150; 1168
38	o-ksylen (91)	1143	1182; 1216
39	3-karen (93)	1144	1127; 1144; 1157
40	7-metylo-3-metyleno-1,6-oktadien (93)	1198	b.d.
41	heptanal (70)	1205	1186; 1197; 1208
42	limonen (68)	1206	1194; 1208; 1212; 1216; 1218
43	2-metylobutanol + 3-metylobutanol (58)	1216	1212; 1215; 1218; 1219
44	2-etylofenol (107)	1226	b.d.
45	2-pentylofuran (81)	1237	1240; 1252
46	heksanian etyli (88)	1239	1238; 1252
47	styren (104)	1246	1261; 1273; 1287
48	2-metylopropanian 3-metlobutyli (71)	1258	1187
49	octan heksyli (56)	1277	1268
50	4-karen (121)	1290	1128
51	1,1,3-trietoksypropan (59)	1292	b.d.
52	adamantan-1-ol (95)	1305	b.d.
53	butanian 1,5-dimetylo-1-winylo-4-heksenu (71)	1326	b.d.
54	heksanian propyli (99)	1326	1324
55	tetradek-2-en (57)	1331	b.d.
56	1,1-dietoksyheptan (103)	1335	b.d.
57	2,5-dimetylopirazyne + 2,6-dimetylopirazyne (108)	1338	1318; 1325; 1361
58	heptanian etyli (88)	1343	1331; 1353
59	1,2,4-trimetylobenzen (105)	1352	1316
60	heksanian 2-metylopropyli (99)	1364	1369
61	heksanol (56)	1369	1369; 1354
62	2-furanokarboksylianian etyli (95)	1379	b.d.

b.d. – brak danych

Tab. 19. Ciąg dalszy

Lp.	Nazwa związku	IR _{obl.}	IR _{lit.} [168-195]
63	octan heptylu (70)	1390	1406; 1415
64	cykloheksakarboksylan 3,5-difluorofenyłu (111)	1396	1433
65	2-pentylotiofen (97)	1398	1438; 1452; 1486; 1509
66	butanian heksylu (71)	1426	1438; 1462; 1497
67	pentylbenzen (91)	1446	b.d.
68	oktanian etylu (88)	1493	1438; 1462; 1497
69	heksanian 3-metylobutylu (70)	1497	1477
70	furfural (96)	1501	1432; 1485; 1499; 1500
71	octan oktylu (56)	1507	1478; 1496
72	1-cyklopentylononan (69)	1523	b.d.
73	oktanian propylu (145)	1531	1530
74	benzaldehyd(105)	1539	1525; 1528; 1562
75	nonanian etylu (88)	1555	1528; 1556
76	undekan-2-on (58)	1561	1606
77	2-(1,2-dietoksyetylo)furan (125)	1562	1562
78	oktanian 2-metylopropylu (57)	1565	1569
79	okt-2-enian etylu (55)	1568	1579
80	oktan-1-ol (55)	1571	1539; 1561; 1575
81	4-(but-2-enylo)-1,2-dimetylobenzen (145)	1582	b.d.
82	octan nonylu (43)	1584	1585; 1598
83	2,2'-bifuran (134)	1561	1635
84	β-kariofyllen (93)	1604	1608; 1618; 1625
85	1-(but-2-enylo)-2,3-dimetylobenzen (145)	1605	b.d.
86	dekanian etylu (88)	1632	1630; 1636; 1647; 1680
87	oktanian 3-metylobutylu (70)	1647	1688
88	α-kariofyllen (93)	1665	1625; 1680
89	dekanian propylu (61)	1699	1743; 1948
90	undekanian etylu (88)	1715	1760
91	α-farnezen (93)	1722	1697; 1769
92	2-tridekanon (58)	1781	1835
93	octan 2-fenylotylu (104)	1792	1803, 1851

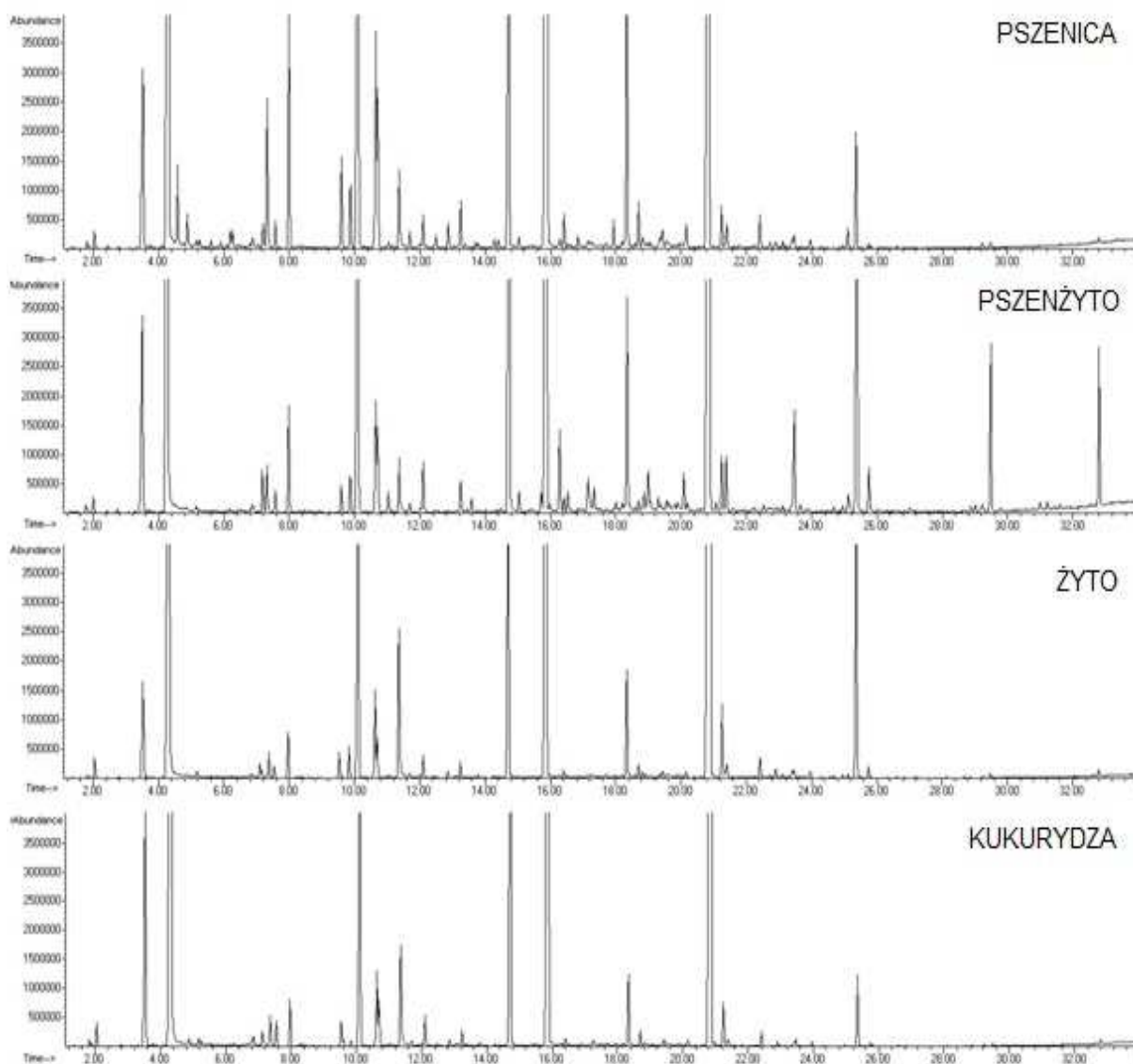
b.d. – brak danych

Tab. 19. Ciąg dalszy

Lp.	Nazwa związku	IR _{obl.}	IR _{lit.} [168-195]
94	dodekarian 1-metyloetylu (60)	1799	1849
95	dodekarian etylu (88)	1810	1822; 1882
96	3-fenylofuran (144)	1827	b.d.
97	pentadekarian 3-metylbutylu (70)	1827	b.d.
98	tridekarian etylu (88)	1903	1966
99	2-pentadekanon (58)	1995	>2000
100	tetradekarian 1-metyloetylu (102)	>2000	>2000
101	tetradekarian etylu (88)	>2000	>2000; 2029
102	heksadekarian etylu (88)	>2000	>2000; 2229

b.d. – brak danych

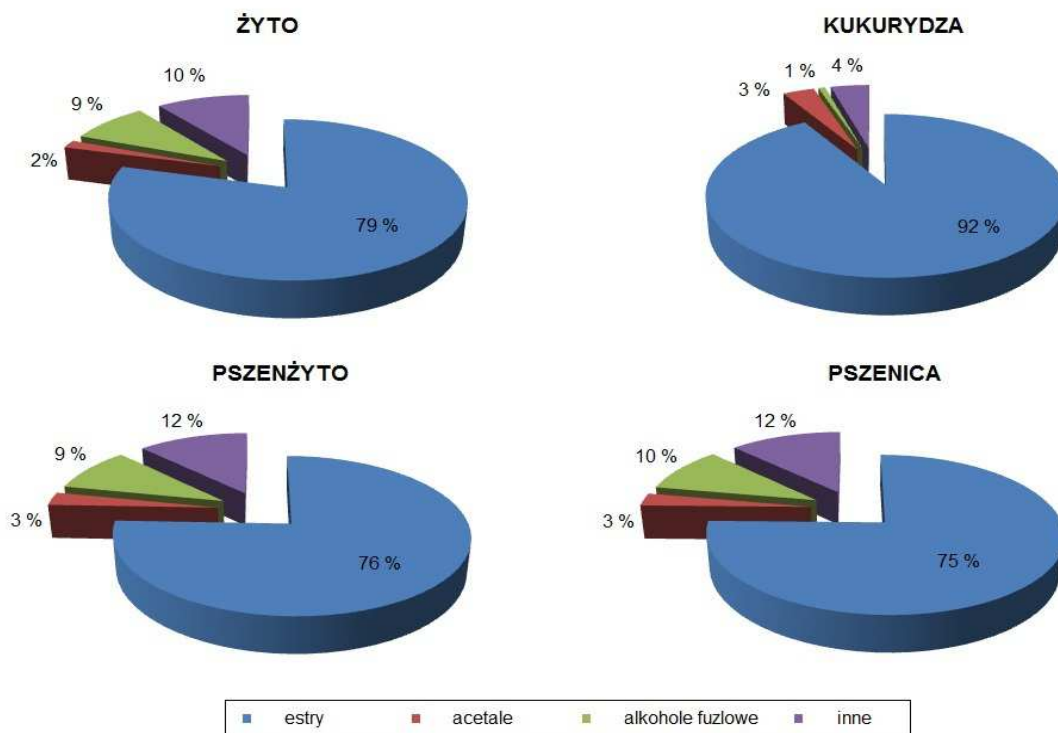
Przykładowe chromatogramy otrzymane dla próbek destylatów rolniczych wyprodukowanych z pszenicy, żyta, pszenżyta i kukurydzy przedstawiono na rysunku 23. Już na pierwszy rzut oka widoczne są pewne różnice w profilu wyekstrahowanych związków w każdym z destylatów. Frakcja lotna destylatów rolniczych wyprodukowanych z pszenicy wydaje się mieć najbardziej zróżnicowany charakter, podczas gdy destylaty wyprodukowane z kukurydzy charakteryzują się najbardziej ubogim profilem ubocznych związków procesu fermentacji alkoholowej. Warto również zauważyć, że chromatogram destylatu otrzymanego z pszenżyta daje na pierwszy rzut oka obraz mający cechy destylatów wyprodukowanych z pszenicy i żyta. Wydawać by się mogło, że destylaty wyprodukowane z pszenżyta mają więcej cech wspólnych z destylatami wyprodukowanymi z pszenicy. Warto przypomnieć, że analiza składu estrów etylowych i głównych produktów fermentacji alkoholowej (GC-FID) wykazała bliższe podobieństwo do destylatów wyprodukowanych z żyta. Niemniej jednak w tych rozważaniach brane były pod uwagę tylko niektóre związki.



Rys. 23. Przykładowe chromatogramy lotnej frakcji destylatów rolniczych wyprodukowanych z pszenicy, pszenżyta, żyta i kukurydzy

Procentowy udział estrów, alkoholi fuzlowych, acetalu oraz związków nie będących typowymi produktami ubocznymi procesu fermentacji alkoholowej (grupa „inne”) przedstawiono na rysunku 24. Z uwagi na niskie poziomy stężenie związków karbonylowych występujących w destylatach rolniczych, przedstawiono je w grupie „inne”. Wyodrębnienie tej grupy związków na wykresie sprawiłoby, że wykres byłby nieczytelny. Bardziej szczegółowa analiza chromatogramów pozwoliła wskazać, że spośród wszystkich zidentyfikowanych związków najliczniejszą grupę stanowiły estry, w tym głównie wcześniej oznaczanie estry etylowe kwasów tłuszczowych. Fakt ten można wyjaśnić selektywnością fazy stacjonarnej włókna ekstrakcyjnego, bowiem włókno mieszane typu PDMS/CAR/DVB z bardzo dobrą wydajnością ekstrahuje estry. Wysoką wydajność wspomnianej fazy

stacjonarnej w kierunku ekstrakcji estrów potwierdzają badania prowadzone przez innych naukowców. Przykładowo analiza frakcji lotnej białych win „Jutrzenka” prowadzona z wykorzystaniem włókien SPME pokrytych różnymi fazami stacjonarnymi wykazała, dla włókna PDMS/CAR/DVB, najwyższą (spośród wszystkich testowanych włókien) wydajność ekstrakcji estrów [204]. Z przeprowadzonych badań wynika, że najczęściej estrów, zarówno pod względem różnorodności jak i poziomów na jakich występują, zawierają destylaty rolnicze wyprodukowane z kukurydzy. W pozostałych grupach destylatów estry występują na porównywalnym poziomie. Jednocześnie można zauważyć, że lotna frakcja destylatów kukurydzianych jest uboga w alkohole wyższe. Spowodowane może to być geną powstawania estrów (rys. 21 str. 77). Odwrotna sytuacja obserwowana jest w przypadku destylatów wyprodukowanych z żyta, pszenicy i pszenżyta. Procentowa zawartość wyekstrahowanych alkoholi fuzlowych wynosi aż 10 %. W mniejszych ilościach zaobserwowano także obecność związków z grupy acetales, których zawartość we wszystkich destylatach jest zbliżona. Oprócz wymienionych grup związków wyodrębniono również pochodne benzenu oraz furany. Związki te powstawać mogą podczas pirolizy węglowodanów, dehydratacji cukrów na skutek reakcji Maillarda oraz procesu karmelizacji [196].



Rys. 24. Procentowa zawartość grup związków wyizolowanych z destylatów rolniczych techniką HS-SPME/GC-MS

Ponieważ celem badań była analiza całej frakcji lotnej destylatów rolniczych w celu określenia potencjalnych związków markerowych, nie podejmowano próby określenia rzeczywistych stężeń wszystkich zidentyfikowanych związków. W celu określenia różnic w ilości poszczególnych związków posługiwano się wartościami średnimi pól powierzchni z trzech pomiarów dla każdego ze zidentyfikowanych w destylacie związków. Na podstawie opracowanych wyników można wskazać kilka różnic w składzie frakcji lotnej poszczególnych grup destylatów. Patrząc na tabelę wyników dla poszczególnych próbek bardzo łatwo można wskazać kilka związków, które występują bądź nie występują (lub znajdują się poniżej granicy wykrywalności procedury) we wszystkich próbkach tylko jednej odmiany destylatów (tab. 20). Związki te mogą stanowić potencjalne związki markerowe, chociaż dopiero analiza większej ilości próbek mogłaby potwierdzić postawioną hipotezę.

Tab. 20. Związki będące potencjalnymi wyróżnikami pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych

Nazwa związku	Pochodzenie botaniczne			
	kukurydza	żyto	pszenżyto	pszenica
1,1,3-trietoksypropan	-	-	-	+
2,5- dimetylofuran	-	+	-	-
2-butylofuran	+	+	-	+
2-pentylofuran	-	+	+	+
butan-2-ol	-	-	-	+
dekanian propylu	+	+	-	+
furfural	+	+	+	-
octan 2-metylopropylu	-	-	-	+
octan heksylu	-	-	-	+
octan propylu	-	-	-	+
oktanian propylu	+	+	-	+
propionian etylu	-	-	-	+

Z uwagi na fakt, iż tabela opracowanych wyników jest bardzo skomplikowana, a zależności pomiędzy poszczególnymi próbkami są trudne do obserwacji, zdecydowano się ponownie wykorzystać chemometryczne metody opracowania wyników. Do tego celu wykorzystano analizę dyskryminacyjną z zastosowaniem pakietu Statistica 10. Ponieważ niektóre ze zidentyfikowanych związków występują tylko w kilku próbkach, postanowiono odrzucić wszystkie te zmienne (związki), w których brakowało wiele obserwacji. Następnie określono

korelację występującą pomiędzy zmiennymi (korelacja Pearsona) i odrzucono silnie skorelowane zmienne, czyli zmienne przenoszące tą samą informację. Następnie potwierdzono normalność rozkładu zmiennych w modelu testem Shapiro-Wilk'a. i przeprowadzono analizę dyskryminacyjną metodą krokową. Do modelu statystycznego wybrano pięć zmiennych:

- 2-metylobutanol + 3-metylobutanol,
- heksanian 3-metylobutyłu,
- dodekarian etylu,
- heptanian etylu,
- oktanian 3-metylobutyłu.

Wartość lambda Wilksa (λ_{Wilksa}) jest wystarczająco niska aby stwierdzić, że wybrane zmienne powinny dobrze różnicować przypadki. Ponadto wystarczająco niskie wartości cząstkowe λ_{Wilksa} i poziom prawdopodobieństwa p dla statystyki F (istotności regresji) wskazują, że każda ze zmiennych jest istotna jako zmienna dyskryminacyjna. W celu zbadania związku pomiędzy wybranymi zmiennymi przeprowadzono analizę kanoniczną, której wyniki przedstawiono w tabeli 21.

Tab. 21. Współczynniki zmiennych kanonicznych

Nazwa związku	Współczynniki zmiennych kanonicznych		
	1	2	3
2-metylobutanol + 3-metylobutanol	-2,58154	-0,19454	-0,471565
heksanian 3-metylobutyłu	0,77962	-1,44144	0,314317
dodekarian etylu	-1,02665	0,42182	0,770510
heptanian etylu	1,40409	0,66842	0,849513
oktanian 3-metylobutyłu	0,81859	0,81946	-0,134980
Stała	6,06247	1,92116	0,135035

Na podstawie współczynników zmiennych kanonicznych można zdefiniować trzy funkcje o postaciach:

$$D_1 = -2,58154 \times p_1 + 0,77962 \times p_2 - 1,02665 \times p_3 - 1,40409 \times p_4 + 0,81859 \times p_5 + 6,06247$$

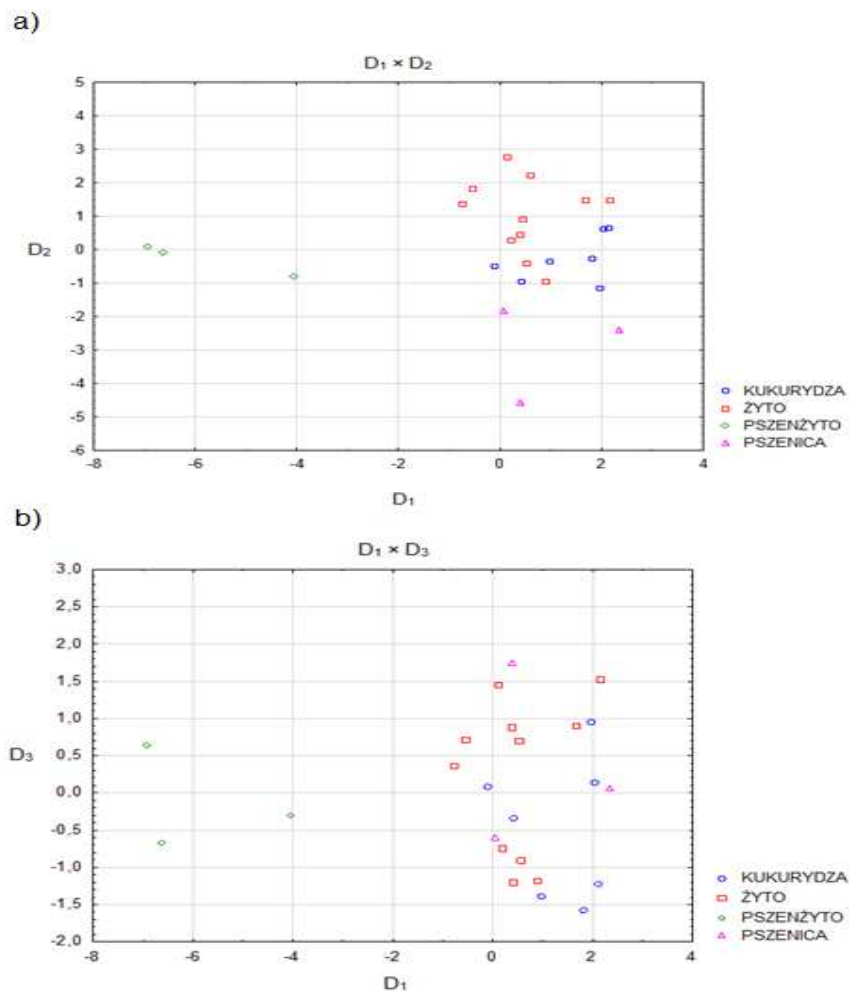
$$D_2 = -0,19454 \times p_1 - 1,44144 \times p_2 + 0,42182 \times p_3 + 0,66842 \times p_4 + 0,81946 \times p_5 + 1,92116$$

$$D_3 = -0,471565 \times p_1 + 0,314317 \times p_2 + 0,770510 \times p_3 + 0,849513 \times p_4 - 0,134980 \times p_5 - 0,135035$$

gdzie:

p_{1-6} – pole powierzchni związku będącego zmienną (tab. 21)

Graficzne zobrazowanie próbek różnego pochodzenia botanicznego przedstawiono na rysunku 25.



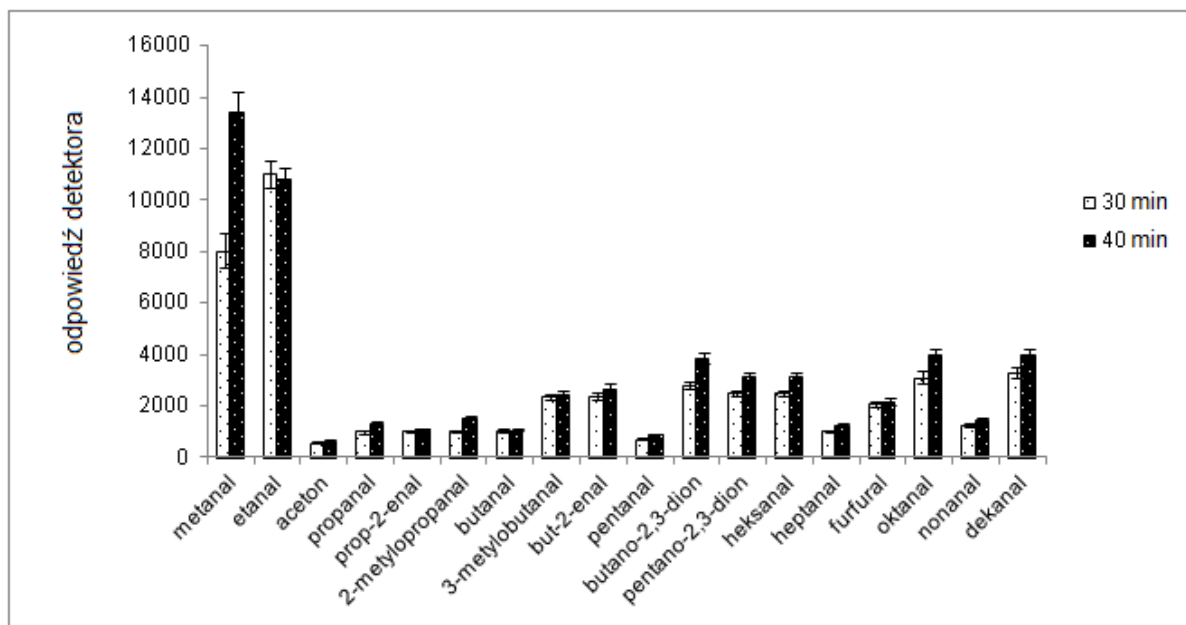
Rys. 25. Graficzny obraz analizy dyskryminacyjnej: a) rzut dwóch pierwszych funkcji na płaszczyznę, b) rzut pierwszej i trzeciej funkcji na płaszczyznę

Test Chi-kwadrat (χ^2) kolejnych pierwiastków potwierdza istotność każdej ze zdefiniowanych funkcji kanonicznych. Otrzymane funkcje dyskryminacyjne pozwalają na rozdzielenie, od innych grup, destylatów wyprodukowanych z pszenżyta oraz stosunkowo dobre rozdzielenie destylatów wyprodukowanych z pszenicy. Destylatów z pszenżyta nie udało się rozdzielić przy zastosowaniu dwóch wcześniejszych procedur, natomiast stosując metodę HS-SPME/GC-MS było to możliwe. Destylaty z pszenżyta są najlepiej rozdzielone w przypadku zastosowania pierwszych dwóch funkcji dyskryminacyjnych. Zmienne dyskryminacyjne należą głównie do grupy estrów. Tak selektywna ekstrakcja tej grupy związków jest wynikiem zastosowania selektywnej metody izolacji i wzbogacania analitów z próbek. Grupy próbek destylatów z pszenicy i pszenżyta liczą niewiele przypadków. Z uwagi na tak małą ilość obserwacji nie można było uwzględnić więcej zmiennych dyskryminacyjnych w modelu.

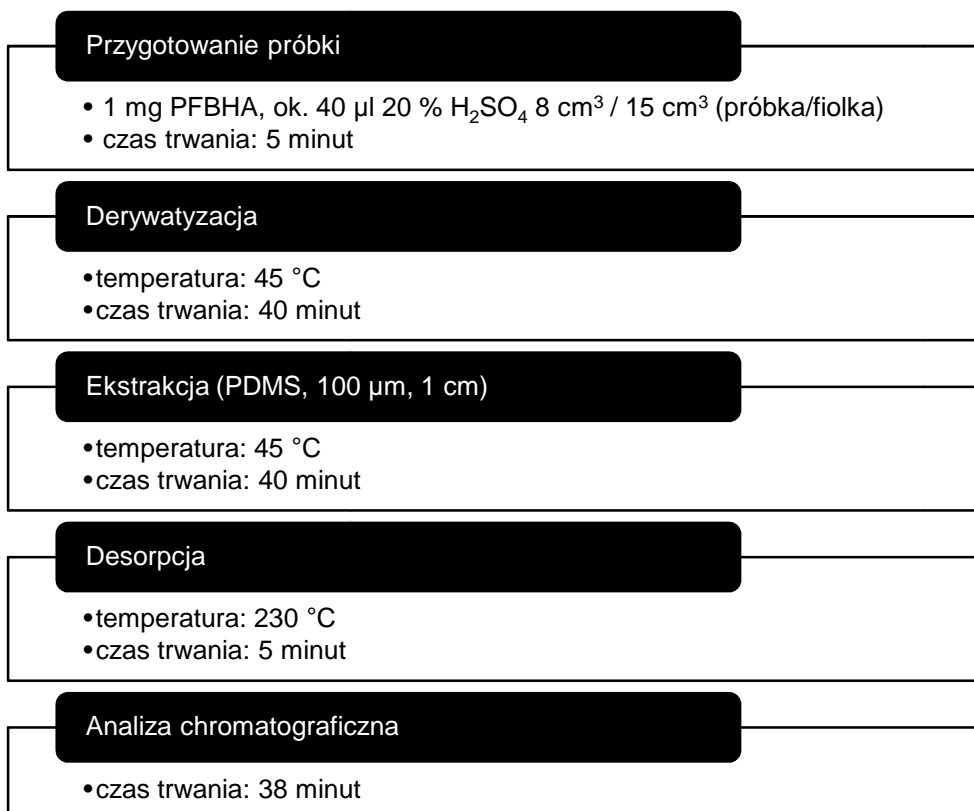
Podsumowując, zaproponowane w niniejszej pracy podejście wykorzystujące aż trzy różne techniki analityczne pozwala na bardzo dobre rozdzielenie destylatów rolniczych wyprodukowanych z różnych surowców zbożowych. Połączenie analizy instrumentalnej z chemometryczną obróbką wyników jest potencjalnym rozwiązaniem przemysłowym. Na uwagę zasługuje uniwersalność przedstawionego podejścia do problemu analitycznego. W przedstawionym przypadku zmienną grupującą było pochodzenie botaniczne, jednakże wykorzystane metody (głównie GC-FID oraz HS-SPME/GC-MS) mogą też być użyteczne do rozróżniania jakości destylatów rolniczych. W połączeniu z klasyczną analizą sensoryczną podejście to może dostarczyć wielu cennych informacji, zważywszy na fakt, iż procedura wykorzystująca układ GC-FID wykorzystywana jest praktycznie w każdym krajowym laboratorium.

7 OZNACZANIE ZWIĄZKÓW KARBONYLOWYCH W WÓDKACH CZYSTYCH

Kolejnym celem badawczym, ważnym z punktu widzenia konsumenta i producenta napojów alkoholowych, było opracowanie przemysłowej metody pozwalającej na monitorowanie stężeń związków karbonylowych w produktach spirytusowych oraz próba określenia zależności pomiędzy ilością związków karbonylowych, a jakością sensoryczną wódek czystych. Proponowana przez autorkę rozprawy metoda jest modyfikacją wcześniej opracowanej metodyki w Katedrze Chemii Analitycznej, Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej [197, 198]. W opracowanej metodzie zdecydowano się zwiększyć ilość oznaczanych związków (9 dodatkowych) mogących wpływać na właściwości sensoryczne produktów spirytusowych. Ponadto zmodyfikowany został program temperaturowy chromatograficznego rozdzielania związków, tak aby żaden z oznaczanych związków nie eluował przy naroście 30 °C/min. Ponadto wprowadzono mieszanie próbki podczas derywatyzacji, co pozwoliło na skrócenie jej czasu z 90 do 40 minut. Wydłużony został również czas ekstrakcji do 40 minut (rys. 26) oraz zwiększona objętość próbki z 6 cm³ do 8 cm³. Zdecydowano się wydłużyć czas ekstrakcji ze względu na lepszą wydajność ekstrakcji wyższych aldehydów przy zastosowaniu dłuższego okresu ekstrakcji. Dalsze wydłużanie procesu ekstrakcji oraz zmiana temperatury ekstrakcji nie były zastosowane z uwagi na obawę utraty wydajności ekstrakcji niższych aldehydów ze względu na występowanie zjawiska sorpcji/desorpcji wynikającego konkurencji do miejsc aktywnych włókna ekstrakcyjnego. Parametry takie jak stężenie etanolu w próbce, pH roztworu oraz ilość odczynnika derywatyzującego (ok. 100-krotny nadmiar) pozostały bez zmian. Ponadto wykorzystano cechującą się dobrą selektywnością i powtarzalnością fazę stacjonarną włókna ekstrakcyjnego (PDMS), choć doniesienia literaturowe wskazują również na możliwość wykorzystania do tego celu włókien typu PDMS/DVB (65 μm) oraz PEG (60 μm) [199]. Schemat procedury przedstawiono na rysunku 27, a podstawowe parametry pracy układu chromatograficznego w tabeli 22.



Rys. 26. Wydajność prowadzenia procesu ekstrakcji w zależności od czasu ekstrakcji



Rys. 27. Schemat procedury oznaczania związków karbonylowych w wódkach czystych techniką HS-SPME/GC-ECD

Tab. 22. Podstawowe parametry procedury HS-SPME/GC-ECD

Parametr	Wartość
Kolumna	DB-1301 (30m × 0.25µm × 0.32 mm)
Program temperaturowy	60 $\xrightarrow{5^\circ \text{C/min}}$ 220 °C (3 min)
Temperatura dozownika	230 °C
Gaz nośny	hel
Gaz pomocniczy	azot
Objętościowe natężenie gazu nośnego	1,3 cm ³ /min
Objętościowe natężenie gazu pomocniczego	30 cm ³ /min
Temperatura detektora	280 °C

Do oznaczania zawartości aldehydów wykorzystano metodę kalibracji zewnętrznej (obliczenia wykonano wg procedury opisanej w punkcie 6.2 str. 69). Krzywe kalibracyjne zostały wyznaczone na podstawie oznaczeń badanych związków dla pięciu stężeń w zakresie 0,1 – 25 ppb. Opracowana metoda charakteryzuje się stosunkowo dobrą precyzją (współczynniki zmienności w granicach od 3,4 % do 8,6 %) oraz zadowalającą liniowością (współczynniki regresji $R > 0,995$). Z uwagi na fakt, iż matryca w jakiej sporządzano roztwory wzorcowe zawierała już nieznaczące ilości aldehydów, przy sporządzaniu krzywych wzorcowych odejmowano ich zawartość od wyniku.

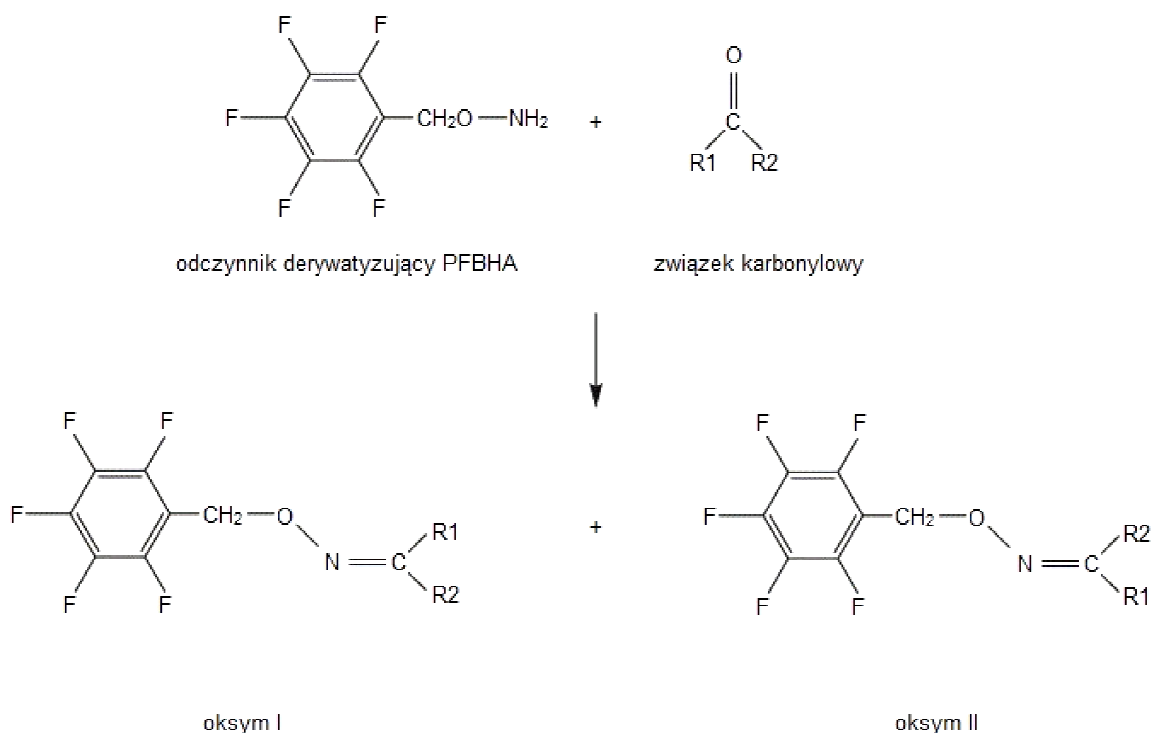
Tab. 23. Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) związków karbonylowych z wykorzystaniem procedury HS-SPME/GC-ECD

Nazwa związku	LOD [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	LOQ [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]
metanal	0,17	0,51
etanal	0,81	2,4
aceton	0,73	2,2
propanal	0,0058	0,017
prop-2-enal	0,13	0,38
2-metylopropanal	0,045	0,14
butanal	0,036	0,11
3-metylobutanal	0,004	0,012
2-butenal	0,36	1,1
pentanal	0,03	0,09
butano-2,3-dion	0,25	0,76

Tab. 23. Ciąg dalszy

Nazwa związku	LOD [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	LOQ [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]
pentano-2,3-dion	0,15	0,44
heksanal	0,047	0,14
heptanal	0,28	0,84
<i>trans</i> -hep-2-enal	0,0059	0,017
furfural	0,13	0,39
oktanal	0,019	0,06
nonanal	0,24	0,72
<i>trans</i> -non-2-enal	0,015	0,045
dekanal	0,13	0,38

W wyniku derywatywacji aldehydów tworzą się oksymy różniące się konfiguracją wiązania C=N (za wyjątkiem metanal i acetonu) (rys. 28). Izomery te pojawiają się na chromatogramach w formie dwóch pików, dlatego też przy oznaczaniu pól powierzchni określonych aldehydów sumowano pola powierzchni obu oksymów.



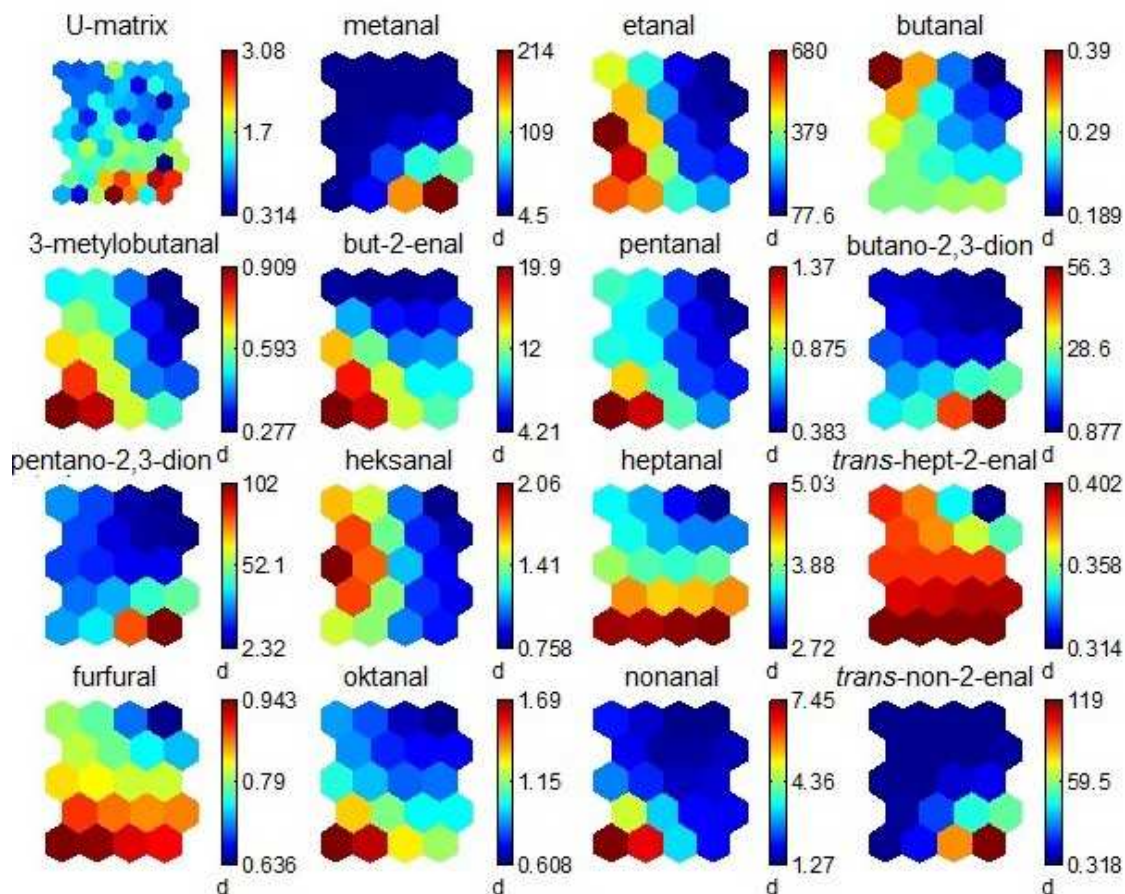
Rys. 28. Schemat derywatywacji związków karbonylowych za pomocą O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroksyloaminy (PFBHA)

Do badań wybrano jednaście wódek czystych, które poddano uprzedniej analizie sensorycznej (sekcja 1.2 str. 51). Wyniki oznaczonych aldehydów dla poszczególnych wódek zostały przedstawione w tabeli 24. Symbole wódek są zgodne z symbolami przedstawionymi na rysunku 12 (str. 51). W celu określenia związku pomiędzy jakością analizowanych wódek czystych, a ilością związków karbonylowych w nich zawartych, przeprowadzono analizę chemometryczną otrzymanych wyników metodą samoorganizującego odwzorowania cech (SOM). Na rysunku 29 przedstawiono wizualizację zależności/podobieństwa pomiędzy zmiennymi (związki karbonylowe) oznaczanymi w wódkach. Obserwując rysunek 29 z łatwością można dostrzec 4 modele podobieństwa map dla poszczególnych związków charakteryzowane przez podobne stężenia tych związków w próbkach:

- 3-metylobutanal, pentanal, etanal, nonanal
- but-2-enal, furfural, oktanal, heptanal, *trans*-hept-2-enal
- *trans*-non-2-enal, metanal, butano-2,3-dion, pentano-2,3-dion
- heksanal, butanal.

Tab. 24. Zawartość związków karbonylowych w próbkach komercyjnie dostępnych wódek czystych (<LOD – poniżej granicy wykrywalności, <LOQ – poniżej granicy oznaczalności)

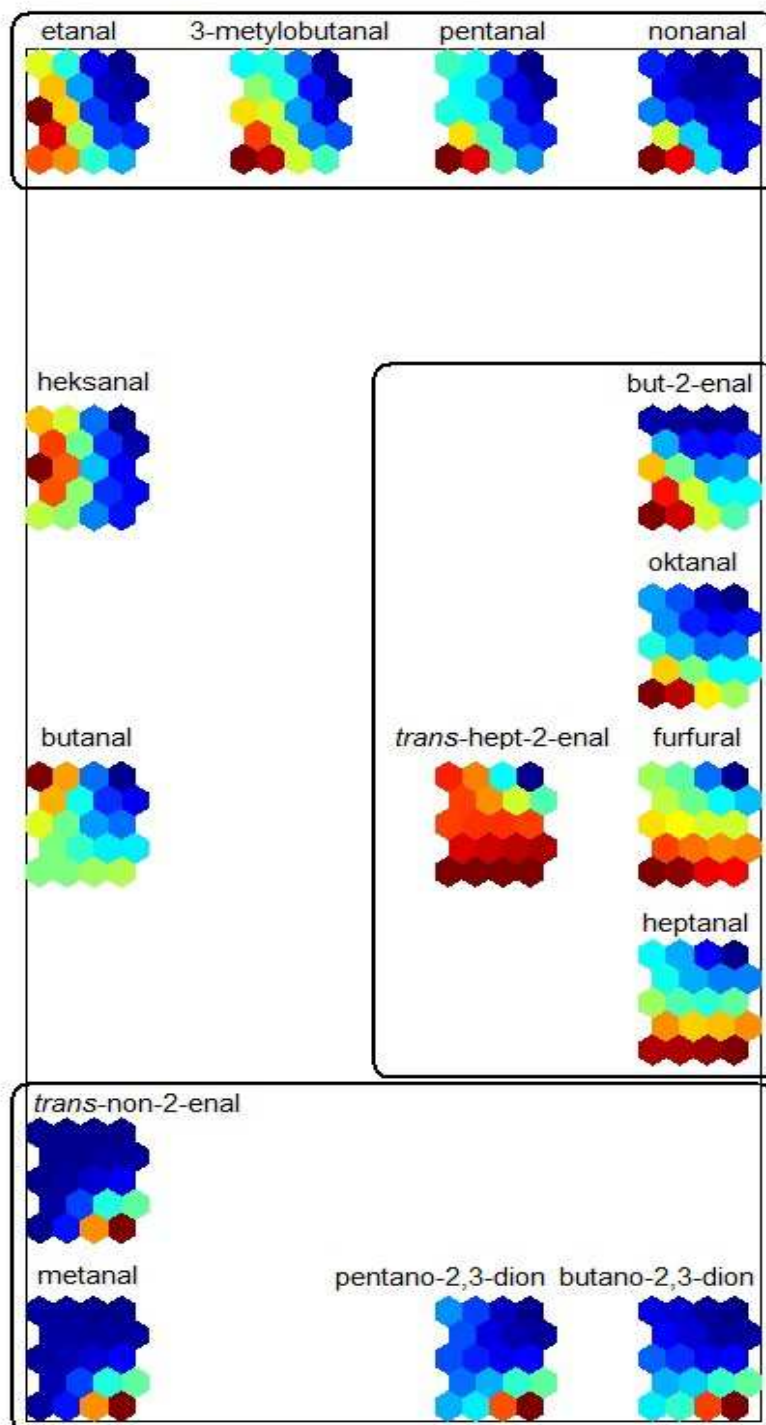
Nazwa związku	Wzorec	Symbol próbki										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
		Stężenie [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$] [średnia \pm U (k=2)]										
metanal	4,48 \pm 0,16	4,80 \pm 0,14	6,43 \pm 0,38	4,25 \pm 0,34	5,90 \pm 0,47	6,03 \pm 0,15	4,27 \pm 0,11	6,20 \pm 0,42	5,28 \pm 0,26	9,52 \pm 0,32	8,83 \pm 0,53	322 \pm 13
etanal	86,7 \pm 3,0	170,3 \pm 5,3	134,2 \pm 4,9	28,1 \pm 1,9	107,8 \pm 2,7	1109 \pm 63	411 \pm 25	570 \pm 19	91,3 \pm 2,5	598 \pm 12	631 \pm 24	330 \pm 16
aceton	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	4,29 \pm 0,12	7,35 \pm 0,21	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
propanal [10^{-2}]	27,12 \pm 0,81	86,4 \pm 3,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	45,77 \pm 0,96	<LOQ	88,5 \pm 3,6	39,4 \pm 2,0	37,94 \pm 0,76
prop-2-enal	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,035 \pm 0,021	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,603 \pm 0,081	<LOQ
2-metylopropanal	<LOQ	0,290 \pm 0,011	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,649 \pm 0,019	0,29 \pm 0,14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,325 \pm 0,012	0,413 \pm 0,021
butanal [10^{-2}]	24,12 \pm 0,57	46,4 \pm 1,5	24 \pm 1,4	21,90 \pm 0,75	24,2 \pm 1,2	28,3 \pm 1,7	31,5 \pm 1,5	25,76 \pm 0,73	24,5 \pm 1,0	40,2 \pm 1,6	29,94 \pm 0,93	33,16 \pm 1,2
3-metylobutanal [10^{-2}]	36,0 \pm 2,8	24,76 \pm 0,95	21,62 \pm 1,1	32,1 \pm 1,7	23,8 \pm 1,2	52,1 \pm 2,1	169,2 \pm 5,7	24,3 \pm 0,99	86,5 \pm 3,1	62,6 \pm 3,9	81,5 \pm 5,6	67,0 \pm 3,5
but-2-enal	6,59 \pm 0,27	<LOQ	14,47 \pm 0,58	6,19 \pm 0,27	2,60 \pm 0,11	21,83 \pm 0,95	22,17 \pm 0,99	18,82 \pm 0,78	3,69 \pm 0,13	3,036 \pm 0,099	14,43 \pm 0,61	11,65 \pm 0,48
pentanal [10^{-2}]	46,5 \pm 1,8	49,9 \pm 1,7	38,9 \pm 1,4	46,7 \pm 2,1	37,9 \pm 1,9	59,8 \pm 1,8	202,8 \pm 7,3	107,4 \pm 4,8	92,4 \pm 3,1	120,8 \pm 6,2	56,7 \pm 1,3	71,2 \pm 1,5
butano-2,3-dion	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,633 \pm 0,062	<LOQ	22,34 \pm 0,74	38,83 \pm 0,98	4,24 \pm 0,17	3,76 \pm 0,15	6,97 \pm 0,15	3,40 \pm 0,21	84,3 \pm 6,1
pentano-2,3-dion	1,174 \pm 0,059	2,13 \pm 0,11	1,396 \pm 0,073	3,27 \pm 0,13	1,357 \pm 0,076	27,761 \pm 0,096	53,7 \pm 2,7	11,38 \pm 0,34	7,56 \pm 0,37	65,6 \pm 3,3	5,79 \pm 0,29	152,6 \pm 7,1
heksanal [10^{-2}]	86,1 \pm 3,6	16,4 \pm 4,5	82,8 \pm 3,4	91,7 \pm 3,2	85,9 \pm 4,2	291 \pm 12	163,6 \pm 9,6	93,0 \pm 5,5	161,3 \pm 6,8	181,7 \pm 5,7	197,6 \pm 7,8	92,7 \pm 2,8
heptanal	3,40 \pm 0,16	3,72 \pm 0,16	3,35 \pm 0,17	4,74 \pm 0,13	3,21 \pm 0,14	3,59 \pm 0,11	4,63 \pm 0,13	5,77 \pm 0,18	3,22 \pm 0,17	3,42 \pm 0,13	4,00 \pm 0,13	5,55 \pm 0,11
trans-hept-2-enal [10^{-2}]	41,3 \pm 1,5	39,2 \pm 1,9	38,9 \pm 1,4	41,1 \pm 1,1	39,6 \pm 1,5	38,1 \pm 1,6	41,3 \pm 1,9	40,1 \pm 1,7	38,9 \pm 1,8	38,9 \pm 1,5	37,8 \pm 1,2	40,4 \pm 2,1
furfural [10^{-2}]	79,9 \pm 3,6	79,4 \pm 3,1	87,8 \pm 04,3	81,9 \pm 3,4	80,0 \pm 2,5	83,0 \pm 2,7	110,3 \pm 5,1	84,3 \pm 3,2	79,7 \pm 3,7	79,4 \pm 2,8	81,1 \pm 3,6	93,4 \pm 3,9
oktanal [10^{-2}]	77,3 \pm 2,1	104,5 \pm 6,2	81,4 \pm 4,1	103,0 \pm 4,9	71,6 \pm 3,1	84,8 \pm 3,3	153,7 \pm 7,1	221,6 \pm 8,3	63,4 \pm 2,3	82,8 \pm 3,3	102,2 \pm 4,5	129,4 \pm 5,1
nonanal [10^{-2}]	241,9 \pm 8,7	301,5 \pm 9,1	163,8 \pm 8,6	223,4 \pm 6,5	150,4 \pm 6,1	169,1 \pm 5,9	712 \pm 33	1050 \pm 39	<LOQ	178,9 \pm 6,1	194,9 \pm 4,9	190 \pm 11
trans-non-2-enal [10^{-2}]	33,7 \pm 1,2	47,2 \pm 1,8	24,8 \pm 9,7	34,7 \pm 1,6	22,3 \pm 1,3	20,03 \pm 0,98	46,9 \pm 2,5	38,6 \pm 2,3	21,8 \pm 1,4	28,3 \pm 1,6	21,3 \pm 1,4	180,1 \pm 8,6
dekanal	<LOD	5,39 \pm 0,28	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	1,488 \pm 0,052	43,5 \pm 1,7	<LOD	<LOD	<LOQ	2,63 \pm 0,13



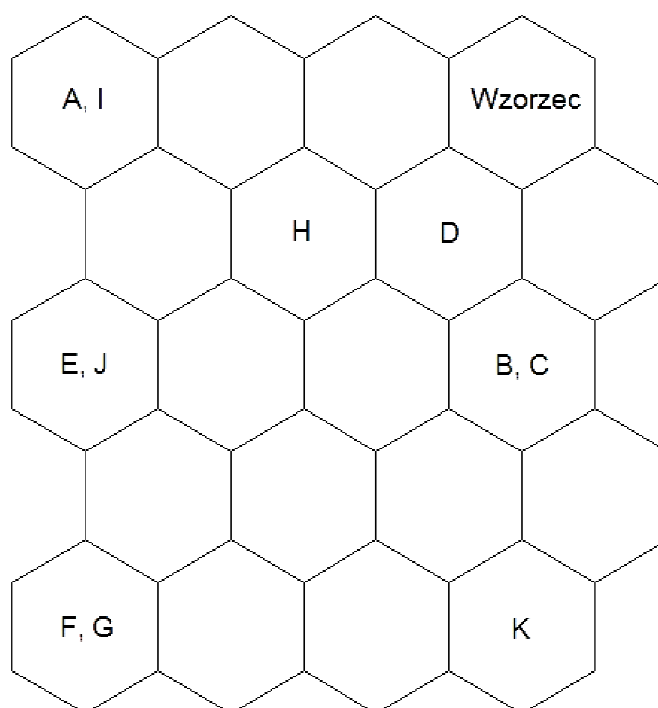
Rys. 29. Wizualizacja zależności/podobieństwa pomiędzy zmiennymi (związki karbonylowe) oznaczonymi w wódkach czystych

Zależności pomiędzy poszczególnymi aldehydami zobrazowane są graficznie na rysunku 30, natomiast na rysunku 31 przedstawiono rozkład badanych próbek wokół wartości wzorca. Rysunek ten wykazuje, że próbki wódek o symbolach H, D, B oraz C, mające najniższe stężenia oznaczanych aldehydów najbardziej przypominają wzorzec. Skład związków karbonylowych w próbce wódki o symbolu K odbiega znacznie od normy oraz od innych próbek. Natomiast próbki A, I, E, J, F oraz G mają pozycję pośrednią. Oznaczone symbole próbek ułożone są w kierunku pogarszającej się jakości sensorycznej określonej przez osoby oceniające (A – najwyższa jakość, K – najniższa jakość). Przeprowadzone porównania nie wskazują na prostą relację pomiędzy stężeniem związków karbonylowych w próbkach, a ich jakością sensoryczną wskazaną przez osoby oceniające, jednakże ważne jest wskazanie potencjalnych związków determinujących ich jakość. Próbki o symbolach H, B, D oraz C charakteryzują się niskimi stężeniami wszystkich oznaczanych związków karbonylowych. Natomiast najprawdopodobniej niskie oceny panelistów dla próbki K (najgorszej jakości) mogą być wytłumaczone stosunkowo wysokim stężeniem następujących

związków: *trans*-non-2-enalu, metnanalu, butano-2,3-dionu oraz pentano-2,3-dionu. Prawdopodobnie właśnie te związki są przyczyną nadawania przez panelistów niskiej oceny jakości wódek. Ponadto próbki G i F zawierają najwyższe stężenia 3-metylobutanalu, pentanal, etanal i nonanal. Czynnikiem dyskryminującym tą grupę próbek jest but-2-enal. Położenie próbek A i I tłumaczone jest najwyższą zawartością butanal i stosunkowo wysokim poziomem heksanal i etanal, natomiast próbki E i J charakteryzuje najwyższe stężenie heksanal oraz etanal.



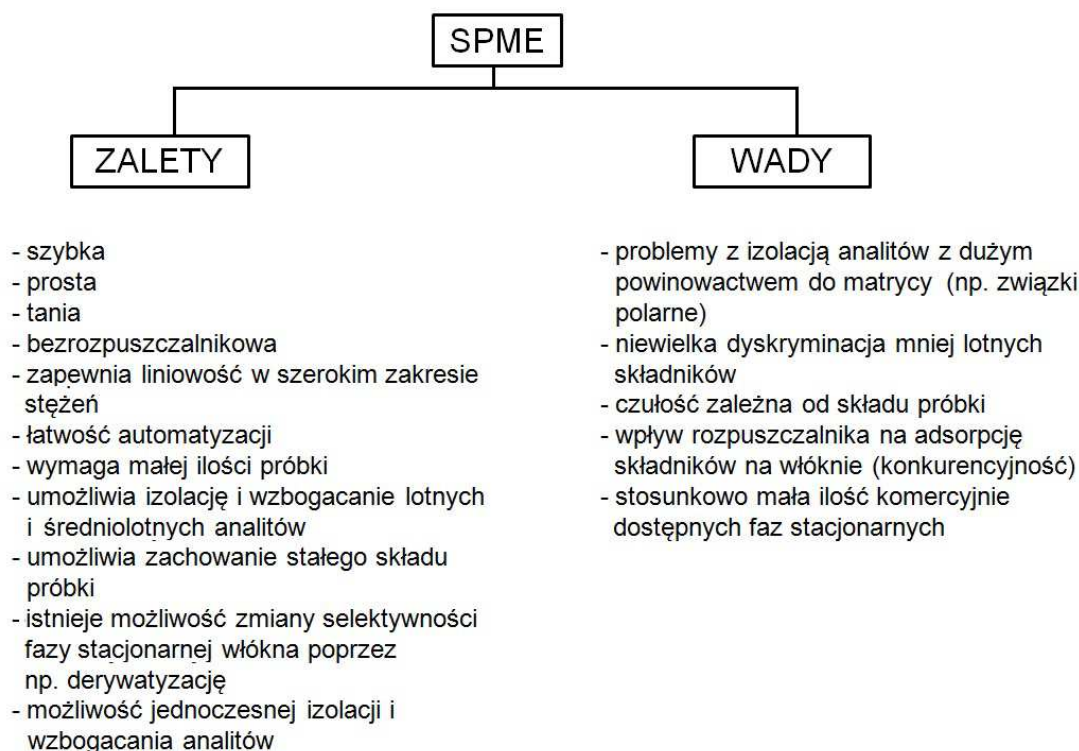
Rys. 30. Korelacja zmiennych SOM na płaszczyźnie



Rys. 31. Rozkład próbek wódek czystych w stosunku do wzorca, A-K – symbole poszczególnych próbek

8 WYKORZYSTANIE POLIMEROWYCH CIECZY JONOWYCH W SPME

W ostatnich latach opracowano wiele technik przygotowywania próbek pozwalających na zmniejszenie ilości toksycznych rozpuszczalników, czasu ekstrakcji, i co z tym związane, całkowitego kosztu procedury przygotowywania próbek do analizy. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, należąca do bezrozpuszczalnikowych technik izolacji i wzbogacania analitów, z uwagi na jej liczne zalety (rys. 32), zyskała dużą popularność.



Rys. 32. Wady i zalety mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME)

Z uwagi na małą ilość handlowo dostępnych faz stacjonarnych, zaczęto projektować nowe materiały powłokowe. Nowe sorbenty powinny charakteryzować się wysoką czułością i selektywnością w stosunku do oznaczanych analitów. Zaprojektowany materiał powłoki powinien być w dużym stopniu odporny na działanie ekstremalnych warunków chemicznych, takich jak pH, obecność soli, rozpuszczalników organicznych oraz modyfikatorów. Faza stacjonarna powinna być również stabilna termicznie, aby uniknąć nadmiernych jej strat podczas desorpcji w wysokiej temperaturze, przy jednoczesnym zachowaniu fizycznej integralności powłoki. Obserwując unikalne właściwości polimerowych cieczy jonowych, spełniające ogół wymagań stawianych sorbentom w SPME, zdecydowano się je wykorzystać jako fazy stacjonarne włókien ekstrakcyjnych.

Prace badawcze wykonane w tej części rozprawy objęły:

- syntezę polimerowych cieczy jonowych,
- przygotowanie włókien ekstrakcyjnych,
- dobranie optymalnych warunków procedury SPME na przykładzie włókna typu poli([ViBHDIM][NTf₂]),
- porównanie wydajności ekstrakcji wybranych analitów z zastosowaniem włókien SPME pokrytych różnymi strukturami polimerowych cieczy jonowych,
- wyznaczenie wybranych parametrów walidacyjnych opracowanej procedury,
- określenie wpływu grubości włókna na wartość granicy wykrywalności na przykładzie włókna PDMS (7 μm, 30 μm oraz 100 μm).

8.1 Synteza polimerowych cieczy jonowych

Wspólnie z Zespołem dr. Andersona (Department of Chemistry, The University of Toledo, USA) postanowiono zsyntezować trzy struktury polimerowych cieczy jonowych:

- chlorek poli(1-winylo-3-propylobenzyloimidazoliowy) – poli([ViPBIM][Cl]),
- bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-(4-winylobenzylo)-4-dimetyloaminopirydyniowy) – poli([ViBDMAPYD][NTf₂]),
- bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-winylo-3-pentylocyjanoimidazoliowy) – poli([ViPCIM][NTf₂]).

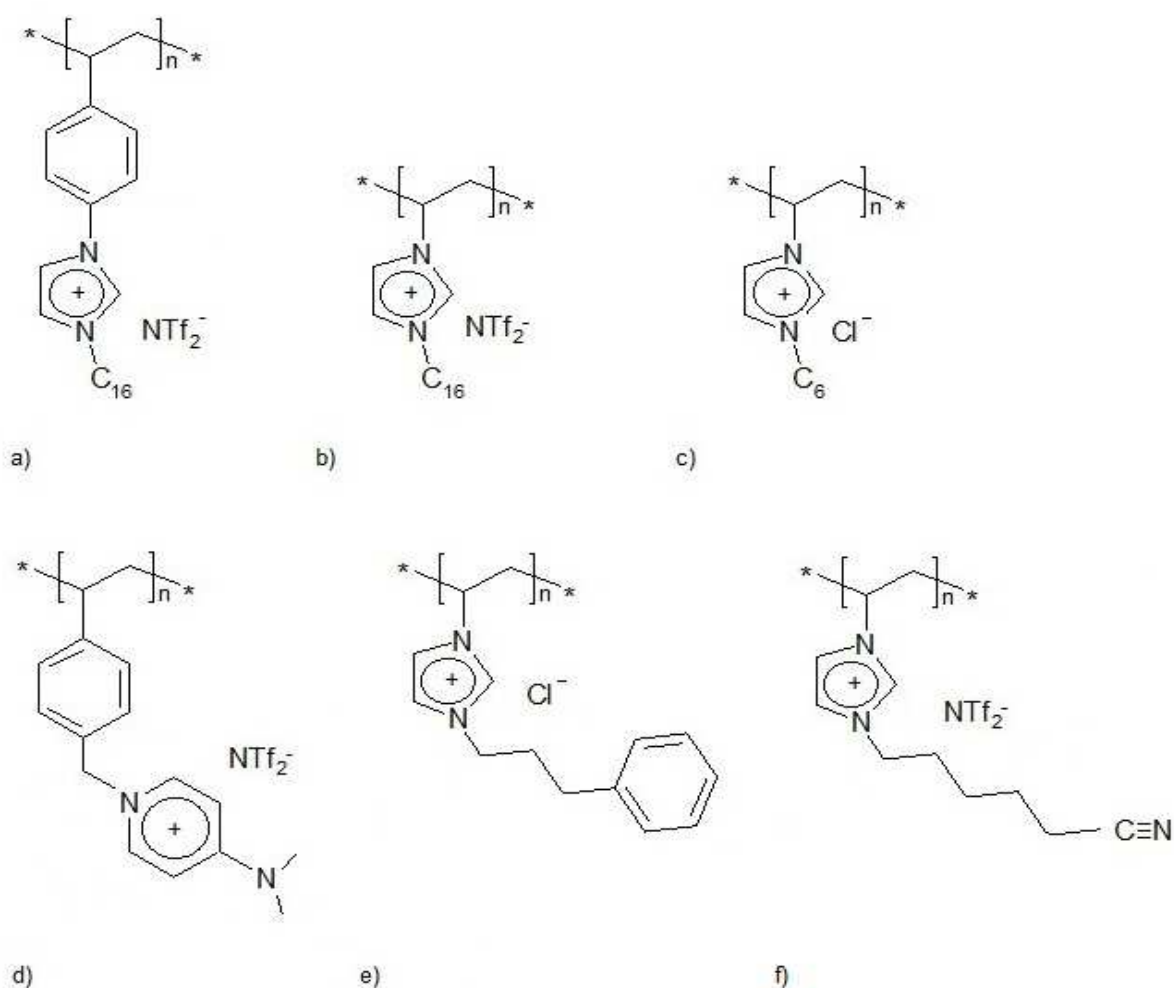
Przy syntezie opracowanych struktur założono otrzymanie sorbentu mającego zdolność do selektywnej ekstrakcji jak największej liczby ubocznych produktów fermentacji alkoholowej, przy zachowaniu jak najniższych granic oznaczalności dla każdego z oznaczanych związków. Struktura polimerowych cieczy jonowych (anion i kation) została tak zaprojektowana, aby otrzymany polimer cechował się dobrą stabilnością termiczną.

Ponadto zdecydowano się wykorzystać trzy wcześniej zsyntezowane przez zespół dr. Andersona polimerowe cieczy jonowe:

- (bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-(4-winylobenzylo)-3-heksadecylomidazoliowy) – poli([ViBHDIM][NTf₂]),
- bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidek poli(1-winylo-3-heksadecyloimidazoliowy) – poli([ViHDIM][NTf₂]),

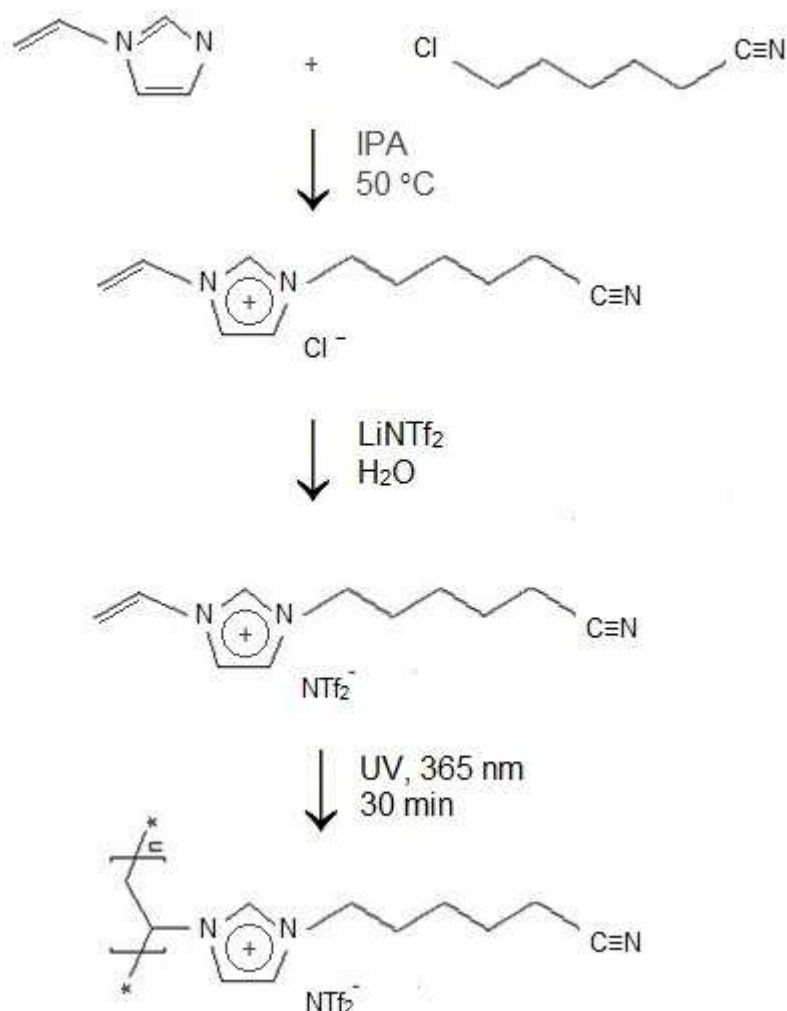
- o chlorek poli(1-winylo-3-heksyloimidazoliowy) – poli([ViHIM][Cl]).

Trzy ostatnie polimery zostały wcześniej z powodzeniem zastosowane jako fazy stacjonarne w SPME do ekstrakcji estrów, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, parabenów oraz alkilofenoli [118, 122, 123, 132, 200]. Zakładając potencjał włókien SPME ze związaną fazą stacjonarną z polimerowych cieczy jonowych umożliwiającą selektywną ekstrakcję szerokiej gamy związków o różnej polarności, zdecydowano się je wykorzystać do jednoczesnej ekstrakcji głównych produktów ubocznych fermentacji alkoholowej: estrów, wyższych alkoholi oraz związków karbonylowych. Struktury wszystkich wykorzystywanych w badaniach cieczy jonowych przedstawiono na rysunku 33.



Rys. 33. Struktury polimerowych cieczy jonowych a) poli([ViBHDIM][NTf₂]), b) poli([ViHDIM][NTf₂]), c) poli([ViHIM][Cl]), d) poli([ViBDMAPYD][NTf₂]), e) poli([ViPBIM][Cl]), f) poli([ViPCIM][NTf₂])

Synteza polimerowych cieczy jonowych została przeprowadzona zgodnie ze schematem przedstawionym na rys 10 (str. 45). Szczegółowy opis syntezy poli([ViBHDIM][NTf₂]), poli([ViHDIM][NTf₂]) oraz poli([ViHIM][Cl]) przedstawiony jest w literaturze [118, 123]. Natomiast syntezę poli([ViBDMAPYD][NTf₂]), poli([ViPBIM][Cl]) oraz poli([ViPCIM][NTf₂]) przedstawiono w formie schematu na przykładzie poli([ViPCIM][NTf₂]) (rys. 34). Przebieg syntezy tego polimeru, a dokładniej proces polimeryzacji, w odróżnieniu od pozostałych polimerów, inicjowany był promieniowaniem UV. Powszechnie, w celu polimeryzacji monomeru wykorzystywana jest rodnikowa polimeryzacja z wykorzystaniem AIBN (2,2'-dimetylo-2,2'-azodipropiononitryl) oraz CHCl₃.



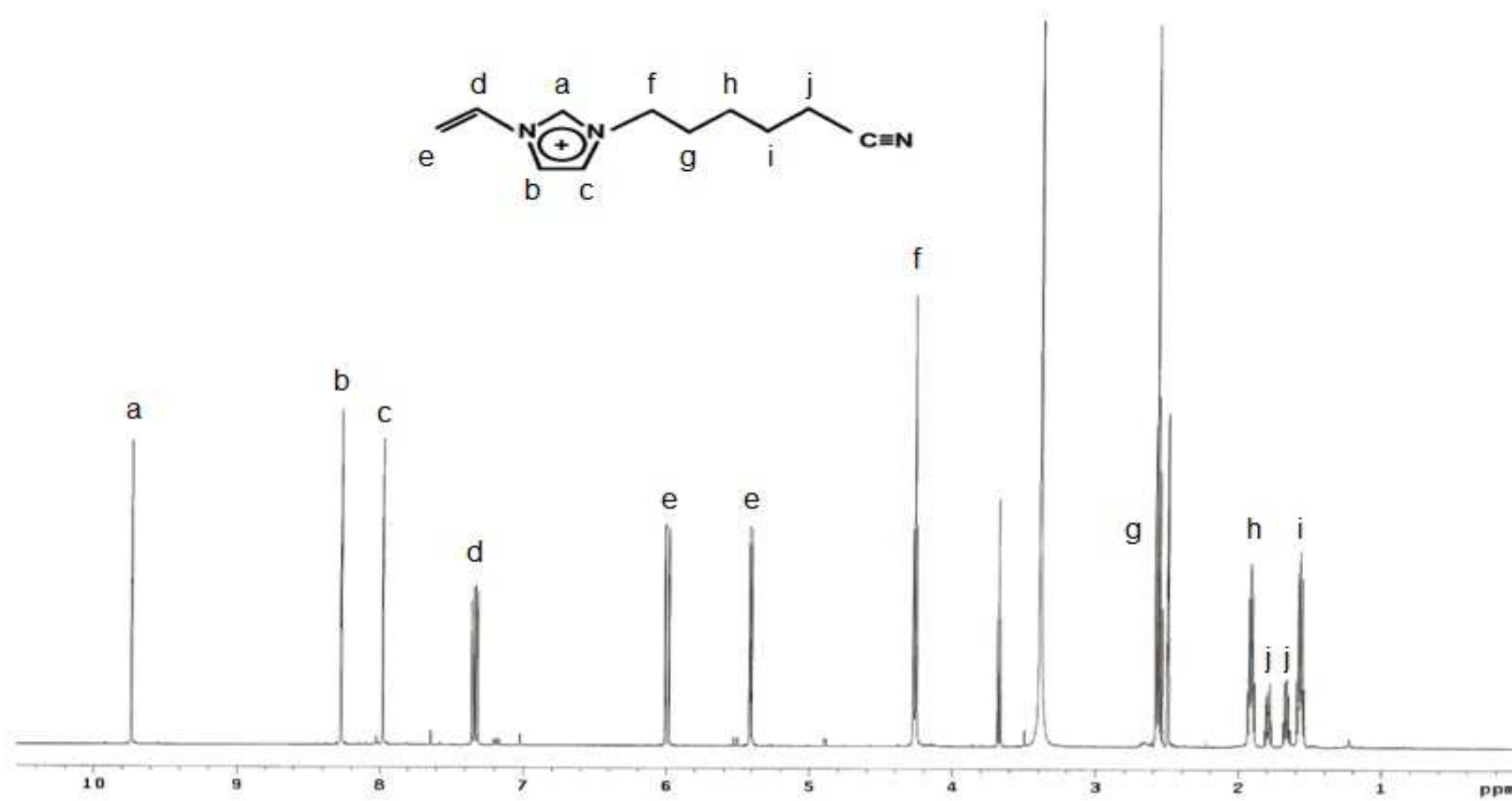
Rys. 34. Schemat syntezy polimerowej cieczy jonowej typu poli([ViPCIM][NTf₂])

8.1.1 Opis syntezy

Do 50 cm³ okrągłodennej kolby odważono reagenty w stosunku molowym 1:1 (5-chlorowaleronitryl oraz winyloimidazol). Następnie dodano 10 cm³ propan-2-olu (IPA), podłączono chłodnicę, włączono mieszadło aby uzyskać szybkość mieszania równą 500 obr./min oraz ogrzewanie (50 °C). Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 24 godziny. Po tym czasie przeprowadzono analizę techniką ¹H NMR w celu sprawdzenia stopnia przebiegu reakcji. Pojawienie się w widmie sygnałów pochodzących od substratów świadczyłoby o niecałkowitym przereagowaniu materiału, czyli o otrzymaniu zanieczyszczonego produktu. W takim przypadku należałoby pozostawić mieszaninę reakcyjną na kolejne kilka godzin, i ponownie wykonać oznaczenie techniką ¹H NMR. W literaturze znaleźć można również opis wielu sposobów oczyszczania cieczy jonowych, które można wykorzystać na tym etapie syntezy [201, 202].

8.1.2 Analiza spektralna ¹H NMR

Z kolby reakcyjnej pobrano do 4 cm³ fiołki ok. 1 cm³ mieszaniny reakcyjnej. Następnie, w celu odparowania rozpuszczalnika próbkę poddano suszeniu w atmosferze próżni w temperaturze 40 °C przez ok. 30 min. W momencie całkowitego odparowania rozpuszczalnika próbkę rozpuszczono w 750 µl DMSO-*d*₆ i przeniesiono do próbówki w celu wykonania analizy widma protonowego techniką magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR). Widmo monomeru przedstawiono na rysunku 35.



Rys. 35. Widmo ¹H NMR monomeru chlorku 1-winylo-3-pentylocyanoimidazolu (¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm 9,78(s, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,38 (m, 1H), 6,00 (dd, 1H), 5,41(dd, 1H), 4,23 (t, 2H), 2,59 (2H), 1,9 (t, 2H), 1,78 (t, 1H), 1,65 (t, 1H), 1,57 (t, 2H),

Po otrzymaniu czystego produktu całość mieszaniny reakcyjnej poddano suszeniu oraz ponownej analizie ^1H NMR w celu potwierdzenia otrzymania czystego produktu oraz sprawdzenia czy otrzymany monomer nie uległ polimeryzacji. Następnie otrzymany monomer oczyszczono poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikiem i następnie poddano wymianie jonowej (anion halogenkowy na anion bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidkowy) w reakcji metatezy. W tym celu do wodnego roztworu monomeru dodano równoważną ilość LiNTf_2 i poddano mieszaniu przez 2 godziny. Następnie przygotowane wcześniej włókno pokryte otrzymanym monomerem poprzez zanurzenie włókna w roztworze monomeru w acetonie i poddano działaniu promieniowania UV o długości fali 365 nm przez okres 30 minut.

Synteżując określony polimer otrzymuje się wystarczającą ilość polimeru na pokrycie ok. 150-200 włókien. Cecha ta warunkuje niski koszt otrzymania jednego włókna. Produkcja samego włókna również nie nastęrcza dużych trudności. Do tego celu wykorzystuje się jedynie konwencjonalną strzykawkę i cienką kapilarę.

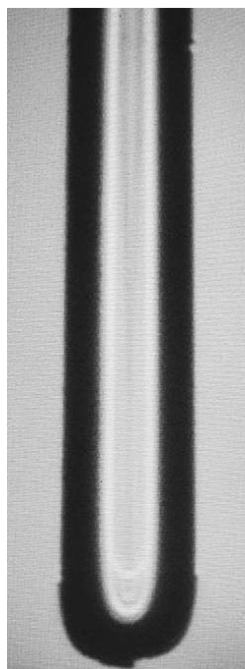
8.2 Przygotowanie włókien ekstrakcyjnych pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi

Włókna pokryte fazą stacjonarną z polimerowej cieczy jonowej nie są komercyjnie dostępne, dlatego też najpierw należy przygotować specjalne urządzenie do SPME. Przygotowywane w laboratorium urządzenie nieco różni się od klasycznego, opisanego przez Arthura i Pawliszyna [94]. Do jego konstrukcji wykorzystuje się konwencjonalną 5 μl mikrostrzykawkę firmy Hamilton.

W pierwszym etapie przygotowania włókna ekstrakcyjnego rozłożono na części komercyjną strzykawkę. Następnie odłamano stalowy pręcik z uchwytu tłoka strzykawki, do którego przyklejono kapilarę o długości około 20 cm i średnicy 100 μm . Następnie usunięto nadmiar kleju, tak aby tłok z kapilarą można było swobodnie wprowadzić do wnętrza strzykawki. Po nałożeniu uszczelki, igły i nakrętki, koniec strzykawki uszczelniono teflonową taśmą. Następnie sprawdzono szczelność przygotowanej strzykawki poprzez wykonanie tzw. testu bąbelkowego. Do tego celu wykorzystano dozownik chromatografu gazowego ogrzany do temperatury 250 $^\circ\text{C}$.

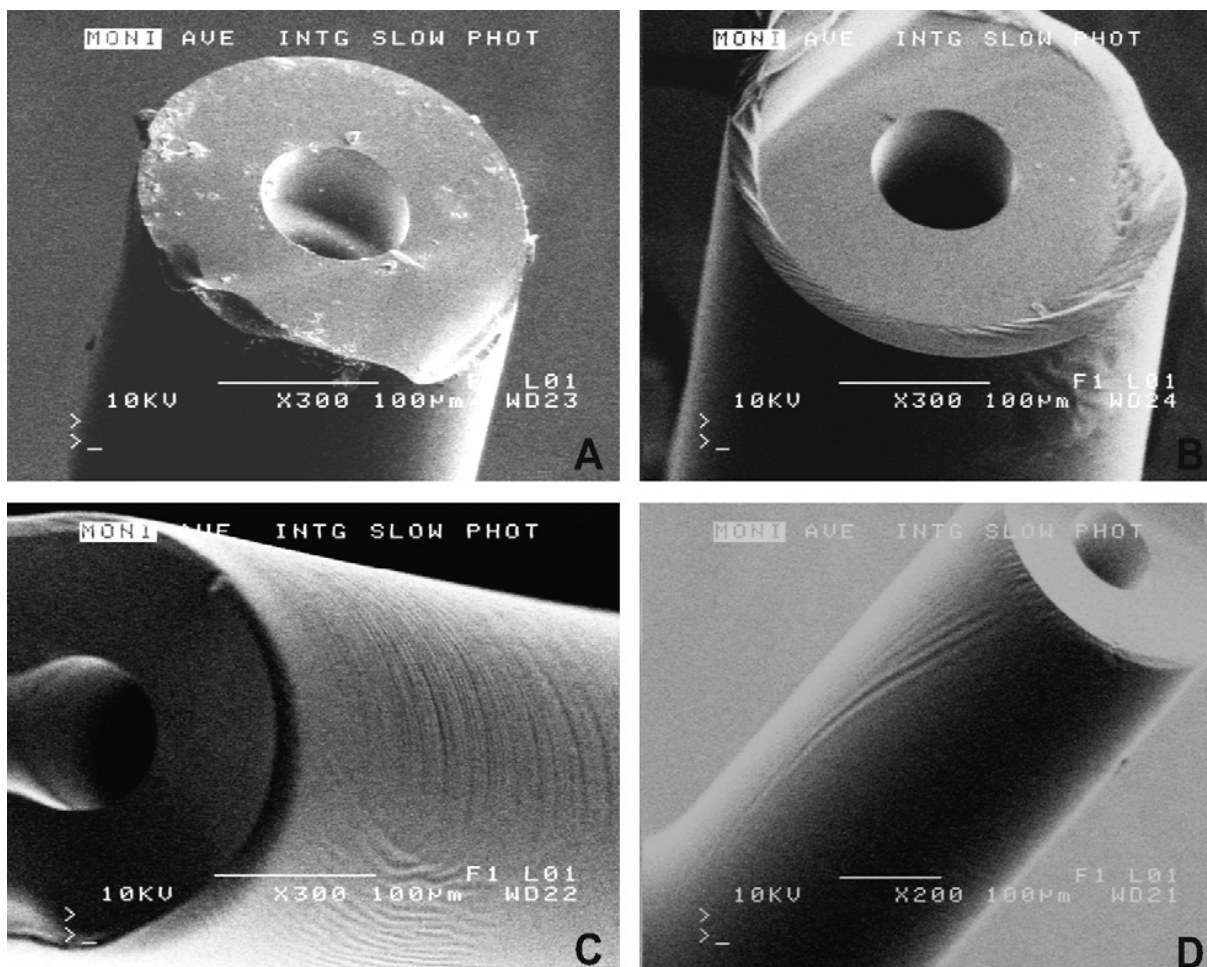
W celu przygotowania rdzenia włókna wysunięto z igły 1 cm kapilary (długość wysuniętej kapilary zależna jest od długości włókna jakie chce się otrzymać) i opalono ją w płomieniu butanu, tak aby powstał szklany pręcik. Po wykonaniu tej czynności zasklepiono

końcówkę włókna wykorzystując do tego celu mikropłomień palnika. Następnie włókno obejrzano dokładnie pod mikroskopem w celu sprawdzenia poprawności zespolenia końcówki kapilary. Prawidłowo zasklepioną końcówkę kapilary przedstawiono na rysunku 36. Zasklepianie końcówki kapilary może powodować jej wygięcie. Pomimo, że lekkie wygięcie końcówki kapilary pozwala wprowadzić ją swobodnie do strzykawki, nie powinno się jej używać ze względu na możliwość złamania włókna bądź też zerwanie połączenia uchwytu tłoka z kapilarą wskutek działania zbyt dużej siły na uchwyt tłoka strzykawki.



Rys. 36. Mikroskopowy obraz prawidłowo zasklepionej kapilary [reproduковано z 203]

Tak przygotowane włókno płukano w czterech różnych rozpuszczalnikach: metanolu, acetonie, heksanie oraz chlorku metylenu przez okres ok. 1-5 minut w każdym rozpuszczalniku. Przed każdą zmianą rozpuszczalnika płuczącego, włókno suszono ok. 1-5 min. Następnie włókno kondycjonowano w dozowniku chromatografu przez 10 min w temperaturze 250 °C. Etapem końcowym było pokrycie włókna polimerem o określonej lepkości. W celu pokrycia włókna polimerową cieczą jonową sporządzano roztwór polimeru w rozpuszczalniku (np. dichlorometan) w stosunku 9:1 [123]. Po etapie kondycjonowania włókna, zanurza się je w roztworze polimeru na ok. 20 sekund, po czym zostawia się do wyschnięcia na ok. 10 minut i chowa do tłoka strzykawki. Na rysunku 37 przedstawiono mikroskopowe zdjęcie włókna pokrytego polimerową cieczą jonową.

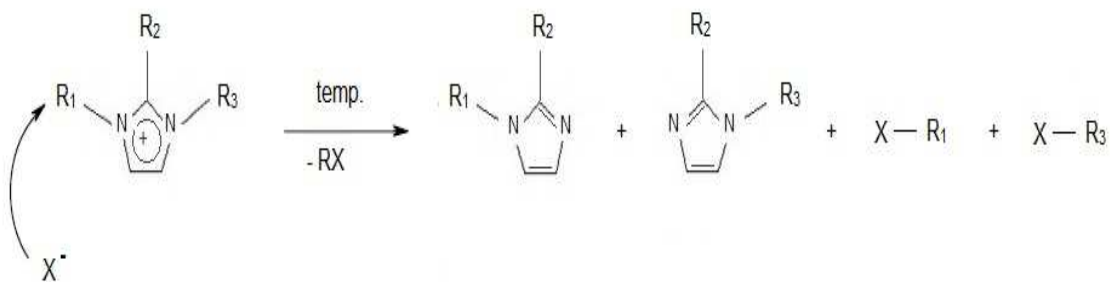


Rys. 37. Zdjęcie wykonane techniką SEM włókna pokrytego polimerową cieczą jonową [reprodukowano ze 123]

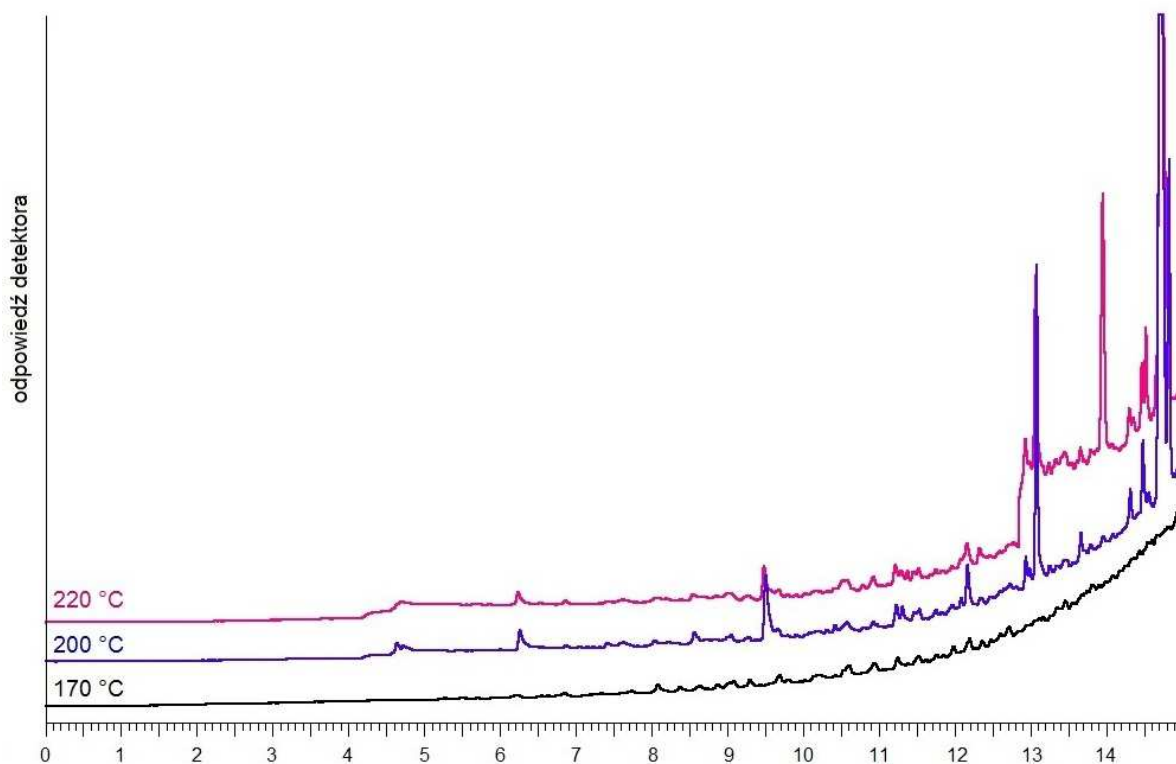
Tak przygotowane włókno ekstrakcyjne kondycjonowano w dozowniku chromatografu w temperaturze 250 °C (włókna pokryte polimerem zawierającym anion bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidkowy) oraz 170 °C (włókna pokryte polimerem z anionem chlorkowym) przez okres 10 minut w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika. Z uwagi na mniejszą stabilność termiczną włókien z anionem chlorkowym, wielokrotnie opisywaną w literaturze [108, 116], która wynika z nukleofilowego charakteru halogenku i tendencję do rozkładu w reakcjach substytucji nukleofilowej S_N1 i S_N2 [125] zdecydowano się stosować niższe temperatury desorpcji. Na rysunku 38 przedstawiono schemat rozkładu termicznego cieczy jonowej. W przypadku stosowania zbyt wysokich temperatur istnieje duże prawdopodobieństwo skrócenia czasu życia włókien ekstrakcyjnych, strat polimeru podczas desorpcji termicznej w dozowniku, a tym samym powstawania pików „duchów” na chromatogramach. Na rysunku 39 przedstawiono profil desorpcji „czystego” włókna ekstrakcyjnego ze związaną fazą stacjonarną typu poli([ViHIM][Cl]) w trzech temperaturach

desorpcji: 170 °C, 200 °C oraz 220 °C. Przedstawione doświadczenie wykazało, iż w przypadku desorpcji włókna w temperaturze 170 °C nie następuje dekompozycja włókna. Z kolei wraz ze wzrostem temperatury desorpcji obserwowano pojawianie się dodatkowych pików na chromatografach. Dodatkowe piki pochodziły najprawdopodobniej z rozkładu fazy stacjonarnej włókna ekstrakcyjnego.

W literaturze opisano wiele sposobów wyznaczania stabilności termicznej cieczy jonowych, m.in. poprzez oszacowanie wzrokowe kapilary pokrytej cieczą jonową (powstanie przebarwień, ulatnianie się wraz ze wzrostem temperatury), oznaczanie stopnia upływu fazy stacjonarnej cieczy jonowej z kapilarnej kolumny chromatograficznej, bądź też stosując analizę termogravimetryczną (TGA) [100, 205-207].



Rys. 38. Schemat rozkładu termicznego imidazoliowej cieczy jonowej



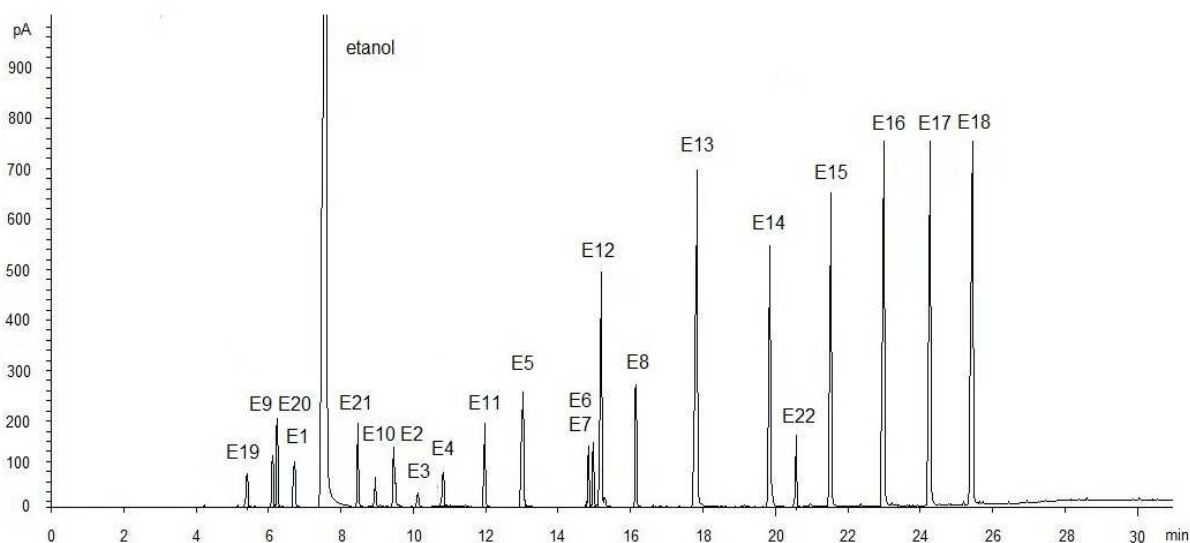
Rys. 39. Profil desorpcji „czystego” włókna poli([ViHIM][Cl]) w temperaturze 170 °C, 200 °C oraz 220 °C

8.3 Dobór optymalnych warunków rozdzielania chromatograficznego HS-SPME/GC-FID

W pierwszym etapie badań, wykorzystujących włókna ekstrakcyjne pokryte polimerowymi cieczami jonowymi (PIL-SPME), ustalono optymalne warunki rozdzielania chromatograficznego oznaczanych analitów. Wykorzystywana w badaniach kolumna oraz program temperaturowy zostały tak dobrane aby uzyskać możliwie najlepsze rozdzielanie wszystkich oznaczanych związków chemicznych przy zachowaniu optymalnego, stosunkowo krótkiego czasu analizy. Optymalne parametry pracy układu chromatograficznego w celu rozdzielania 22 wybranych związków z wykorzystaniem wszystkich włókien ekstrakcyjnych przedstawiono w tabeli 25. Natomiast na rysunku 40 przedstawiono typowy chromatogram mieszaniny związków wzorcowych.

Tab. 25. Warunki pracy układu chromatograficznego

Parametr	Wartość
Kolumna temperaturowy	CP-WAX 57CB (50 m x 0,32 mm x 1 μ m)
Program	40 °C (5 min) $\xrightarrow{7^\circ\text{C/min}}$ 80 °C $\xrightarrow{10^\circ\text{C/min}}$ 220 °C (5 min)
Gaz nośny	hel
Objętościowe natężenie gazu nośnego	1,5 cm ³ /min
Temperatura dozownika/ detektora	250 °C oraz 170 °C / 250 °C
Tryb pracy dozownika	bez podziału strumienia



Rys. 40. Typowy chromatogram otrzymany w wyniku analizy techniką HS-SPME/GC-FID mieszaniny 22 związków ubocznych procesu fermentacji alkoholowej: E19 - aceton, E9 - octan etylu, E20 - acetal dietylowy acetaldehydu, E1 - metanol, E21 - acetal dietylowy akroleiny, E10 - butanian etylu, E2 - butan-2-ol, E3 - propan-1-ol, E4 - 2-metylopropanol, E11 - pentanian etylu, E5 - butan-1-ol, E6 - 2-metylobutanol, E7 - 3-metylobutanol, E12 - heksanian etylu, E8 - pentan-1-ol, E13 - heptanian etylu, E14 - oktanian etylu, E22 - furfural, E15 - nonanian etylu, E16 - dekanian etylu, E17 - undekanian etylu, E18 - dodekanian etylu (symbole na chromatogramie odpowiadają numeracji związków w tabeli 29)

8.4 Wybór wariantu stosowania techniki SPME

Z uwagi na fakt, iż włókna pokryte fazą stacjonarną z polimerowych cieczy jonowych są wciąż przedmiotem badań, zdecydowano się wykorzystać „łagodniejszą” wersję mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej - analizę fazy nadpowierzchniowej. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) została zastosowana głównie ze względu na mniejszy wpływ matrycy próbki (etanolu) na ekstrakcję analitów. W przypadku stosowania mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej bezpośrednio z cieczy (DI-SPME), faza

stacjonarna włókna ekstrakcyjnego jest nasycana etanolem. Duża konkurencja między matrycą i analitami utrudnia sorpcję analitów będących przedmiotem zainteresowania. W przypadku stosowania techniki HS-SPME, konkurencja analitów i etanolu do centrów aktywnych na włóknie jest mniejsza niż w przypadku zastosowania opcji DI-SPME. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej bezpośrednio z cieczy powoduje nadmierne „obciążanie” włókna etanolem, co oprócz utrudnienia ekstrakcji analitów, powoduje skrócenie czasu życia włókna.

8.5 Dobór optymalnych warunków ekstrakcji na przykładzie włókna typu poli([ViBHDIM][NTf₂])

Określenie optymalnych parametrów procedury izolacji i wzbogacania analitów jest kluczowym etapem każdej procedury analitycznej. W przypadku stosowania techniki SPME bardzo ważne jest określenie parametrów pozwalających na zapewnienie maksymalnej wydajności ekstrakcji analitów będących przedmiotem badań. Podczas doboru optymalnych warunków ekstrakcji oznaczanych analitów, uwzględniono następujące parametry:

- objętość próbki,
- wpływ stężenia etanolu,
- temperaturę ekstrakcji,
- czas ekstrakcji,
- zmianę siły jonowej próbki,
- czas desorpcji.

Należy zaznaczyć, że podczas doboru optymalnych parametrów prowadzenia procesu izolacji i wzbogacania analitów, zmieniano tylko jeden parametr, utrzymując stałość pozostałych. W taki sposób uzyskiwano rzeczywisty wpływ danego parametru na proces ekstrakcji analitów. Dodatkowo w celu przyspieszenia ustalenia się stanu równowagi, próbki poddawano ciągłemu mieszaniu przy zachowaniu stałej szybkości obrotów.

8.5.1 Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji analitów

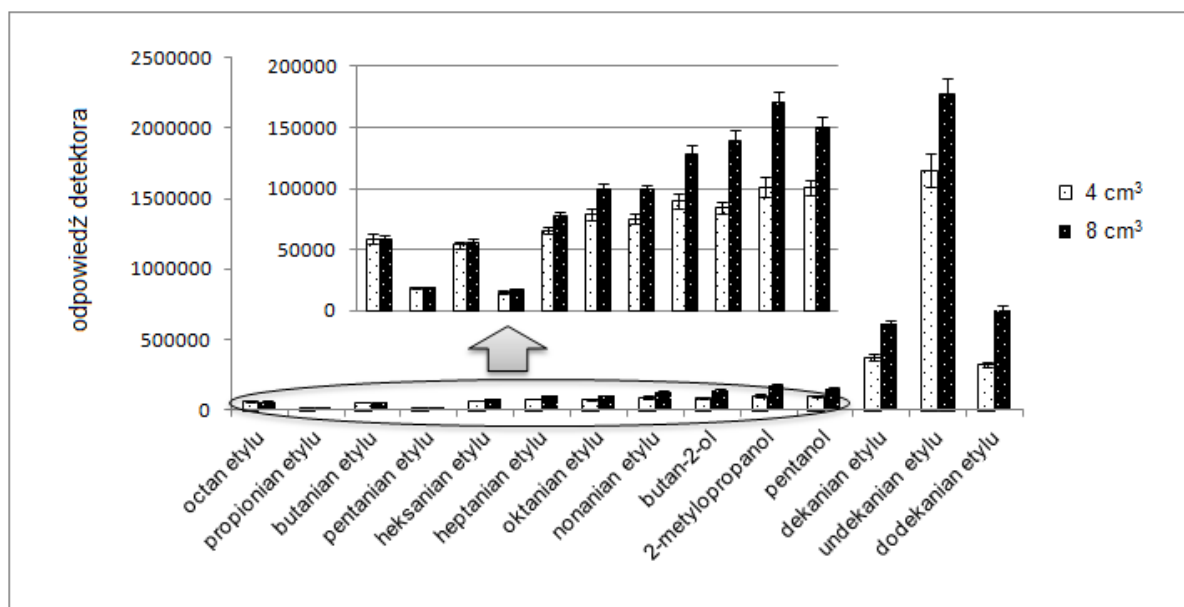
W przypadku stosowania wersji HS-SPME, anality ekstrahowane są do fazy stacjonarnej włókna ekstrakcyjnego z fazy znajdującej się nad powierzchnią ciekłej próbki. Stężenie analitów w fazie gazowej zależy od stosunku faz (β) i od wartości stałej podziału (K), dlatego też objętość próbki, a właściwie stosunek fazy gazowej do fazy ciekłej jest bardzo istotny [208].

$$\beta = \frac{V_G}{V_C} \quad (4)$$

gdzie:

V_G - objętość fazy gazowej, V_C - objętość fazy ciekłej

W celu zbadania optymalnej objętości próbki ciekłej sprawdzono wydajność ekstrakcji analitów dla próbki o objętości odpowiednio 4 cm³ i 8 cm³ w fiolce o objętości 15 cm³. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, iż lepszą wydajność ekstrakcji, w szczególności dla mniej lotnych związków, otrzymuje się w przypadku zastosowania objętości próbki ciekłej również 8 cm³ ($\beta = 0,875$). Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresu na rysunku 41.

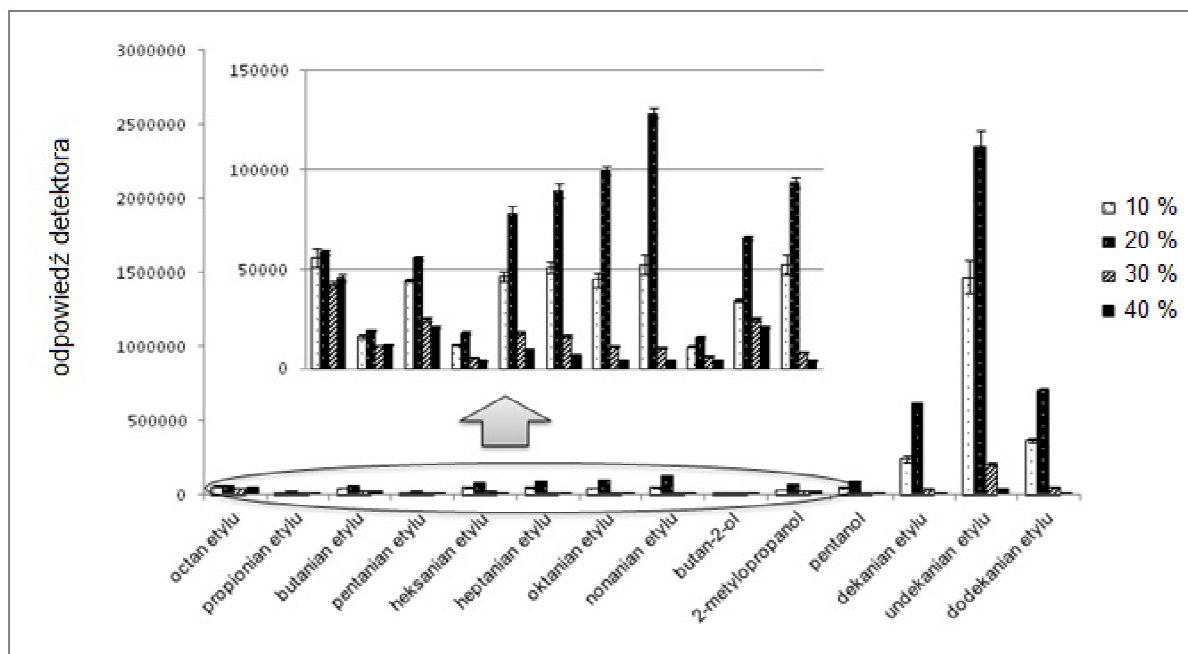


Rys. 41. Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji wybranych analitów

8.5.2 Wpływ stężenia etanolu na wydajność ekstrakcji analitów

Próbki badanych w niniejszej pracy destylatów rolniczych charakteryzują się ok. 90 % (v/v) zawartością etanolu, jednakże opracowywana procedura może być zastosowana także do innych produktów alkoholowych, takich jak wódki czyste i gatunkowe, charakteryzujących się zazwyczaj zawartością etanolu rzędu 40 % (v/v). Wobec tego należało dobrać optymalną wartość stężenia etanolu, dla której otrzymuje się najlepszą wydajność ekstrakcji oznaczanych analitów.

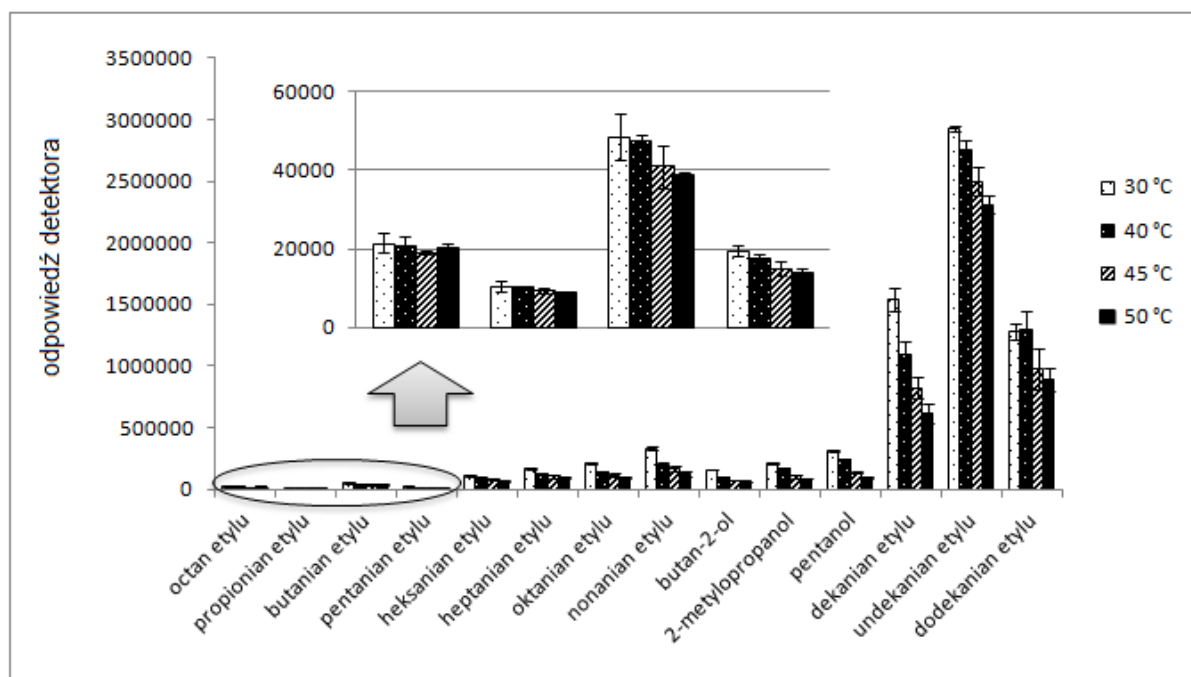
W celu określenia odpowiedniego stężenia etanolu wykonano oznaczenia próbek o zawartości etanolu odpowiednio 10 %, 20 %, 30 % oraz 40 % (v/v). Przeprowadzone badania pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że najwyższą wydajność ekstrakcji analitów otrzymano w przypadku analizy próbek o 20 % (v/v) zawartości etanolu (rys 42). Zarówno w przypadku nadmiernego rozcieńczenia próbki jak i ekstrakcji analitów z próbek o zbyt wysokim stężeniu etanolu obserwowano spadek wydajności ekstrakcji. Warto zwrócić uwagę na znaczny spadek wydajności ekstrakcji analitów (nawet o 90 %) już przy zwiększeniu stężenia etanolu do 30 %. Otrzymana tendencja spadku wydajności ekstrakcji wraz ze wzrostem stężenia etanolu w próbce jest tożsama z rezultatami otrzymywanymi przez innych autorów [42, 49, 197].



Rys. 42. Wpływ stężenia etanolu na wydajność ekstrakcji wybranych analitów

8.5.3 Wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji analitów

Temperatura ekstrakcji jest ważnym parametrem wpływającym na stałą podziału analitów pomiędzy próbkę, jej fazę nadpowierzchniową oraz fazę stacjonarną włókna ekstrakcyjnego. Wraz ze wzrostem temperatury, wzrasta ilość analitów w fazie gazowej próbki, jednakże równocześnie maleje współczynnik podziału pomiędzy fazę stacjonarną włókna ekstrakcyjnego, a fazę gazową próbki. Ważne zatem jest dobranie takiej temperatury ekstrakcji, która pozwoli na efektywną ekstrakcję wszystkich oznaczanych związków. W tym celu ekspozycję włókna nad roztworem próbki przeprowadzono w temperaturach 30 °C, 40 °C, 45 °C oraz 50 °C. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresu na rysunku 43. Z przeprowadzonych oznaczeń wynika, że najlepszą efektywność ekstrakcji wszystkich analitów otrzymano prowadząc izolację i wzbogacanie analitów w temperaturze 30 °C. Prowadzenie procesu ekstrakcji w podwyższonej temperaturze, nie wpływa korzystnie na wydajność ekstrakcji oznaczanych analitów, może natomiast wpłynąć na lepszą wydajność ekstrakcji innych analitów (nie będących przedmiotem zainteresowania).



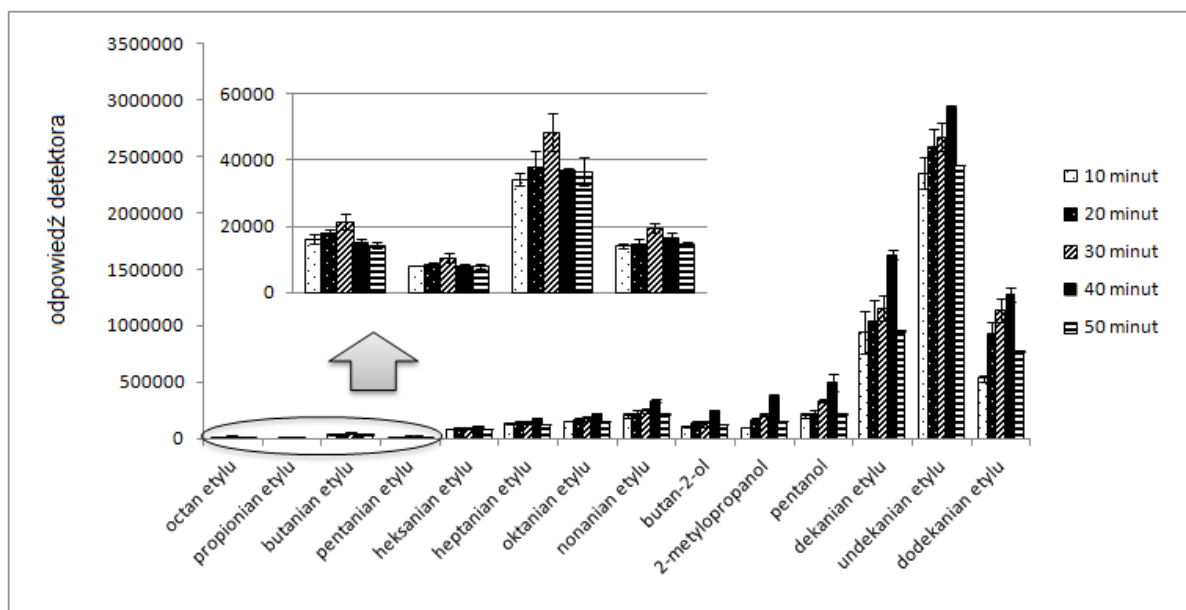
Rys. 43. Wpływ temperatury ekstrakcji na wydajność ekstrakcji poszczególnych analitów

8.5.4 Wpływ czasu ekspozycji włókna na wydajność ekstrakcji analitów

Czas ekspozycji włókna nad powierzchnią próbki jest kolejnym istotnym parametrem w procesie optymalizacji procedury, głównie z uwagi na fakt, iż to on warunkuje ilościowe przejście analitów do powierzchni włókna ekstrakcyjnego. Warto nadmienić, iż osiągnięcie równowagi nie jest warunkiem koniecznym stosowania ilościowej analizy w SPME. Koniecznością natomiast jest zachowanie stałego reżimu czasowego [209].

W celu ustalenia długości czasu ekspozycji włókna nad roztworem próbki, ekstrakcję analitów prowadzono w czasie 10, 20, 30, 40 oraz 50 minut. Z uwagi na fakt, iż termostatowanie próbki przed rozpoczęciem ekstrakcji korzystnie wpływa na wydajność procesu, postanowiono termostatować próbkę przed każdą analizą przez okres 5 minut. Nie zdecydowano się na wydłużenie tego okresu z uwagi na fakt, iż zbyt długi czas termostatowania wydłużyłby całkowity czas trwania analizy.

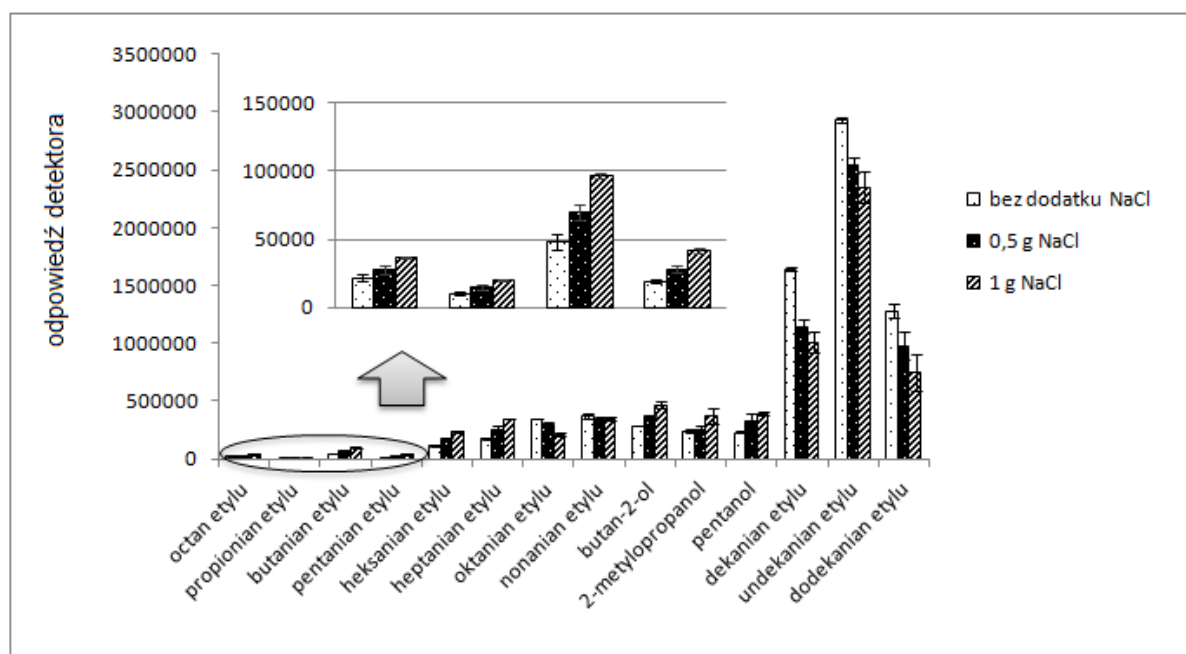
Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresu na rysunku 44. Największą wydajność ekstrakcji lotnych estrów otrzymuje się w przypadku stosowania 30-minutowej ekspozycji włókna nad roztworem próbki. Z kolei dla alkoholi oraz estrów wyżejwrzających (od C6) najwyższą wydajność ekstrakcji uzyskuje się dopiero po 40 minutach. Zjawisko to wiąże się ze zjawiskiem sorpcji/desorpcji zachodzącym podczas trwania procesu oraz konkurencją analitów do miejsc aktywnych zlokalizowanych na/w filmie fazy stacjonarnej.



Rys. 44. Wpływ czasu ekspozycji włókna na wydajność ekstrakcji poszczególnych analitów

8.5.5 Wpływ zmiany siły jonowej próbki na wydajność ekstrakcji analitów

Jednym z często optymalizowanych parametrów przy opracowywaniu procedury SPME jest dodatek soli nieorganicznej (np. NaCl, Na₂SO₄), który powoduje wzrost siły jonowej roztworu, a tym samym zmniejszenie rozpuszczalności oznaczanych związków organicznych w próbce. Efekt dodatku soli jest zależny od polarności analitu oraz składu analizowanej matrycy. Dodatek soli nie zawsze jest jednak wskazany, bowiem wskutek manipulacji siłą jonową próbki możliwa jest utrata selektywności włókna [210, 211]. Z uwagi na fakt, iż współczynnik podziału analitów zależy w dużej mierze od siły jonowej roztworu, konieczne było sprawdzenie wpływu wysalania próbki na wydajność ekstrakcji analitów. W tym celu zbadano wydajność ekstrakcji analitów w próbkach bez dodatku NaCl oraz z dodatkiem 0,5 g NaCl oraz 1 g NaCl (rys. 45). Przeprowadzone oznaczenia wykazały, iż dodatek soli nieorganicznej wpływa korzystnie w przypadku ekstrakcji alkoholi i estrów etylowych od C2 do C7 natomiast w stosunku do ekstrakcji wyższych estrów jest czynnikiem pogarszającym efektywność ekstrakcji. Warto wspomnieć, iż niekorzystnym zjawiskiem obserwowanym w przypadku stosowania soli nieorganicznej było duże wysycenie włókna etanolem, które może powodować skrócenie czasu życia włókna.



Rys. 45. Wpływ dodatku NaCl na wydajność ekstrakcji analitów

8.5.6 Wpływ czasu desorpcji na ilościowe wprowadzenie analitów do kolumny

Bardzo ważne jest ilościowe wprowadzenie zasorbowanych na włóknie związków do kolumny chromatograficznej. Czas trwania procesu desorpcji uzależniony jest od temperatury dozownika. W wyższych temperaturach pracy dozownika okres desorpcji jest zazwyczaj krótszy. Czasy desorpcji stosowane w SPME wynoszą zazwyczaj kilku minut, przy czym desorpcja większości analitów z włókna następuje w czasie krótszym niż pół minuty. W trakcie określenia optymalnych warunków czasu i temperatury desorpcji analitów z włókna ekstrakcyjnego uwzględniono doniesienia literaturowe z zakresu wykorzystania polimerowych cieczy jonowych w SPME [122, 132, 200]. Zdecydowano się stosować 5-minutową desorpcję w temperaturze 250 °C. Po 5-minutowym okresie desorpcji przeprowadzano kolejną desorpcję włókna w dozowniku chromatografu w celu sprawdzenia ewentualnego występowania zjawiska przenoszenia pozostałości analitów do kolejnych analiz (tzw. *carryover*). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, iż czasie 5 minut następuje ilościowa desorpcja badanych analitów z włókna ekstrakcyjnego, co wskazuje na poprawność założonego pierwotnie czasu ekstrakcji.

8.5.7 Zestawienie dobranych parametrów izolacji i wzbogacania analitów z zastosowaniem włókna typu poli([ViBHDIM][NTf₂])

W tabeli 26 przedstawiono dobrane parametry ekstrakcji analitów. Warto zauważyć, że zmieniając czas ekstrakcji oraz stosując dodatek soli nieorganicznej można poprawić wydajność ekstrakcji określonych analitów. Tak na przykład, w przypadku potrzeby analizy napoju alkoholowego o niższej zawartości lotnych estrów w celu uzyskania niższych granic wykrywalności można skrócić czas ekstrakcji do 30 minut oraz zastosować dodatek chlorku sodu do próbki. Możliwość manipulacji tymi dwoma parametrami czyni opracowaną metodę uniwersalną.

Tab. 26. Optymalne warunki izolacji i wzbogacania analitów

Parametr	Wartość
Objętość próbki	8 cm ³ w fiolce 15 cm ³ ($\beta= 0,875$)
Stężenie etanolu w próbce (v/v)	20 %
Temperatura ekstrakcji	30 °C
Czas ekstrakcji	30/ 40 minut w zależności od rodzaju analitów
Dodatek NaCl	Bez dodatku soli (estry)/ 1 g NaCl (alkohole, estry C2-C7)
Czas desorpcji	5 minut
Mieszanie próbki	tak

8.6 Porównanie wydajności ekstrakcji wybranych analitów z zastosowaniem włókien SPME pokrytych różnymi strukturami polimerowych cieczy jonowych

Kolejnym celem tej części badań było porównanie wydajności ekstrakcji wybranych produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej dla sześciu włókien SPME pokrytych różnymi strukturami polimerowych cieczy jonowych:

- poli([ViBHDIM][NTf₂]),
- poli([ViHDIM][NTf₂]),
- poli([ViHIM][Cl]),
- poli([ViBDMAPYD][NTf₂]),
- poli([ViPBIM][Cl]),
- poli([ViPCIM][NTf₂])

oraz porównanie otrzymanych rezultatów z wydajnością ekstrakcji poszczególnych związków z zastosowaniem komercyjnie dostępnych włókien typu: PA 85 μm oraz PDMS 7 μm . Do badań zdecydowano się wykorzystać włókno PDMS o najmniejszej grubości z handlowo dostępnych, z uwagi na zbliżoną grubość powłoki do włókien PIL-SPME. Długość każdego włókna typu PIL wynosiła 1 cm i była tożsama z długością porównywanych włókien komercyjnych, a grubość fazy stacjonarnej wynosiła 12-16 μm [123, 132].

Oznaczaniu poddano 22 związki: aceton, octan etylu, acetal dietylowy acetaldehydu, metanol, acetal dietylowy akroleiny, butanian etylu, butan-2-ol, propan-1-ol, 2-metylopropanol, pentanian etylu, butan-1-ol, 2-metylobutanol, 3-metylobutanol, heksanian etylu, pentan-1-ol, heptanian etylu, oktanian etylu, furfural, nonanian etylu, dekanian etylu, undekanian etylu oraz dodekanian etylu.

Ze względu na fakt, iż oznaczane grupy związków różniły się polarnością oraz mając na uwadze fakt, iż za sorpcję analitów odpowiedzialny jest zarówno anion jak i kation polimerowej cieczy jonowej, jako fazy stacjonarne wybrano włókna różniące się zarówno kationem jak i anionem. Kation polimerowej cieczy jonowej oparty na pierścieniu imidazoliowym został wybrany ze względu na jego wysoką stabilność termiczną, a także tendencję do tworzenia gładkich i jednorodnych powłok [212]. O stabilności termicznej polimeru oprócz anionu decyduje także podstawnik alkilowy – im jest on dłuższy tym większa stabilność termiczna powłoki [116]. Szacuje się, że włókna pokryte polimerami typu poli([ViBHDIM][NTf₂]), poli([ViHDIM][NTf₂]), poli([ViBDMAPYD][NTf₂]) oraz poli([ViPCIM][NTf₂]) charakteryzować się będą właściwościami hydrofobowymi (głównie ze względu na obecność anionu [NTf₂]⁻) oraz wysoką stabilnością termiczną, w porównaniu do włókien pokrytych polimerami zawierającymi w swojej strukturze anion chlorkowy (pomimo tej samej struktury pierścienia). Z kolei włókna pokryte polimerami typu poli([ViHIM][Cl]) oraz poli([ViPBIM][Cl]) powinny silnie oddziaływać z polarnymi analitami będącymi donorami protonów [126]. Doniesienia literaturowe przedstawiają, że ciecze jonowe o anionie chlorkowym wykazują wysoką zasadowość wiązania wodorowego i silnie oddziałują z cząsteczkami posiadającymi wysoką kwasowość wiązania wodorowego [126, 213]. Wobec tego, włókna zawierające aniony chlorkowe powinny wykazywać większe powinowactwo do związków polarnych, natomiast włókna o anionie bis[(trifluorometylo)sulfonylo]imidkowym powinny wykazywać większe powinowactwo do związków o charakterze niepolarnym.

Izolację i wzbogacanie oznaczanych związków z wykorzystaniem każdego włókna ekstrakcyjnego prowadzono w takich samych warunkach ekstrakcji (tab. 27). Parametry pracy układu chromatograficznego przedstawiono w tabeli 25 (str. 111).

Tab. 27. Parametry ekstrakcji wybranych analitów z zastosowaniem włókien PIL-SPME

Parametr	Wartość
Objętość próbki	10 cm ³ w fiolce 20 cm ³ ($\beta = 1$)
Stężenie etanolu w próbce (v/v)	20 %
Temperatura ekstrakcji	30 °C
Czas ekstrakcji	40 minut
Dodatek NaCl	Bez dodatku NaCl
Czas desorpcji	5 minut
Mieszanie próbki	Tak (800 obr./min)

Roztwory wzorcowe sporządzono przy użyciu substancji wzorcowych: estrów, alkoholi oraz związków karbonylowych. Przygotowane roztwory przechowywano w temperaturze 4 °C. W celu porównania odpowiedzi detektora, przy wszystkich ośmiu włóknach ekstrakcyjnych analizowano próbki o takim samym stężeniu związków wzorcowych (5 ppm wszystkich związków z wyjątkiem octanu etylu - 10 ppm oraz estrów etylowych od C8 do C12, dla których stężenie wynosiło 0,5 ppm). Analizy wykonane zostały w trzech powtórzeniach, a powierzchnie pików uśredniano.

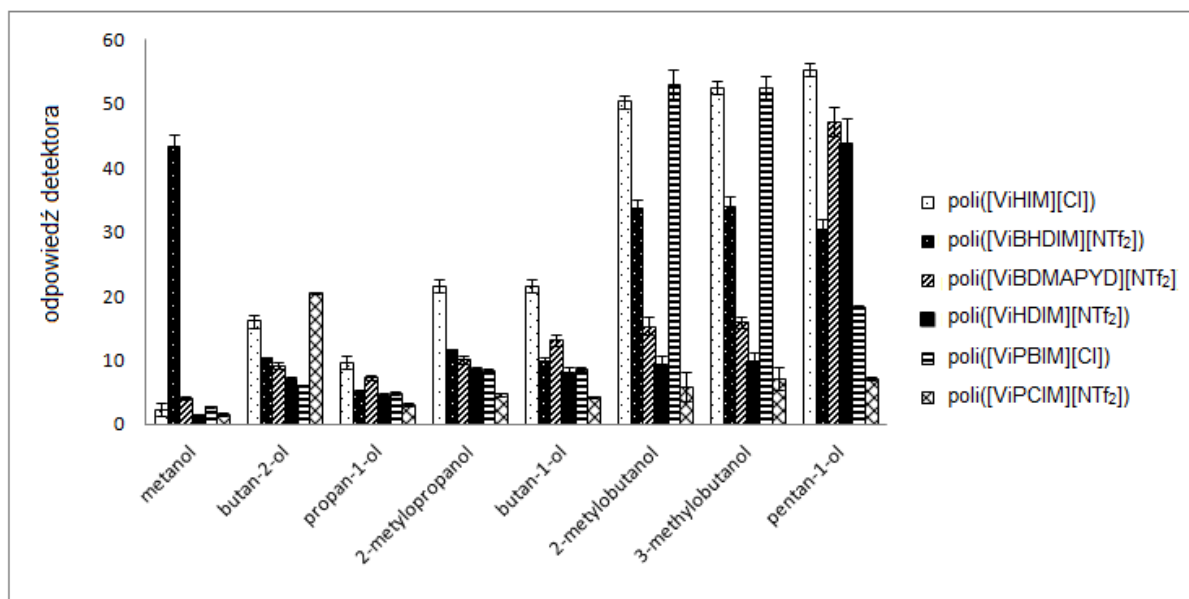
Wszystkie oznaczane związki można najprościej sklasyfikować w trzech grupach tj. alkohole, estry i związki karbonylowe, wobec tego efektywność ekstrakcji poszczególnych analitów z wykorzystaniem PIL-SPME przedstawiono dla każdej grup z osobna. Na wstępie warto zaznaczyć, iż o charakterze oddziaływań związku, a co z tym związane, powinowactwem do określonej struktury fazy stacjonarnej, decyduje zespół oddziaływań indukcyjnych, dyspersyjnych, wiązania wodorowe oraz przeniesienia ładunku [214, 215].

8.6.1 Porównanie wydajności ekstrakcji alkoholi

Pierwsza grupa wyodrębnionych związków, alkohole fuzlowe, tak jak przypuszczano, została wyekstrahowana z najwyższą efektywnością z zastosowaniem włókna pokrytego fazą stacjonarną typu poli([ViHIM][Cl]) (rys. 46). Wyjątkiem był metanol, dla którego najlepsze wyniki otrzymano stosując włókno z fazą stacjonarną typu poli([ViBHDIM][NTf₂]), choć spodziewać by się można, że najlepszą wydajność ekstrakcji metanolu powinno również wykazywać włókno poli([ViHIM][Cl]), jako że metanol jest bardziej polarny od wyższych alkoholi. Doświadczenie to powtórzono kilka razy w celu potwierdzenia otrzymywania wysokiego powinowactwa tego włókna do metanolu. Niemniej jednak wciąż otrzymywano porównywalne wyniki. Warto zaznaczyć, iż badania dotyczące ekstrakcji alkoholi ze słodkich win prowadzone przez zespół Rodríguez-Bencomo wykazały, że najwyższą wydajność ekstrakcji alkoholi, w szczególności metanolu (wydajność ekstrakcji metanolu ok. 5 razy większa) wykazuje (spośród stosowanych włókien typu PDMS:100 μm oraz 7 μm, PA, PDMS/DVB, CW/DVB) włókno ze związaną fazą stacjonarną typu CW/DVB mającą w swojej strukturze benzyłową grupę funkcyjną [216]. Porównując struktury fazy stacjonarnej typu poli([ViBHDIM][NTf₂]) oraz CW/DVB można więc przypuszczać, że obecność grupy benzyłowej w strukturze powodować może wzrost powinowactwa powłoki do metanolu.

Włókno typu poli([ViBHDIM][NTf₂]) wykazuje również stosunkowo wysoką wydajność ekstrakcji w stosunku do innych alkoholi fuzlowych. Wyniki nieco niższe

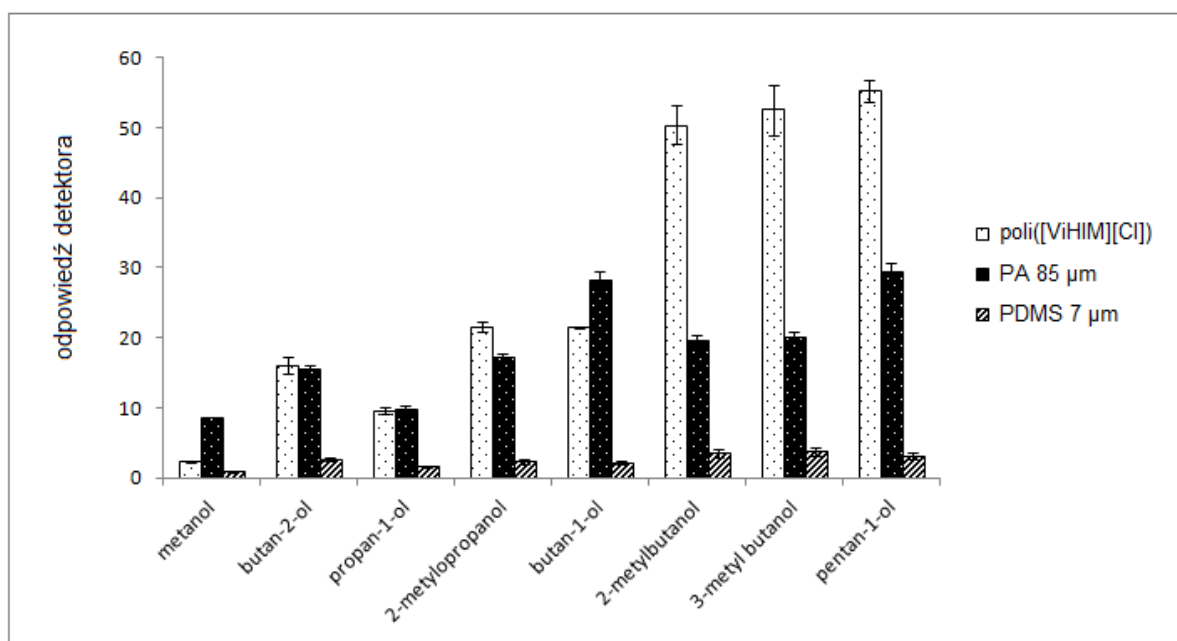
otrzymuje się w przypadku ekstrakcji alkoholi za pomocą włókna typu poli([ViHDIM][NTf₂]) różniącym się w swojej strukturze jedynie obecnością pierścienia benzyłowego. Omawiając ekstrakcję alkoholi nie można pominąć badań wykonanych w zespole dr. Andersona [132]. W pracy tej porównywano wydajność ekstrakcji alkoholi, fenoli i kwasów z wykorzystaniem włókien, poli([ViHIM][Cl]) oraz poli([ViHIM][NTf₂]), o podobnych oddziaływaniach dyspersyjnych. Autorzy wykazali, iż anion polimerowej cieczy jonowej (w przypadku takiego samego kationu) nie wpływa na wydajność ekstrakcji alkoholi. Podobny współczynnik wzbogacenia otrzymany z użyciem obu włókien wynikał z faktu „wiązań” oznaczanych związków z powłoką sorpcyjną, z uwagi na wysokie wartości pK_a alkoholi, głównie poprzez oddziaływania dyspersyjne. Mając powyższe na uwadze można stwierdzić, że niższa wydajność ekstrakcji alkoholi otrzymywana w przypadku zastosowania włókna typu poli([ViHDIM][NTf₂]), w stosunku do rezultatów otrzymanych z wykorzystaniem włókna typu poli([ViHIM][Cl]), wynika z obecności dłuższego podstawnika alkilowego (nadającego bardziej hydrofobowy charakter fazie sorpcyjnej) w pierścieniu imidazoliowym w pierwszej z nich.



Rys. 46. Wydajność ekstrakcji alkoholi z zastosowaniem włókien pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi

Na rysunku 47 przedstawiono porównanie zdolności ekstrakcji alkoholi z zastosowaniem włókna poli([ViHIM][Cl]) do możliwości ekstrakcyjnych handlowych włókien ze związaną fazą stacjonarną typu PDMS i PA. Włókno pokryte polimerową cieczą jonową typu poli([ViHIM][Cl]), spośród wszystkich badanych włókien PIL-SPME, charakteryzuje się największą wydajnością ekstrakcji w stosunku do niemalże wszystkich

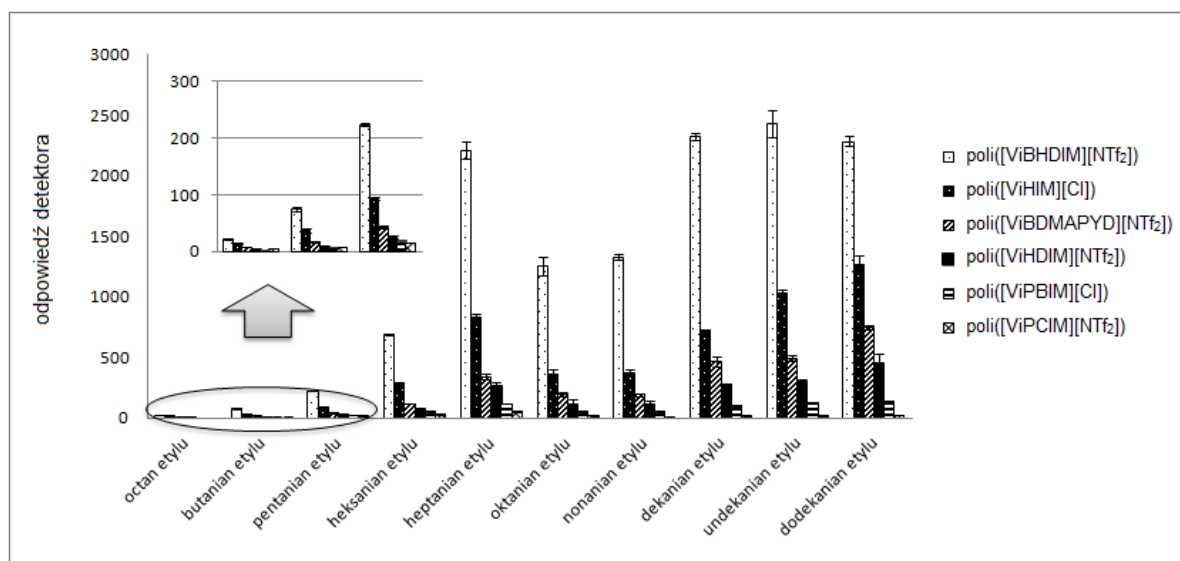
oznaczanych alkoholi. Porównując wydajność ekstrakcji alkoholi z wykorzystaniem włókna typu poli([ViHIM][Cl]) z wydajnością ekstrakcji otrzymaną przy użyciu włókna pokrytego fazą stacjonarną typu PDMS można zauważyć dużą różnicę. Włókno PDMS (dedykowane do związków niepolarnych) wykazuje dużo niższą wydajność ekstrakcji w stosunku do oznaczanych alkoholi. Porównując odpowiedź detektora w przypadku stosowania włókien PDMS oraz PA można zauważyć, że lepsze rezultaty uzyskiwane są w przypadku stosowania włókna PA (dedykowanego do związków polarnych). Otrzymane rezultaty pozwalają stwierdzić, iż z wykorzystaniem włókna PA otrzymuje się porównywalną wydajność ekstrakcji niektórych alkoholi, jak w przypadku stosowania włókna poli([ViHIM][Cl]).



Rys. 47. Porównanie wydajności ekstrakcji alkoholi za pomocą włókna typu poli([ViHIM][Cl]) z rezultatami otrzymanymi z wykorzystaniem handlowych włókien typu PA i PDMS

8.6.2 Porównanie wydajności ekstrakcji estrów

W przypadku ekstrakcji estrów etylowych najlepsze wyniki otrzymano z wykorzystaniem włókna pokrytego fazą stacjonarną typu poli([ViBHDIM][NTf₂]) (rys. 48). Dla włókna poli([ViHDIM][NTf₂]) (różniącego się w swojej strukturze brakiem benzyłowej grupy funkcyjnej) nie otrzymuje się już tak dobrych rezultatów. Otrzymane rezultaty wykazały jak duże znaczenie ma obecność grupy funkcyjnej w strukturze polimerowej cieczy jonowej. Dane literaturowe dotyczące oznaczania estrów metylowych w winach z wykorzystaniem trzech struktur polimerowych cieczy jonowych o różnej długości łańcucha alkilowego nie wykazały znaczącego wpływu długości podstawnika alkilowego na czułość procedury izolacji i wzbogacania estrów [123]. Drugim pod względem otrzymania stosunkowo dobrej wydajności ekstrakcji estrów okazało się włókno pokryte polimerem typu poli([ViHIM][Cl]). Ponadto zaobserwowano, iż wprowadzanie do struktury kationu podstawnika alkilocyjanowego oraz alkilobenzyłowego nie powoduje zwiększenia wydajności ekstrakcji estrów.

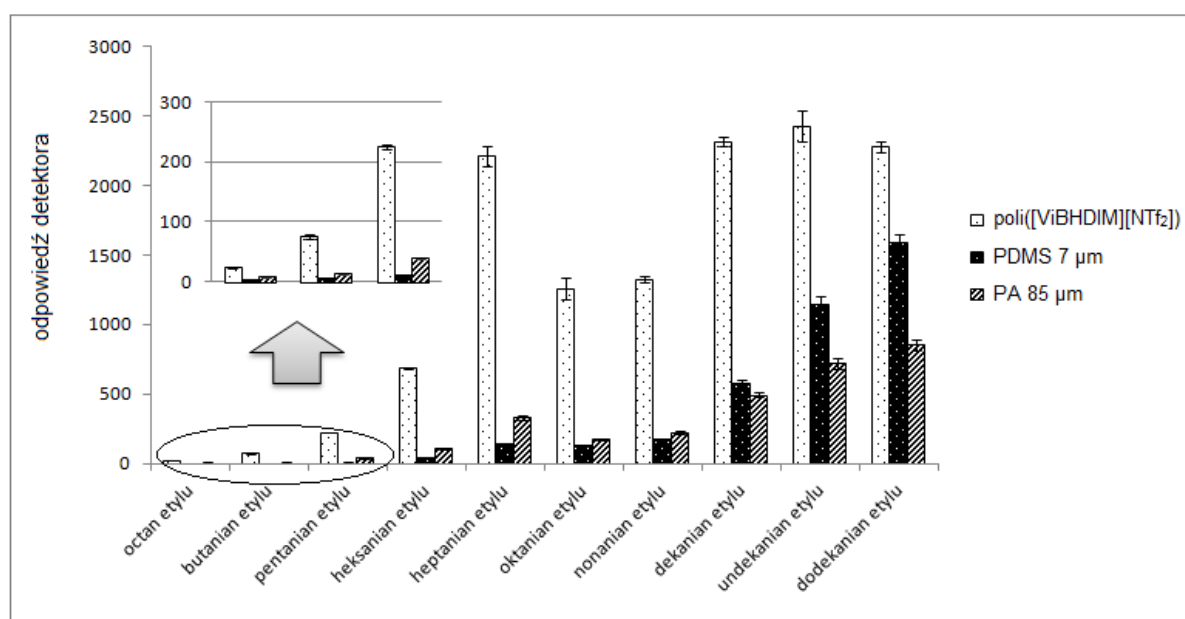


Rys. 48. Wydajność ekstrakcji estrów z zastosowaniem włókien pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi

W wyniku stosowania włókien handlowych wydawać by się mogło, że w przypadku estrów etylowych bardzo dobre rezultaty otrzyma się z wykorzystaniem włókna PDMS. Włókno to tylko w przypadku undekanianu i dodekanianu etylu pozwalało uzyskać lepsze rezultaty niż włókno poli([ViHIM][Cl]), jednakże wciąż niższe od tych otrzymywanych za pomocą włókna poli([ViBHDIM][NTf₂]) (rys. 49). Może to wynikać z małej grubości fazy

stacjonarnej włókna PDMS. Pozostałe włókna nie pozwalały uzyskać już tak zadowalających wyników. Najgorsze rezultaty otrzymywano, szczególnie dla wyższych estrów w przypadku stosowania handlowego włókna typu PA.

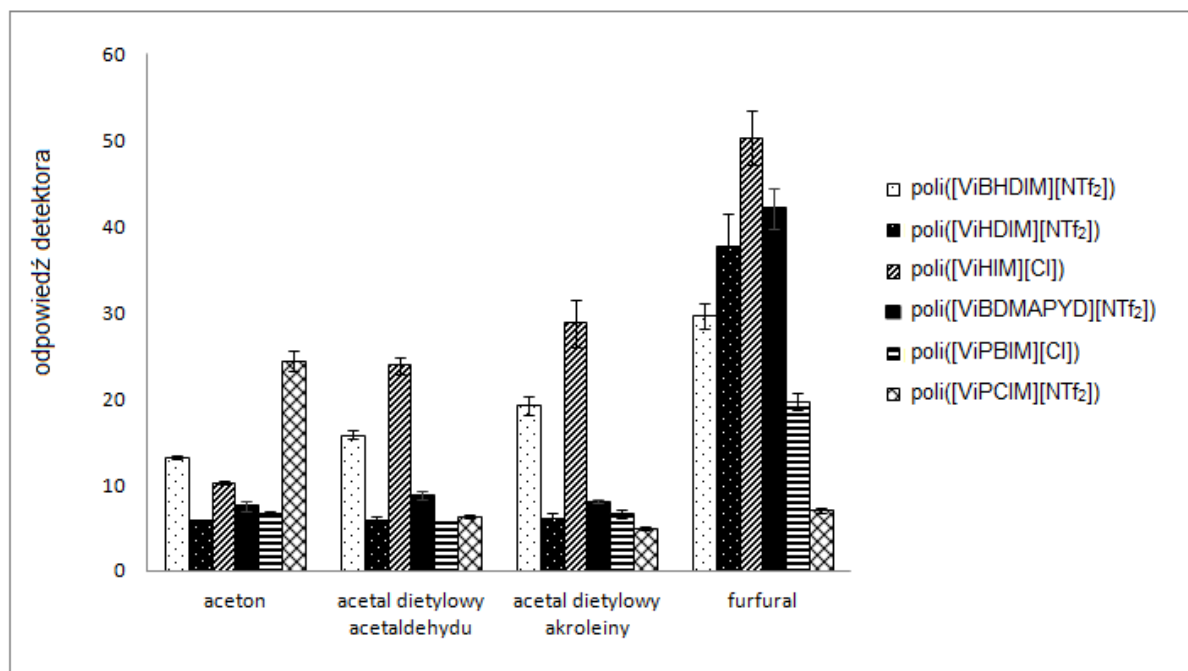
Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, iż najmniejszą wydajność ekstrakcji dla wszystkich ośmiu włókien obserwowano dla krótkołańcuchowych estrów (C2, C4, C5), natomiast wyższe estry (szczególnie C8-C12, których stężenie w roztworze podstawowym było 10 razy niższe niż innych związków) ekstrahowano z największą wydajnością.



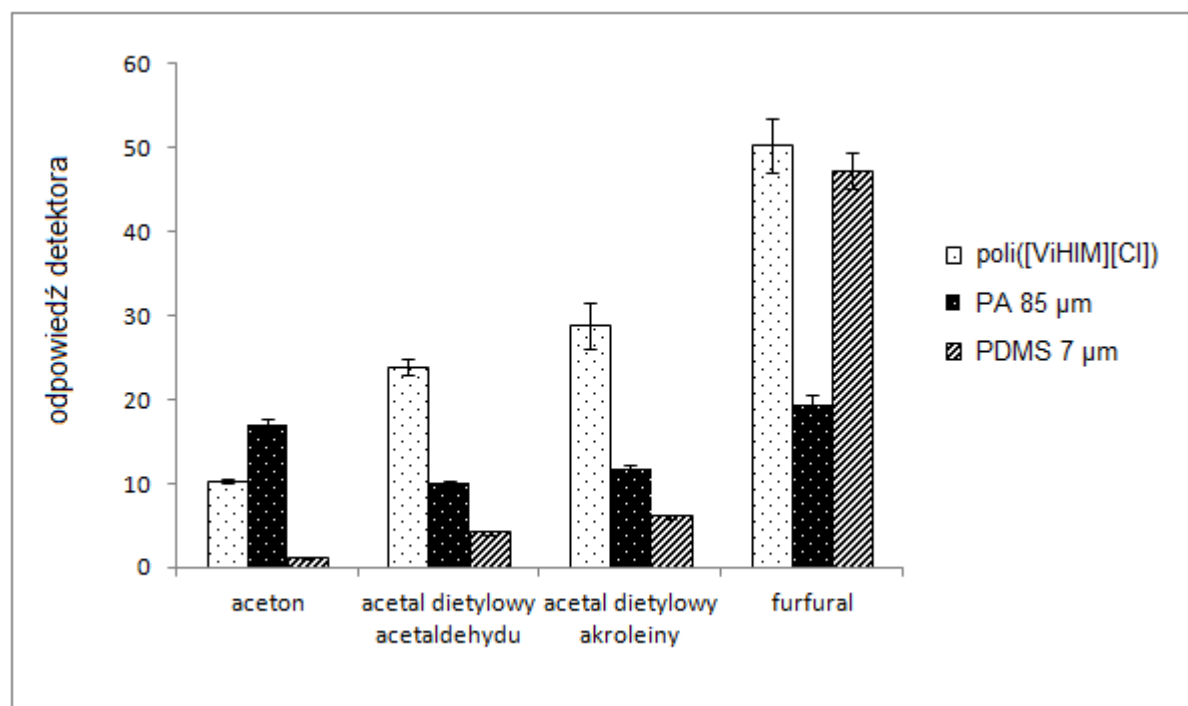
Rys. 49. Porównanie wydajności ekstrakcji estrów za pomocą włókna typu poli([ViBHDIM][NTf₂]) z rezultatami otrzymanymi z wykorzystaniem handlowych włókien typu PA i PDMS

8.6.3 Porównanie wydajności ekstrakcji związków karbonylowych

Ostatnią grupę analizowanych związków stanowiły związki karbonyłowe. Spośród wszystkich wybranych związków karbonylowych, furfural był izolowany z próbek z największą wydajnością stosując włókno typu poli([ViHIM][Cl]). Wydajności ekstrakcji tego związku uzyskane z wykorzystaniem włókien pokrytych poli([ViBHDIM][NTf₂]), poli([ViHDIM][NTf₂]), poli([ViBDMAPYD][NTf₂]) oraz PDMS były nieco niższe. W przypadku ekstrakcji acetalu najlepsze rezultaty otrzymano w dzięki zastosowaniu włókna typu poli([ViHIM][Cl]). Następne w kolejności najwyższej wydajności ekstrakcji było włókno z fazą stacjonarną typu poli([ViBHDIM][NTf₂]). Jedynie w przypadku acetonu największe powinowactwo wykazywało włókno poli([ViPCIM][NTf₂]) zawierające w swojej strukturze grupę alkilocyjanową.



Rys. 50. Wydajność ekstrakcji związków karbonylowych z zastosowaniem włókien pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi

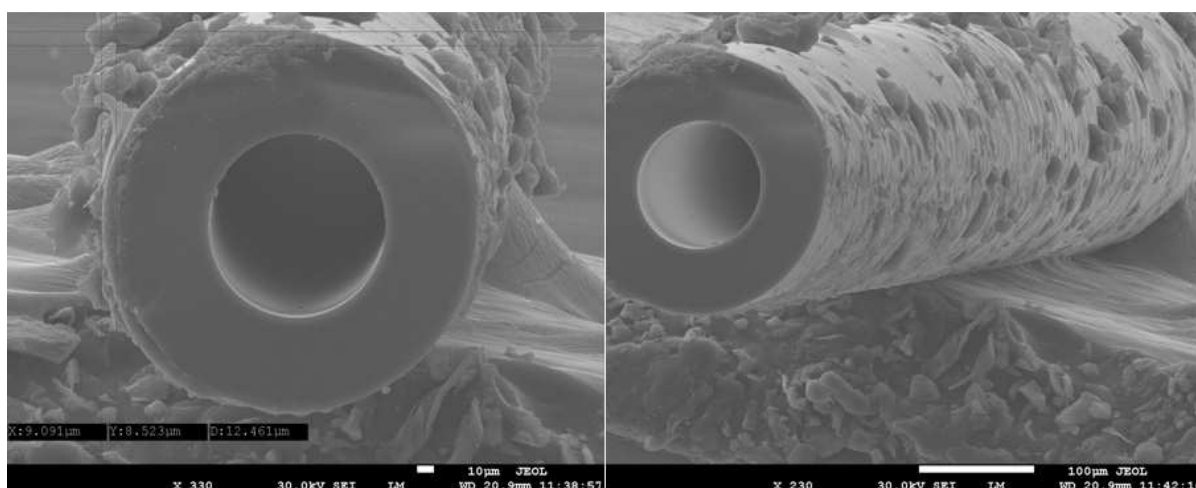


Rys. 51. Porównanie wydajności ekstrakcji związków karbonylowych za pomocą włókna typu poli([ViHIM][Cl]) z rezultatami otrzymanymi z wykorzystaniem handlowych włókien typu PA i PDMS

8.6.4 Określenie wybranych parametrów walidacyjnych

W wyniku przeprowadzonych badań do ekstrakcji wszystkich grup analitów włókno typu poli([ViBHDIM][NTf₂]) wydaje się być najlepszym rozwiązaniem. Dla tego włókna obliczono granice wykrywalności stosując zoptymalizowaną procedurę ekstrakcji. Natomiast dla włókna pokrytego sorbentem typu poli([ViHIM][Cl]) granice oznaczalności zostały obliczone w warunkach izolacji i wzbogacania przedstawionych w tabeli 27. Do obliczenia granic wykrywalności (LOD) korzystano z procedury opisanej w punkcie 6.2 (str. 69). Ponadto dla wszystkich włókien obliczono współczynniki zmienności na podstawie 10 powtórzeń próbek o jednakowym stężeniu analitów (pięciu w przypadku włókna poli([ViPBIM][Cl])). Zestawienie otrzymanych wyników przedstawiono w tabelach 28 i 29. Otrzymane współczynniki zmienności mieszczą się zazwyczaj w granicy 10 %, jedynie dla włókna pokrytego poli([ViHDIM][NTf₂]) są one większe (nawet do ~17 %). Otrzymane rezultaty wskazują, że ekstrakcja analitów z wykorzystaniem większości włókien pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi charakteryzuje zadowalająca powtarzalność.

W przypadku porównania granic wykrywalności oznaczanych związków, z wykorzystaniem włókien PIL wykazujących najlepszą wydajność ekstrakcji (włókna typu poli([ViBHDIM][NTf₂]) oraz poli([ViHIM][Cl])), z granicami wykrywalności wybranych analitów z zastosowaniem handlowych włókien można stwierdzić, iż otrzymane wyniki są zadowalające, zważywszy na fakt, że grubość fazy stacjonarnej włókna ekstrakcyjnego PIL-SPME waha się w granicach 12-16 μm (rys. 52).



Rys. 52. Zdjęcie wykonane techniką SEM włókna typu poli([ViBHDIM][NTf₂])

Grubość powłoki sorpcyjnej dla porównanych w tabeli 29 włókien handlowych typu PDMS oraz PA wynosi odpowiednio 100 μm oraz 85 μm . Oczekiwać by można, że zwiększenie grubości powłoki sorpcyjnej włókien pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi pozwoliłoby na obniżenie granic wykrywalności całej procedury.

Podsumowując, włókna pokryte polimerowymi cieczami jonowymi wykazują bardzo duży potencjał. Wszystkie badane włókna charakteryzują się dobrą stabilnością termiczną i długim czasem życia (ok. 80 powtórzeń). Zastosowanie polimerowych cieczy jonowych jako fazy stacjonarnej w technice SPME pozwoliło na znaczne zmniejszenie wartości LOD w stosunku do bezpośredniego dozowania nierozcieńczonej 90 % próbki alkoholu etylowego oraz uzyskanie porównywalnych wyników otrzymywanych z wykorzystaniem włókien komercyjnych.

Tab. 28. Współczynniki zmienności otrzymane dla poszczególnych włókien pokrytych polimerowymi cieczami jonowymi

Nazwa związku	Faza stacjonarna włókna ekstrakcyjnego					
	poli([ViBHDIM][NTf ₂])	poli([ViHDIM][NTf ₂])	poli([ViHIM][Cl])	poli([ViBDMAPYD][NTf ₂])	poli([ViPBIM][Cl])	poli([ViPCIM][NTf ₂])
CV [%]						
ESTRY						
octan etylu	3,49	1,28	5,9	6,7	5,18	3,36
butanian etylu	4,28	3,77	12,41	7,23	1,47	4,52
pentanian etylu	1,36	7,16	3,71	4,58	5,7	3,77
heksanian etylu	1,21	4,52	2,53	2,1	2,46	2,85
heptanian etylu	3,25	1,62	3,62	6,66	3,99	5,03
oktanian etylu	6,19	10,71	9,51	6,24	1,35	3,48
nonanian etylu	1,93	17,47	6,11	5,17	1,48	4,21
dekanian etylu	1,25	2,05	2,76	7,83	2,95	2,71
undekanian etylu	4,61	5,17	2,41	4,93	1,63	3,12
dodekanian etylu	1,78	13,98	6,25	2,71	3,47	3,42
ALKOHOLE						
metanol	4,62	1,79	3,73	5,85	5,41	7,54
butan-2-ol	1,99	4,52	7,04	5,7	3,08	8,02
propan-1-ol	5,41	11,57	4,59	5,93	3,82	6,05
2-metylopropanol	0,88	3,49	3,41	6,64	3,04	2,37
butan-1-ol	3,65	13,97	4,58	6,47	2,48	4,21

Tab. 28. Ciąg dalszy

Nazwa związku	Faza stacjonarna włókna ekstrakcyjnego					
	poli([ViBHDIM][NTf ₂])	poli([ViHDIM][NTf ₂])	poli([ViHIM][Cl])	poli([ViBDMAPYD][NTf ₂])	poli([ViPBIM][Cl])	poli([ViPCIM][NTf ₂])
CV [%]						
ALKOHOLE						
2-metylobutanol	3,41	14,04	11,49	9,01	4,16	6,3
3-metylobutanol	5,41	14,64	6,8	5,59	3,41	2,25
pentan-1-ol	4,99	9,24	2,89	4,71	6,26	3,24
ZWIĄZKI KARBONYLOWE						
aceton	1,27	3,28	3,74	8,44	6,59	5,55
acetal dietylowy acetaldehydu	3,08	7,2	4,14	16,2	4,71	2,35
acetal dietylowy akroleiny	5,36	9,27	9,58	3,78	6,39	2,91
furfural	4,92	10,31	6,26	11,58	7,11	3,38

Tab. 29. Porównanie granic wykrywalności oznaczanych związków otrzymanych z użyciem włókna typu poli([ViBHDIM][NTf₂]) oraz poli([ViHIM][Cl]) z wartościami literaturowymi otrzymanymi dla włókien komercyjnych i metody bezpośredniego dozowania [42, 45, 155]

Lp.	Nazwa związku	HS-SPME				GC-FID
		poly([ViBHDIM][NTf ₂])	poli([ViHIM][Cl])	PDMS 100 μm	PA 85 μm	
LOD [μg/dm ³]						
ALKOHOLE						
E1	metanol	70,8	250	b.d.	b.d.	2000
E2	butan-2-ol	109,3	69,5	b.d.	b.d.	b.d.
E3	propan-1-ol	66	35,01	b.d.	20	1000
E4	2-metylopropano	26,3	14,06	b.d.	10	1000
E5	butan-1-ol	36,8	17	b.d.	5	1000
E6	2-methylbutanol	32	21,46	b.d.	3	b.d.
E7	3-methylbutanol	35	22,52	b.d.	b.d.	b.d.
E8	pentan-1-ol	63,3	34,88	b.d.	b.d.	1000
ESTRY						
E9	octan etylu	42,2	62,24	26,8	26	b.d.
E10	butanian etylu	21,5	43,95	3,09	b.d.	b.d.
E11	pentanian etylu	6,6	15,85	0,979	b.d.	b.d.
E12	heksanian etylu	10,21	24,26	6,68	2	1000
E13	heptanian etylu	0,1	0,27	0,054	2	1000
E14	oktanian etylu	2,49	8,57	1,44	b.d.	b.d.

b.d. – brak danych

Tab. 29. Ciąg dalszy

Lp.	Nazwa związku	HS-SPME				GC-FID
		poly([ViBHDIM][NTf ₂])	poli([ViHIM][Cl])	PDMS 100 μm	PA 85 μm	
LOD [μg/dm ³]						
ESTRY						
E15	nonanian etylu	0,39	1,39	0,269	b.d.	b.d.
E16	dekanian etylu	1,39	4,45	0,55	b.d.	1000
E17	undekanian etylu	0,046	0,11	0,047	b.d.	b.d.
E18	dodekanian etylu	3,23	5,83	2,79	b.d.	b.d.
ZWIĄZKI KARBONYLOWE						
E19	aceton	61,3	13,22	b.d.	b.d.	b.d.
E20	acetal dietylowy acetaldehydu	146,2	15,79	b.d.	b.d.	b.d.
E21	acetal dietylowy akroleiny	73,7	19,24	b.d.	b.d.	b.d.
E22	furfural	111	29,7	b.d.	b.d.	2000

b.d. – brak danych

8.6.5 Oszacowanie wpływu grubości fazy stacjonarnej na wydajność ekstrakcji analitów

Z uwagi na fakt, iż w poprzednim paragrafie stwierdzono, że zwiększenie grubości powłoki włókna typu PIL-SPME mogłoby spowodować obniżenie wartości LOD dla opracowanej procedury, w celu uzasadnienia postawionej hipotezy postanowiono przedstawić zmianę wartości granic wykrywalności estrów etylowych wraz ze zmianą grubości powłoki sorpcyjnej. W celu ustalenia rzeczywistego wpływu grubości powłoki na zmianę wartości granic oznaczalności procedury, dla wszystkich analizowanych próbek stosowano takie same warunki ekstrakcji i wzbogacania analitów. Stosowane parametry ekstrakcji były tożsame z warunkami, wykorzystywanymi podczas oznaczania estrów etylowych w destylatach rolniczych (tab. 12 str. 61, rys. 15 str. 60). Przeprowadzone doświadczenie wykazało, iż wraz ze wzrostem grubości fazy stacjonarnej oznaczanych estrów z 7 μm do 100 μm następuje co najmniej kilkukrotny spadek wartości granicy wykrywalności procedury (tab. 30). Badania innych autorów również wykazują znaczny spadek wartości granicy wykrywalności wraz ze wzrostem grubości filmu fazy stacjonarnej włókna ekstrakcyjnego. W przypadku oznaczeń estrów metylowych z wykorzystaniem włókna PDMS o grubości 7 μm i 100 μm , wykazano ok. 20-krotne zwiększenie czułości procedury [123]. Jeszcze inni autorzy wykazali ponad 2-krotny wzrost czułości procedury oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) oraz fenoli wraz ze wzrostem grubości fazy sorpcyjnej typu PDMS z 30 μm do 100 μm [122]. Mając na uwadze badania własne oraz dokonania innych autorów dotyczące wpływu grubości fazy sorpcyjnej włókna ekstrakcyjnego na czułość procedury wysunięto hipotezę, iż nałożenie na włókno grubszego filmu polimerowej cieczy jonowej spowoduje wzrost czułości opracowanej procedury analitycznej.

Tab. 30. Porównanie granic wykrywalności estrów etylowych otrzymanych z wykorzystaniem włókien PDMS o różnej grubości fazy sorpcyjnej

Nazwa związku	LOD [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]		
	7 μm	30 μm	100 μm
octan etylu	69,52	44,19	26,80
propionian etylu	30,12	18,90	8,60
butanian etylu	29,16	8,78	3,09
pentanian etylu	4,31	2,62	0,80
heksanian etylu	25,12	15,01	6,68
heptanian etylu	0,33	0,15	0,05
oktanian etylu	7,58	3,47	1,44
nonanian etylu	2,73	1,32	0,27
dekanian etylu	2,78	2,28	0,55
undekanian etylu	0,27	0,18	0,05
dodekanian etylu	14,49	12,58	2,79

Podsumowując, przeprowadzone badania potwierdzają, że niewielkie zmiany w strukturze PIL (zmiana anionu lub dodanie podstawnika) mogą znacznie zmienić (poprawić, bądź pogorszyć) efektywność ekstrakcji wybranych grup analitów. Cecha ta sprawia, że sorbenty z polimerowych cieczy jonowych mogą być projektowane, tak aby uzyskać specyficzne oddziaływania między analitem, a fazą stacjonarną włókna ekstrakcyjnego.

9 PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie nowych oraz implementacja już istniejących instrumentalnych metod analitycznych umożliwiających kompleksową charakterystykę produktów spirytusowych. Prace badawcze podjęte w trakcie realizacji badań obejmowały:

- opracowanie metody, która pozwoliłaby na podstawie określenia składu produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej, wskazać pochodzenie botaniczne analizowanego destylatu rolniczego,
- określenie składu oraz wpływu poszczególnych związków karbonylowych na jakość wódek czystych,
- opracowanie czulej metody, wykorzystującej włókna ekstrakcyjne (SPME) ze związaną fazą stacjonarną typu polimerowe ciecze jonowe, do oznaczania w produktach spirytusowych, wybranych zanieczyszczeń powstających w procesie produkcji napojów alkoholowych.

W trakcie realizowania badań niniejszej rozprawy doktorskiej zastosowano wspomnianą technikę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) jako technikę izolacji i wzbogacania analitów z próbek (poprzedzoną derywatyzacją analitów w przypadku oznaczania związków karbonylowych) w połączeniu z kapilarną chromatografią gazową (GC) sprzężoną ze spektrometrem mas (MS), detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) bądź też detektorem wychwytu elektronów (ECD).

Zamierzone cele badawcze osiągnięto stosując:

- w przypadku destylatów rolniczych różnego pochodzenia botanicznego
 - metody wstępnej analizy (określanie parametrów sumarycznych, analiza sensoryczna),
 - metodę oznaczania estrów etylowych techniką HS-SPME/GC-FID,
 - metodę bezpośredniej analizy GC-FID składu związków zanieczyszczających destylaty rolnicze,
 - metodę analizy składu frakcji lotnej techniką HS-SPME/GC-MS.

Określenie zależności pomiędzy składem jakościowym i ilościowym fermentacyjnych produktów ubocznych, a pochodzeniem surowcowym (pszenica, pszenżyto, żyto, kukurydza)

analizowanych destylatów rolniczych przeprowadzono stosując chemometryczną interpretację wyników, tj. analizę dyskryminacyjną oraz metodę samoorganizującego odwzorowania cech (SOM).

- w przypadku oznaczania składu związków karbonylowych w wódkach czystych
 - analizę sensoryczną,
 - technikę HS-SPME/GC-ECD poprzedzoną etapem derywatywacji oznaczanych związków z wykorzystaniem odczynnika derywatyzującego PFBHA.

Określenie zależności pomiędzy jakością analizowanych wódek czystych, a składem związków karbonylowych wraz z porównaniem tych wartości ze wzorcem sensorycznym przeprowadzono z wykorzystaniem metody samoorganizującego odwzorowania cech (SOM).

- w przypadku zastosowania polimerowych cieczy jonowych w SPME do izolacji i wzbogacania wybranych zanieczyszczeń
 - technikę HS-SPME/GC-FID.

W trakcie realizacji opracowywania procedur analitycznych dobrano również warunki izolacji i wzbogacania oraz selektywnego rozdzielania związków w układzie chromatograficznym jak również określono wybrane parametry walidacyjne stosowanych procedur.

Do najważniejszych wniosków wpływających z przeprowadzonych badań należą:

- w odniesieniu do analizy destylatów rolniczych
 - oznaczanie estrów etylowych wykazało, iż istnieje możliwość sklasyfikowania wszystkich destylatów w dwie grupy. Pierwszą stanowią destylaty produkowane z kukurydzy i pszenicy, a drugą destylaty wyprodukowane z pszenżyta i żyta. Destylaty pierwszej grupy charakteryzują się wysoką zawartością zawartością octanu etylu (C2), propionianu etylu (C3), pentanianu etylu (C5), heksanianu etylu (C6), heptanianu etylu (C7) oraz oktanian etylu (C8), podczas gdy destylaty drugiej grupy charakteryzują się wysoką zawartością nonanianu etylu (C9), undekanianu etylu (C11) oraz dodekanianu etylu (C12),
 - oznaczanie głównych produktów ubocznych procesu fermentacji z zastosowaniem układu GC-FID pozwoliło, na podstawie funkcji dyskryminacyjnych określonych przez wybrane związki markerowe (propanol,

acetal dietylowy acetaldehydu, etanolan 3-metylobutyłu, metanol, prop-2-enal oraz aceton), na bardzo dobre rozróżnienie destylatów wyprodukowanych z pszenicy oraz stosunkowo dobre rozróżnienie destylatów wyprodukowanych z kukurydzy i żyta. Natomiast destylaty rolnicze wyprodukowane z pszenżyta to grupa najtrudniejsza do rozróżnienia. Na mapie analizy dyskryminacyjnej destylaty te położone są w bliskim sąsiedztwie destylatów wyprodukowanych z żyta. Może to wynikać z faktu, iż pszenżyto jest hybrydą, powstałą ze skrzyżowania żyta i pszenicy, zatem o cechach wspólnych obu tych zbóż,

- oznaczanie składu frakcji lotnej destylatów rolniczych techniką HS-SPME/GC-MS pozwoliło stwierdzić, że:
 - destylaty rolnicze wyprodukowane z pszenicy charakteryzują się najbardziej zróżnicowanym profilem związków lotnych, podczas gdy destylaty wyprodukowane z kukurydzy charakteryzują się najbardziej ubogim profilem ubocznych związków procesu fermentacji alkoholowej,
 - destylaty rolnicze wyprodukowane z kukurydzy zawierają najwięcej estrów, zarówno pod względem różnorodności jak i poziomów na jakich występują. W pozostałych grupach destylatów estry występują na porównywalnym poziomie (ok. 70 %). Jednocześnie można zauważyć, że lotna frakcja destylatów kukurydzianych jest uboga w alkohole wyższe, co wynikać może z genezy powstawania estrów,
 - na podstawie przeprowadzonej analizy dyskryminacyjnej (z wykorzystaniem zmiennych: 2-metylobutanol + 3-metylobutanol, heksanian 3-metylobutyłu, dodekarian etylu, heptanian etylu oraz oktanian 3-metylobutyłu) istnieje możliwość rozróżnienia destylatów rolniczych wyprodukowanych z pszenżyta oraz destylatów wyprodukowanych z pszenicy,
- zaproponowane podejście wykorzystania instrumentalnych technik analitycznych wraz z chemometryczną obróbką wyników może zostać zastosowane do rozróżniania pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych oraz w przypadku określenia innej zmiennej grupującej, także do innych celów, np. rozróżniania jakości destylatów rolniczych;

- w odniesieniu do analizy wódek czystych
 - opracowana procedura oznaczania wybranych związków karbonylowych metodą HS-SPME/GC-ECD cechuje się zadowalającą czułością i precyzją,
 - przeprowadzone badania nie wskazują na jednoznaczną zależność pomiędzy stężeniem związków karbonylowych w próbkach, a ich jakością sensoryczną wskazaną przez osoby oceniające. Wskazują natomiast, że niska jakość sensoryczna próbek najgorszej jakości może być do pewnego stopnia wytłumaczona stosunkowo wysokim stężeniem następujących związków: *trans*-non-2-enalu, metnanalu, butano-2,3-dionu oraz pentano-2,3-dionu;
- w odniesieniu do procedury PIL-SPME
 - włókna pokryte polimerowymi cieczami jonowymi wykazują bardzo duży potencjał ekstrakcyjny. Ich zastosowanie w technice SPME pozwoliło na znaczne zmniejszenie wartości LOD w stosunku do bezpośredniego dozowania nierozcieńczonych 90 % próbek alkoholu etylowego oraz uzyskanie porównywalnych wyników otrzymywanych z wykorzystaniem włókien komercyjnych,
 - przeprowadzone badania potwierdzają, że niewielkie zmiany w strukturze PIL (zmiana anionu lub dodanie podstawnika) mogą znacznie zmienić (poprawić bądź pogorszyć) efektywność ekstrakcji wybranych grup analitów. Cecha ta sprawia, że sorbenty z polimerowych cieczy jonowych mogą być projektowane do uzyskania specyficznych oddziaływań między analitem, a fazą stacjonarną włókna ekstrakcyjnego,
 - wraz ze wzrostem grubości fazy stacjonarnej polimerowej cieczy jonowej można spodziewać się wzrostu czułości procedury. Hipoteza ta została potwierdzona poprzez określenie wpływu grubości powłoki włókna PDMS (7 μm , 30 μm oraz 100 μm) na wartość LOD. Wykazano, że wzrost grubości powłoki sorpcyjnej powoduje kilkukrotne zwiększenie czułości procedury,
 - do ekstrakcji wszystkich grup analitów włókno SPME pokryte fazą stacjonarną typu poli([ViBHDIM][NTf₂]) wydaje się być najlepszym rozwiązaniem. Faza stacjonarna tego włókna wykazuje wysoką selektywność ekstrakcji w stosunku do wszystkich grup oznaczanych związków. Włókno pokryte polimerem typu poli([ViHIM][Cl]) wykazuje natomiast bardzo dobrą wydajność ekstrakcji w stosunku do alkoholi.

STRESZCZENIE

Zasadniczym celem pracy było opracowanie nowych i implementacja istniejących już instrumentalnych metod analitycznych do kompleksowej analizy produktów spirytusowych. W ramach realizowanych zadań należy wyróżnić opracowanie metody umożliwiającej rozróżnianie pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych, oznaczanie związków karbonylowych w wódkach czystych wraz z określeniem ich wpływu na jakość sensoryczną tych produktów, jak również możliwości wykorzystania polimerowych cieczy jonowych w SPME do oznaczania wybranych produktów fermentacji alkoholowej w matrycy alkoholowej.

W pierwszym etapie badań, w celu znalezienia wyróżników destylatów rolniczych produkowanych z żyta, pszenżyta, pszenicy oraz kukurydzy, wykorzystano trzy procedury analityczne: analizę profili estrów etylowych z wykorzystaniem procedury HS-SPME/GC-FID, analizę ilościową i jakościową destylatów rolniczych z wykorzystaniem procedury bezpośredniego dozowania GC-FID oraz metodę analizy składu lotnej frakcji destylatów rolniczych stosując procedurę HS-SPME/GC-MS. Drugim etapem badań była ilościowa analiza składu wybranych związków karbonylowych metodą HS-SPME/GC-ECD poprzedzoną derywatyzacją z wykorzystaniem odczynnika derywatyzującego PFBHA oraz korelacja otrzymanych wyników z przeprowadzoną analizą sensoryczną badanych próbek. W trzecim etapie przedstawiono koncepcję wykorzystania włókien sorpcyjnych SPME ze związaną fazą stacjonarną typu polimerowe cieczy jonowe do oznaczania produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej w półproduktach i produktach alkoholowych z zastosowaniem układu HS-SPME/GC-FID. Dla opracowanych procedur wyznaczono wybrane parametry walidacyjne. Z kolei zależności pomiędzy próbkami zostały określone na podstawie chemometrycznej obróbki wyników (analiza dyskryminacyjna oraz metoda samoorganizujących się map).

Na podstawie przeprowadzonych badań dokonano pełnej charakterystyki destylatów rolniczych wyprodukowanych z różnych surowców, jak również określono potencjalne związki wskazujące na ich pochodzenie surowcowe. Wytypowano również związki mogące być przyczyną pogorszenia jakości wódek czystych oraz wykazano potencjał i zalety stosowania polimerowych cieczy jonowych jako selektywnych i wysoce wydajnych sorbentów w SPME. Szacuje się, że przedstawione w niniejszej rozprawie podejście analityczne pozwoli zapewnić kompleksową charakterystykę produktów spirytusowych na każdym etapie procesu produkcyjnego, a tym samym zapewni lepszą niż dotychczas kontrolę jakości.

ABSTRACT

The main objective of this study was development of new and application of already existing instrumental analytical methods for comprehensive analysis of spirits products. Performed research concerned three fundamental aspects: development a method for discrimination of botanical origin of raw spirits, analysis of selected carbonyl compounds in unflavored vodkas and description of their impact on sensory quality of these products, as well as the possibility of application of polymeric ionic liquids in SPME for the determination of selected by-products in ethanol matrix.

In the first stage of the research, the aim was to find potential markers of raw spirits produced from rye, triticale, wheat and maize with the use of three analytical procedures: analysis of ethyl esters profiles using HS-SPME/GC-FID method, quantitative and qualitative analysis of major by-products in agricultural distillates using direct injection GC-FID method and finally volatile fraction composition with using HS-SPME/GC-MS. The second analytical problem comprised quantitative analysis of selected carbonyl compounds in unflavored vodkas by HS-SPME/GC-ECD preceded by derivatization with the use of PFBHA reagent and the correlation of the obtained results with the sensory analysis of each sample. The third aspect of performed research is related with the concept of the use of SPME fibers coated with polymeric ionic liquids stationary phases for the determination of selected alcoholic fermentation by-products in semi-products and alcoholic beverages with the use of HS-SPME/GC-FID method. For the developed procedures selected validation parameters were established. Moreover, for understanding specific relationships occurring between composition of fermentation by-products in the group of samples, the chemometric data interpretation was applied.

On the basis of performed studies comprehensive characterization of agricultural distillates obtained from different raw materials was possible. Furthermore, indication of potential botanical origin markers, as well as compounds with possible influence on decreasing the quality of unflavored vodka, was possible. Additionally, the presented research indicated the possibility and advantages of using polymeric ionic liquids as selective and highly efficient sorbents in SPME for isolation and preconcentration of selected esters, alcohols and carbonyl compounds. It can be estimated that proposed methods and analytical approach can provide a thorough characteristic of spirits products at every stage of their manufacturing process thereby allow for better quality control.

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje wydane

1. **Biernacka P.**, Wardencki W. (2012) Polimerowe cieczki jonowe – sorbenty nowej generacji w SPME, *Analityka – Nauka i praktyka*, 1, 4-8,
2. **Biernacka P.** (2011) Wpływ jakości powietrza na jakość życia i zdrowie człowieka, *Jakość Powietrza a Jakość Życia*, 6-7, 2011,
3. Gębicki J., **Biernacka P.**, Ludkiewicz T. (2011) Wardencki W., Szacowanie zawartości benzo(a)pirenu w pyłe zawieszonym PM₁₀ przy pomocy wielowymiarowej regresji liniowej, *Jakość Powietrza a Jakość Życia*, 51-57,
4. Dymerski T., Chmiel T., **Biernacka P.**, Fijałło C. (2011) Quality assurance of alcoholic beverages by electronic nose, *Proceedings of 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, 1, 131-135,
5. Chmiel T., Dymerski T., **Biernacka P.** (2011) Comprehensive two-dimensional gas chromatography – promising technique for analysis of complex food matrices, *Proceedings of 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, 1, 69-76,
6. **Biernacka P.**, Chmiel T., Dymerski T. (2011) Determination of some off-flavors for vodka quality assessment, *Proceedings of 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, 1, 49-51,
7. **Biernacka P.**, Chmiel T., Dymerski T. (2011) Raw material influence on volatile composition of agricultural distillates, *Proceedings of 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, 1, 46-48,
8. **Biernacka P.**, Bielicka M., Więclawska M., Jankowiak I. (2011) Sample preparation methods used in food flavor analysis, *Proceedings of 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, 1, 38-45,
9. **Biernacka P.**, Chmiel T., Dymerski T., Wardencki W. (2011) Metody analizy zapachu *Analityka – Nauka i praktyka*, 1, 40-46,

10. Plutowska B., **Biernacka P.**, Wardencki W. (2010) Identification of volatile compounds in raw spirits of different organoleptic quality, *Journal of the Institute of Brewing*, 116 (4), 433-439,
11. Chmiel T., Dymerski T., **Biernacka P.**, Wardencki W. (2010) SAFE – nowoczesna, alternatywna technika izolacji związków zapachowych z próbek żywności, *Analityka – nauka i praktyka*, 4, 20-25,
12. Wardencki W., **Biernacka P.**, Chmiel T., Dymerski T. (2009) Instrumental techniques used for assessment of food quality, *Proceedings of ECOpole*, 3 (2), 1-8,
13. **Biernacka P.**, Plutowska B., Wardencki W. (2009) Geosmin, dimethyl trisulfide and 2-and 3-methyl-1-butanol influence on raw spirit quality, *Nauka Przyroda Technologie*, 3 (4), 1-11,
14. Wardencki W., Chmiel T., Dymerski T., **Biernacka P.**, Plutowska B. (2009) Application of gas chromatography, mass spectrometry and olfactometry for quality assessment of selected food products, *Ecological Chemistry and Engineering S*, 16 (3), 287-300.

Publikacje objęte procesem redakcyjnym

1. **Biernacka P.**, Wardencki W., Namieśnik J. (2012) Ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego (SBSE), *Analityka - Nauka i praktyka* (w druku),
2. Gromadzka J., **Biernacka P.**, Namieśnik J. (2012) 3-monochloro-1,2-propanodiol w produktach żywnościowych – wyzwania i problemy analityczne, *Analityka – Nauka i praktyka* (w druku),
3. **Biernacka P.**, Wardencki W., Tsakovski S., Ethyl esters profiles of raw spirits of different botanical origin, *Analytica Chimica Acta* (wysłano do redakcji),
4. **Biernacka P.**, Wardencki W., Volatile composition of raw spirits of different botanical origin, *Journal of the Institute of Brewing* (wysłano do redakcji),
5. **Biernacka P.**, Wasielewska M., Wardencki W., Zygmunt B., Anderson J. L., Determination of several pollutants in water and ethanol matrix using polymeric ionic liquid coated SPME fibers as a isolation and preconcentration step - *Journal of chromatography A* (w przygotowaniu),
6. Chmiel T., Dymerski T., **Biernacka P.**, Kupska M., Namieśnik J., Górecki T., Comprehensive two-dimensional gas chromatography in food and environmental analysis - *Chemical Reviews* (w przygotowaniu),

7. Gębicki J., **Biernacka P.**, Ludkiewicz T., Wardencki W., Analysis of major factors affecting the benzo(a)pyrene concentration in particular matter PM₁₀ - *Environmental Pollution* (w przygotowaniu),

Wystąpienia opublikowane w materiałach konferencyjnych

o Prezentacje ustne

1. Chmiel T., Dymerski T., **Biernacka P.**, Wardencki W. Kompletna dwuwymiarowa chromatografia gazowa - użyteczna technika w analityce żywności, IX Konferencja Chromatograficzna: "Chromatografia? To przecież codzienność!" (26-29.06.2011) Poznań, Polska,
2. **Biernacka P.**, Opracowanie instrumentalnych metod rozróżniania pochodzenia destylatów rolniczych i określania jakości wódek czystych, *Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej* (22-23.09.2011) Gdańsk, Polska,
3. Wardencki W., **Biernacka P.**, Identification of volatile composition of raw spirits produced from rye, corn, wheat and triticale, *7th International Conference IMA 2011- Instrumental Methods of Analysis - Modern Trends and Applications* (18-22.09.2011) Chania, Crete, Grecja,
4. Bielicka M., **Biernacka P.**, Więclawska M., Jankowiak I., Sample preparation methods used in food flavor analysis, *14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers Advances in Chemical and Mechanical Engineering* (05-07.05.2011) Gdańsk, Polska,
5. **Biernacka P.**, Chmiel T., Dymerski T., Raw material influence on volatile composition of agricultural distillates, *14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers Advances in Chemical and Mechanical Engineering* (05-07.05.2011) Gdańsk, Polska,
6. **Biernacka P.**, Chmiel T., Dymerski T., Determination of some off-flavors for vodka quality assessment, *14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers Advances in Chemical and Mechanical Engineering* (05-07.05.2011) Gdańsk, Polska,

7. Wardencki W., **Biernacka P.**, Volatile composition of raw spirits, *AACD 2010, 7th Aegean Analytical Chemistry Days* (29.09-03.10.2010) Lesvos, Grecja,
8. **Biernacka P.**, Opracowanie instrumentalnych metod oceny jakości i charakterystyki wybranych półproduktów i produktów alkoholowych, *Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej* (27-28.09.2010) Gdańsk, Polska,
9. **Biernacka P.**, Wardencki W., Analysis of volatile by-products in agricultural distillates - the way for discrimination of raw spirits origin, *Second International Symposium for Young Scientists and Technologists in Malting, Brewing and Distilling* (19-21.05.2010) Freising-Weihenstephan, Niemcy,
10. **Biernacka P.**, Plutowska B., Wardencki W., Identyfikacja wyróżników sensorycznych jakości destylatów rolniczych metodą HS-SPME/GC-O, *Postęp w Wytwarzaniu i Ocenie Żywności: XXXIX Sesja Komitetu Nauk o Żywności Polskiej Akademii Nauk* (29.06-01.07.2009) Poznań, Polska.

o **Prezentacje posterowe**

1. Chmiel T., Dymerski T., **Biernacka P.**, Wardencki W., Bartoszek-Pączkowska A., Mostafa A., Górecki T., Characterization of flavour profile of blue honeysuckle berries, *Euro Food Chem XVI: Translating food chemistry into health benefits* (06-08.07.2011) Gdansk, Polska,
2. **Biernacka P.**, Chmiel T., Dymerski T., Wardencki, Strategy for the identification of key odorants in food, *Euro Food Chem XVI: Translating food chemistry into health benefits* (06-08.07.2011) Gdansk, Polska,
3. Dymerski T., Chmiel T., **Biernacka P.**, Wardencki W., Monitoring of production process, freshness, authentication and shelf-life investigation of foodstuff by electronic nose, *Euro Food Chem XVI: Translating food chemistry into health benefits* (06-08.07.2011) Gdansk, Polska,
4. **Biernacka P.**, Chmiel T., Dymerski T., Wardencki W., Perspektywy wykorzystania mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) w analizie lotnych związków organicznych w powietrzu, *III Pomorska Konferencja z cyklu Jakość Powietrza* (07-08.04.2011) Gdańsk, Polska,

5. Chmiel T., Dymerski T., **Biernacka P.**, Wardencki W., Perspektywy wykorzystania olfaktometrii w pomiarach *in situ*, *III Pomorska Konferencja z cyklu Jakość Powietrza* (07-08.04.2011) Gdańsk, Polska,
6. Dymerski T., Chmiel T., **Biernacka P.**, Wardencki W., Monitoring zanieczyszczeń powietrza przy wykorzystaniu elektronicznego nosa, *III Pomorska Konferencja z cyklu Jakość Powietrza* (07-08.04.2011) Gdańsk, Polska,
7. Fijało C., Chmiel T., Dymerski T., **Biernacka P.**, Europejskie standardy w zakresie ochrony powietrza, *III Pomorska Konferencja z cyklu Jakość Powietrza*, (07-08.04.2011) Gdańsk, Polska,
8. Gębicki J., **Biernacka P.**, Ludkiewicz T., Wardencki W., Analiza czynników wpływających na zawartość benzo(a)piranu w pyle zawieszonym PM₁₀, *III Pomorska Konferencja z cyklu Jakość Powietrza* (07-08.04.2011), Gdańsk, Polska,
9. Heda Ł., **Biernacka P.**, Januszewicz K., Klein M., Łuczak J., Separacja lotnych związków organicznych z fazy gazowej z wykorzystaniem cieczy jonowych, *III Pomorska Konferencja z cyklu Jakość Powietrza* (07-08.04.2011) Gdańsk, Polska,
10. **Biernacka P.**, Wardencki W., Hyphenated techniques application for analysis of taints in alcoholic beverages, *Bioinnovation International Summit* (21-22.10.2010) Gdańsk & Gdynia, Polska,
11. **Biernacka P.**, Wardencki W., Assessment of vodka quality on the basics of carbonyl compounds quantity, AACD 2010, 7th Aegean Analytical Chemistry Days (29.09-03.10.2010) Lesvos, Grecja,
12. **Biernacka P.**, Wardencki W., HS-SPME/GC-ECD analysis of carbonyl compounds in premium and super premium quality vodka, ExTech 2010, 12th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (20-22.09.2010) Poznań, Polska,
13. **Biernacka P.**, Wardencki W., Oznaczanie różnic w składzie produktów ubocznych procesu fermentacji alkoholowej w destylatach rolniczych produkowanych z różnych surowców, *VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej: Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku* (04-09.07.2010) Kraków, Polska,
14. Gromadzka J., **Biernacka P.**, Wardencki W., Zastosowanie promieniowania UV w ocenie stabilności oksydatywnej olejów roślinnych, *VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej: Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku* (04-09.07.2010), Kraków, Polska,

15. **Biernacka P.**, Chromatografia gazowa w analizie półproduktów i produktów spirytusowych, *Politechnika Gdańska - uniwersytet przedsiębiorczy XXI wieku* (24-25.05.2010), Gdańsk, Polska,
16. **Biernacka P.**, Wardencki W., HS-SPME/GC-FID determination of fatty acid ethyl esters in raw spirits samples, 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods 15th International Symposium on Separation Sciences (02-04.09.2009) Siófok, Węgry,
17. **Biernacka P.**, Plutowska B., Wardencki W., Assessors training for finger-span method in olfactometry – some remarks, *Challenges in Food Flavor Analysis: a workshop* (06-07.04.2009) Poznań, Polska,
18. Plutowska B., Wardencki W., **Biernacka P.**, Rytlevska A., Raw spirits aroma analysis using solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry (HS-SPME/GC-O), *New Achievements in Chromatography: 14th International Symposium on Separation Science* (30.09-03.10.2008) Primošten, Chorwacja,
19. Plutowska B., Wardencki W., **Biernacka P.**, Rytlevska A., Analiza destylatów rolniczych z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej z detekcją olfaktometryczną (GC-O), *51 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego* (07-11.09.2008) Opole, Polska.

Wykłady i seminaria

1. **Biernacka P.**, Application of polymeric ionic liquid (PIL) coated SPME fibers for simultaneous evaluation of major alcoholic fermentation by-products Department of Chemistry, The University of Toledo, Toledo, USA (20.09.2011),
2. **Biernacka P.**, Rytlevska A., Plutowska B., Wardencki W., *Identyfikacja wyróżników sensorycznych jakości destylatów rolniczych metodą HS-SPME/GC-O*, Seminarium przemysłowe z Firmą Destylarnia Sobieski S.A. w Starogardzie Gdańskim, Starogard Gdański (27.07.2009),
3. **Biernacka P.**, *Toxicity of alcohols*, Wykład prowadzony w ramach Best Summer Course, C₂H₅OH Mission (04.07.2009),
4. **Biernacka P.**, Wardencki W., *Destylaty rolnicze – osiągnięcia i perspektywy*, Seminarium przemysłowe z Firmą Destylarnia Sobieski S.A. w Starogardzie Gdańskim, Politechnika Gdańska (27.05.2009).

Wdrożenia

1. Metoda oznaczania produktów ubocznych fermentacji alkoholowej w destylatach pochodzenia rolniczego (GC-FID), Dział Zapewnienia Jakości, Destylarnia Sobieski S.A., Starogard Gdański (09.2009),
2. Metoda oznaczania śladowych ilości związków karbonylowych w wódkach czystych i rektyfikatach (HS-SPME/GC-ECD), Dział Zapewnienia Jakości, Destylarnia Sobieski S.A., Starogard Gdański, (02-05.2010).

Nagrody, wyróżnienia, stypendia

1. Stypendium "InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów, II edycja", 1.12.2009-31.07.2010. Stypendium przyznane w ramach Priorytetu VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, działanie 8.2, poddziałanie 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetów samorządów województw,
2. Nagroda za poster prezentowany podczas międzynarodowej konferencji 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 15th International Symposium on Separation Sciences, Siófok, Hungary (02-04.09.2009),
3. Stypendium ufundowane przez Firmę Destylarnia Sobieski S.A. (09.2009),
4. Stypendia za wyróżniający się dorobek naukowy w roku akademickim 2008/2009 oraz 2010/2011,
5. Stypendia umożliwiające udział w międzynarodowych konferencjach przyznane z Własnego Funduszu Stypendialnego Rektora Politechniki Gdańskiej (03.2010 oraz 05.2012),
6. Stypendium umożliwiające udział w międzynarodowej konferencji przyznane przez *Institute of Brewing and Distilling (IBD)*, *the European Brewery Convention (EBC)*, *the German Brewers Association (DBB)* (05.2010),
7. Stypendia przyznane z Własnego Funduszu Stypendialnego Rektora Politechniki Gdańskiej za wyróżniający się dorobek naukowy w roku akademickim 2009/2010 oraz 2010/2011,
8. Stypendia za osiągnięcia naukowe przyznane na okres 01.10.2010-30.07.2011 oraz 01.10.2011-30.07.2012 ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach

- projektu *Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii*, nr umowy POKL.04.01.02-00-368/09 realizowanym przez Politechnikę Gdańską w ramach priorytetu IV Szkolnictwo wyższe i nauka, Działanie 4.1. Wzmocnienie i rozwój potencjału dydaktycznego uczelni oraz zwiększenie liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki opartej na wiedzy. Poddziałanie 4.1.1. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki od 01.10.2009 do 30.09.2015,
9. Stypendium umożliwiające realizację projektu badawczego (Screening of polymeric ionic liquid coated fibers for simultaneous determination of major alcoholic fermentation by-products) w grupie badawczej dr. J. L. Andersona (The University of Toledo, USA) w ramach projektu *Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii*, nr umowy POKL.04.01.02-00-368/09,
 10. Główna nagroda przyznana za najlepszy biznesplan złożony w konkursie Jaskółki Przedsiębiorczości 2010 organizowanym przez Dział Współpracy z Gospodarką Politechniki Gdańskiej. Projekt współfinansowany ze środków Programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego Kreator Innowacyjności - wsparcie innowacyjnej przedsiębiorczości akademickiej,
 11. Nagroda za wystąpienie ustne prezentowane podczas 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers. Advances in Chemical and Mechanical Engineering, Gdańsk, Poland (07.05.2011).

Staże krajowe i zagraniczne

1. Department of Chemistry, University of Toledo, Toledo, Ohio, USA (06-09.2011),
2. Destylarnia Sobieski S.A., Starogard Gdański, Poland (02-05.2010),
3. Destylarnia Sobieski S.A. Starogard Gdański, Poland (09.2009).

LITERATURA

- [1] Anderson P., Baumberg B. (2006) Alcohol in Europe. A public health perspective. A report for the European Commission, Institute of alcohol studies, London.
- [2] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 110/2008 z dnia 15 stycznia 2008 w sprawie definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 1576/89.
- [3] Rozporządzenie (WE) NR 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności.
- [4] Bednarski W., Repsa A. (2003) Biotechnologia żywności, WNT, Warszawa.
- [5] Jarosz K., Łączyński B. (1985) Poradnik gorzelnika, Wydawnictwo Sigma-NOT, Warszawa.
- [6] Łączyński B. (1992) Skrócony kurs gorzelnictwa rolniczego, Wydawnictwo Sigma-NOT, Warszawa.
- [7] Tuszyński T., Tarko T. (2010) Procesy fermentacyjne: przewodnik do ćwiczeń, Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego, Kraków.
- [8] Gołdyka E., Jagusiak J. (2008) Trudno przecenić wpływ surowca i wody, *Rynki Alkoholowe*, 2.
- [9] Szewczyk K. W. (2003) Technologia biochemiczna, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- [10] Lewicki P. P. (1999) Inżynieria procesowa i aparatura przemysłu spożywczego, WNT, Warszawa.
- [11] Czupryński B., Kotarska K., Kłosowski G., Sieliwanowicz B. (2010) Wykorzystanie nietypowych surowców i odpadów spożywczych w gorzelnictwie rolniczym (cz. I), *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 4, 50-52.
- [12] Szewczyk K. W., Zarys możliwości wykorzystania etanolu jako odnawialnego źródła energii, 1-8 (<http://www.transport.gov.pl/> - dostęp z 25.06.2012).
- [13] Raport GUS (2010) Badanie produkcji roślinnej, Wstępny szacunek głównych ziemioplodów rolnych i ogrodniczych, Warszawa.
- [14] Raport GUS (2008) Badanie produkcji roślinnej, Przedwinkowy szacunek głównych ziemioplodów rolnych i ogrodniczych, Warszawa.
- [15] Arseniuk E. (2007) Poradnik dla producentów, *Zboża wysokiej jakości*, 5, 3-17.
- [16] Szczodrowski H., Murawski Z., Górny S. (1976) Charakterystyka spirytusu surowego wytwarzanego z żyta w gorzelniach rolniczych, *Przemysł Fermentacyjny i Rolny*, 3, 1-3.
- [17] Kłosowski G., Czupryński B., Kotarska K., Wolska M. (2003) Charakterystyka zanieczyszczeń chemicznych obniżających jakość spirytusu surowego (cz. II) *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 9, 37-38.
- [18] Jarociński J., Jarosz K. (1980) Gorzelnictwo i drożdżownictwo, WSiP, Warszawa.
- [19] Michalski T. (2005) Kukurydza rośliną przyszłości, *Agroserwis*, 3, 7-13.
- [20] Czupryński B., Kotarska K., Kłosowski G., Sieliwanowicz B. (2010) Wykorzystanie nietypowych surowców i odpadów spożywczych w gorzelnictwie rolniczym (cz. II), *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 5, 28-30.
- [21] Dobrzenicka A., Haberowa H., Sobczak E. (1996) Porównanie jakości spirytusu surowego z żyta, pszenżyta i amarantusa, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 3, 12-13.
- [22] Czupryński B., Kotarska K. (2008) Ocena przydatności topinamburu jako surowca do produkcji spirytusu surowego, *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 2, 12-13.
- [23] Hitchcock A.S. (1950) Manual of the grasses of the United States, Washington, DC.

- [24] Mieczkowski M. (2008) Wykorzystanie ziemniaków w przemyśle gorzelnianym, Biuro Analiz i Programowania ARR.
- [25] Samborski S. (2005) Ziemniaczany przemysł gorzelniczy, *Agro Info*, (<http://www.agro-info.org.pl/index/?id=a3fb4fbf9a6f9cf09166aa9c20cbc1ad> – dostęp z 25.06.2012).
- [26] Nowacki W. Perspektywy produkcji ziemniaków Polsce, (<http://www.ihar.edu.pl/rynekekonomika.php> - dostęp z 25.06.2012)
- [27] Everist S. L. (1974) *Poisonous Plants of Australia*, Angus & Robertson, Sydney, N.S.W.
- [28] Wilson S. (1997) *Some Plants are Poisonous*, Reed Books Australia, Kew, Victoria
- [29] Blume D., Winks M. (2007) *Alcohol Can Be a Gas!: Fueling an Ethanol Revolution for the 21st Century*, USA.
- [30] Kuś J. (2002) *Produkcja biomasy na cele energetyczne (możliwości i ograniczenia)*, Biuletyn Informacyjny, 7, Wydawnictwo Oddziału PAN Lublin.
- [31] Jacques K. A., Lyons T. P., Kelsall D. R. (2003) *The alcohol textbook – A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*, Nottingham University Press.
- [32] Meilgaard M. C. (1975) Flavor chemistry of beer. Flavor interaction between principal volatiles, *Master Brewers Association of Americas Technical Quarterly*, 12, 107-117.
- [33] Rapp A., Mandery H. (1986) Wine aroma, *Experientia*, 42, 873-884.
- [34] Nykänen L., Suomalainen H. (1983) *Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages*, Reidel Publishing Company, Dordrecht, The Netherlands.
- [35] Czupryński B., Kłoskowski G., Gwizdała-Różycka (1995) Kinetyka powstawania zanieczyszczeń spirytusu surowego, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 10, 13-16.
- [36] Verstrepen K. J., Derdelinckx G., Dudour J-P., Winderickx J., Thevelein J. M., Pétorius I. S., Delvaux F. R. (2003) Flavor active esters: adding fruitiness to beer, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 110-118.
- [37] Sobczak E., Konieczna E. (1981) Wpływ rasy drożdży na skład chemiczny i cechy organoleptyczne wiana owocowego, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 4, 8-10.
- [38] Steger C. L. C., Lambrechts M. G. (2000) The selection of yeast strains for the production of premium quality South African brandy base products, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 431-440.
- [39] Younis O. S., Stewart G. G. (1998) Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of the Institute of Brewing*, 104, 255-264.
- [40] Younis O. S., Stewart G. G. (1998) The effect of malt wort, very high gravity malt wort and very high gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of the Institute of Brewing*, 57, 39-45.
- [41] Saerens S. M. G., Delvaux F., Verstrepen K. J., Van Dijck P., Thevelein J. M., Delvaux F. R. (2008) Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, 1, 454-461.
- [42] Plutowska B., Wardencki W. (2008) Determination of volatile fatty acid ethyl esters in raw spirits using solid phase microextraction and gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 613, 64-73.
- [43] Alves R. F., Nascimento A. M. D., Nogueira J. M. F. (2005) Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques, *Analytica Chimica Acta*, 546, 11-21.
- [44] Versini G., Franco M. A., Moser S., Barchetti P., Manca G. (2009) Characterization of apple distillates from native varieties of Sardinia island and comparison with other Italian products, *Food Chemistry*, 113, 1176-1183.

- [45] Caldeira I., Pereira R., Clímaco M. C., Belchior A.P., De Sousa R. B. (2004) Improved method for extraction of aroma compounds in aged brandies and aqueous alcoholic wood extracts using ultrasound, *Analytica Chimica Acta*, 513, 125-134.
- [46] Díaz-Reganon D. H., Salinas R., Masoud T., G. Alonso (1998) Adsorption-thermal desorption-gas chromatography applied to volatile compounds of Madrid region wines, *Journal of Food Composition and Analysis*, 11, 54-69.
- [47] Cortés S., Gil M. L., Fernández E. (2005) Volatile composition of traditional and industrial Orujo spirits, *Food Control*, 16, 383-388.
- [48] Jeleń H. H., Wlazły K., Wąsowicz E., Kamiński E. (1998) Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1469-1473.
- [49] Pino J., Martí M. P., Mestres M., Pérez J., Busto O., Guasch J. (2002) Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma, *Journal of Chromatography A*, 954, 51-57.
- [50] karta charakterystyki metanolu (www.poch.com.pl).
- [51] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13.01.2003 r. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności (Dz. U. Nr 37, poz. 326).
- [52] Ikeda R. M., Webb A. D., Kepner R. E. (1956) Comparative analysis of fusel oils from Thompson Seedless, Emperor, and Muscat of Alexandria wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4, 355-363.
- [53] Patel S., Schibamoto T. (2003) Effect of 20 different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine, *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 469-476.
- [54] Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A. (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour, *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169-180.
- [55] Kotarska K., Czupryński B., Kłosowski G. (2006) Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation, *Journal of Food Engineering*, 77, 965-971.
- [56] San Juan F., Cacho J., Ferreira V., Escudero A. (2012) Aroma chemical composition of red wines from different price categories and its relationship to quality, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5045-5056.
- [57] Vidrih R., Hribar J. (1999) Synthesis of higher alcohols during cider processing, *Food Chemistry*, 67, 287-294.
- [58] Kobayashi M., Shimizu H., Shioya S. (2008) Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 317-323.
- [59] Soufleros E. H., Mygdalia S. A., Natskoulis P. (2005) Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate "Koumaro" by aromatic and mineral composition, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 699-716.
- [60] Tao Y., Li H., Wang H., Hang L. (2008) Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China), *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 689-694.
- [61] Gil M., Cabellos J. M., Arroyo T., Prodanov M. (2006) Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin "Vinos de Madrid" (Spain), *Analytica Chimica Acta*, 563, 145-153.
- [62] Zielińska K., Miecznikowski A. (1994) Wpływ wybranych etapów procesu technologicznego na zawartość ubocznych produktów fermentacji w spirytusie surowym, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 8, 9-11.

- [63] Kłosowski G., Czupryński B. (1993) Przyczyny powstawania związków karbonylowych w spirytusie surowym ze szczególnym uwzględnieniem aldehydu octowego, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 5, 8-10.
- [64] Czupryński B., Kłosowski G., Kotarska K., Wolska M. (2000) Aldehydy w spirytusach surowych – nowe trendy, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2, 24-26.
- [65] Goj T. (1990) Skład związków karbonylowych w spirytusach surowych i rektyfikowanych różnego pochodzenia surowcowego oraz ich wpływ na właściwości sensoryczne (cz. I) Związki karbonylowe w spirytusach surowych, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 8/9, 6-9.
- [66] Goj T. (1990) Skład związków karbonylowych w spirytusach surowych i rektyfikowanych różnego pochodzenia surowcowego oraz ich wpływ na właściwości sensoryczne (cz. II) Związki karbonylowe w spirytusach rektyfikowanych, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 11/12, 11-13.
- [67] Łączyński B. (1995) Jakie są przyczyny ponadnormatywnej zawartości w spirytusie surowym aldehydów i jak zjawisku temu można przeciwdziałać w warunkach gorzelnii rolniczej?, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2, 13-15.
- [68] Kłosowski G., Czupryński B., Kotarska K., Wolska W. (2003) Charakterystyka zanieczyszczeń chemicznych obniżających jakość spirytusu surowego (cz. I), *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 6, 20-21.
- [69] Wasiak M. (2000) Akroleina - powstawanie występowanie i właściwości, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 5, 22-24.
- [70] Łączyński B. (1997) Perspektywa produkcji spirytusu rolniczego wolnego od akroleiny, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2, 21-22.
- [71] Sowiński P., Wardencki W., Partyka M. (2005) Development and evaluation of headspace gas chromatography method for the analysis of carbonyl compounds in spirits and vodkas, *Analytica Chimica Acta*, 539, 17-22.
- [72] Culleré L., Cacho J., Ferreira V. (2004) Analysis for wine C5-C8 aldehydes through the determination of their *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge, *Analytica Chimica Acta*, 524, 201-206.
- [73] Ledauphin J., Barillier D., Beljean-Leymarie M. (2006) Gas chromatographic quantification of aliphatic aldehydes in freshly distilled Calvados and Cognac using 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone as derivative agent, *Journal of Chromatography A*, 1115, 225-232.
- [74] Saison D., de Schutter D. P., Delvaux F., Delvaux F. R. (2009) Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216, 5061-5068.
- [75] Moreira N., Mendes F., Pereira O., de Pinho P. G., Hogga T., Vasconcelos I. (2002) Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts, *Analytica Chimica Acta*, 458, 157-167.
- [76] Swiegers J. H., Pretorius I. S. (2007) Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 954-960.
- [77] Nedjma M., Maujean A. (1995) Improved chromatographic analysis of volatile sulphur compounds by the static headspace technique on water – alcohol solutions and brandies with chemiluminescence detection, *Journal of Chromatography A*, 704, 495-502.
- [78] Wardencki W., Chmiel T., Dymerski T., Biernacka P., Plutowska B. (2009) Application of gas chromatography, mass spectrometry and olfactometry for quality assessment of selected food products, *Ecological Chemistry and Engineering S*, 16, 3, 287-300.

- [79] Ledauphin J., Basset B., Cohen S., Payot T., Barillier D. (2006) Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and Cognac: Carbonyl and Sulphur Compounds, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 28-40.
- [80] Hilla P. G., Smith R. M. (2000) Determination of sulphur compounds in beer using headspace solidphase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection, *Journal of Chromatography A*, 872, 203-213.
- [81] Mestres M., Busto O., Guasch J. (2000) Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma, *Journal of Chromatography A*, 881, 569-581.
- [82] Schlegel H.G. (2003) *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa.
- [83] Silva M. L., Malcata F. X., Hogg T. A. (1995) Note: how do processing conditions affect the microflora of the sweet pomace of white grapes from Vinho Verde? *Food Science and Technology International*, 1, 129-136.
- [84] Diéguez S. C., Díaz L. D., de la Penã M. L. G., Gómez E. F. (2002) Variation of Volatile Organic Acids in Spirits during Storage at Low and Room Temperatures, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 452-457.
- [85] Ng L.-K. (2002) Analysis by gas chromatography/mass spectrometry of fatty acids and esters in alcoholic beverages and tobaccos, *Analytica Chimica Acta*, 465, 309-318.
- [86] Goj T. (1998) Zanieczyszczenia chemiczne występujące w spirytusach, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 4, 18-20.
- [87] Guth H. (1997) Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3027-3032.
- [88] Ferreira V., López R., Cacho J. F. (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1659-1667.
- [89] Renger R. S., van Hateren S. H., Luyben K. Ch. A. M. (1992) The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation; the effect of carbon dioxide pressure, *Journal of the Institute of Brewing*, 98, 509-513.
- [90] Moreno J. A., Zea L., Moyano L., Medina M. (2005) Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing, *Food Control*, 16, 333-338.
- [91] Tarko T. (2006) Komponenty aromatu napojów alkoholowych, *Laboratorium przemysłowe*, 11, 39-40.
- [92] www.thegoodscentcompany.com.
- [93] Technical Biuletyn, ETS Laboratories (2011) Volatile sulfide analysis, 1-4.
- [94] Arthur C. L., Pawliszyn J. (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fiber, *Analytical Chemistry*, 62, 2145-2148.
- [95] Davis Jr. J. H. (2004) Task-specific ionic liquids, *Chemistry Letters*, 33, 9, 1072-1077.
- [96] Han D., Row K. H. (2010) Recent Applications of Ionic liquids in separation technology, *Molecules*, 15, 2405-2426.
- [97] Li M., Yanga L., Fanga S., Dong S., Hirano S., Tachibana K. (2011) Polymer electrolytes containing guanidinium-based polymeric ionic liquids for rechargeable lithium batteries, *Journal of Power Sources*, 196, 8662-8668.
- [98] Lozano L. J., Godinez C., de los Rios A. P., Hernandez-Fernandez F. J., Sanchez-Segado S., Alguacil F. J. (2011) Recent advances in supported ionic liquid membrane technology, *Journal of Membrane Science*, 376, 1-14.
- [99] Martín-Calero A., Pino V., Afonso A. M. (2011) Ionic liquids as a tool for determination of metals and organic compounds in food analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 10, 1598-1619.
- [100] Cheong L.-Z., Guo Z., Yang Z., Chua S.-C., Xu X. (2011) Extraction and enrichment of n=3 polyunsaturated fatty acids and ethyl esters through reversible π - π complexation with

- aromatic rings containing ionic liquids, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 8961-8961.
- [101] Kawano R., Katakabe T., Shimosawa H., Nazeeruddin M. K., Gratzel M., Matsui H., Kitamura T., Tanabe N., Watanabe M. (2010) Solid-state dye-sensitized solar cells using polymerized ionic liquid electrolyte with platinum-free counter electrode, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, 1916-1921.
- [102] Jia W., Wu Y., Huang J., An Q., Xu D., Wu W., Li F., Li G. (2010) Poly(ionic liquid) brush coated electrspun membrane: a useful platform for the development of functionalized membrane systems, *Journal of Material Chemistry*, 20, 8617-8623.
- [103] Green M. D., Long T. E. (2009) Designing imidazole-based ionic liquids and ionic liquid monomers for emerging technologies, *Polymers Review*, 49, 291-314.
- [104] Bara J. E., Camper D. E., Gin D. L., Noble R. D. (2010) Room-temperature ionic liquids and composite materials: platform technologies for CO₂ capture. *Accounts of Chemical Research*, 43, 152-159.
- [105] Xiao S., Lu X., Lu Q. (2007) Photosensitive polymer from ionic self-assembly of azobenzene dye and poly(ionic liquid) and its alignment characteristic toward liquid crystal molecules. *Macromolecules*, 40, 7944-7950.
- [106] Roosen C., Müller P., Lasse G. (2008) Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 607-614.
- [107] Walden P. (1914) Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts, *Bulletin of the Russian Academy of Science*, 8, 405-422.
- [108] Mecerreyes D. (2011) Polymeric ionic liquids: Broadening the properties and applications of polyelectrolytes, *Progress in Polymer Science*, 36, 1629-1648.
- [109] Anastas P. T., Warner J. (1998) *Green Chemistry. Theory and Practice*, Oxford University Press, New York.
- [110] Holbrey J. D., Seddon K. R. (1999) Ionic Liquids, *Clean Products and Processes*, 1, 223-236.
- [111] Ohno H. (2005) *Electrochemical aspects of ionic liquids*, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.
- [112] Chiappe C., Pieraccini D. (2005) Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 18, 275-297.
- [113] Fan Y., Chen M., Schentu C., El-Sepai F., Wang K., Zhu Y., Ye M. (2009) Ionic liquids extraction of Para Red and Sudan dyes from chilli powder, chilli oil and food additive combined with high performance chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 650, 65-69.
- [114] Yao C., Anderson J.L. (2009) Dispersive liquid-liquid microextraction using and *in situ* metathesis reaction to form an ionic liquid extraction phase for the preconcentration of aromatic compounds from water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1491-1502.
- [115] Yao, C., Twu P., Anderson J. L (2010) Headspace Single Drop Microextraction Using Micellar Ionic liquid extraction solvents, *Chromatographia*, 72, 393-402.
- [116] Ho T.D., Canestraro A.J., Anderson J.L (2011) Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review, *Analytica Chimica Acta*, 695, 18-43.
- [117] Marcilla R., Blazquez J. A., Fernandez R., Grande H., Pomposo J. A., Mecerreyes D. (2005) Synthesis of novel polycations using the chemistry of ionic liquids, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 206, 299-304.
- [118] Meng Y., Anderson J. L. (2010) Tuning the selectivity of polymeric ionic liquid sorbent coatings for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1217, 6143-6152.

- [119] Zhao Q., Anderson J. L. (2011) Task-specific microextractions using ionic liquids, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 1613-1618.
- [120] Liu J. F., Li N., Jiang G. B., Liu J.-M., Jönsson J. A., Wen M. J. (2005) Disposable ionic liquid coating for headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in paints followed by gas chromatography-flame ionization detection, *Journal of Chromatography A*, 1066, 27-32.
- [121] Hsieh Y. N., Huang P. C., Sun I.-W., Whang T.-J., Hsu C.-Y., Huang H.-H., Kuei C.-H. (2009) Preparation and application of ionic liquid-coated fused-silica capillary fibers for solid-phase Microextraction, *Analytica Chimica Acta*, 645, 42-47.
- [122] López-Darias J., Pino V., Anderson J. L., Graham C. M., Afonso A. M. (2010) Determination of water pollutants by direct-immersion solid-phase microextraction using polymeric ionic liquid coatings, *Journal of Chromatography A*, 1217, 1236-1243.
- [123] Zhao F., Meng Y., Anderson J. L. (2008) Polymeric ionic liquids as selective coatings for the extraction of esters using solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1208, 1-9.
- [124] Ngo H. L., LeCompte K., Hargens L., McEwen A. B. (2000) Thermal properties of imidazolium ionic liquids, *Thermochimica Acta*, 357-358, 97-102.
- [125] Awad W. H., Gilman J. W., Nyden M., Harris Jr. R. H., Sutto T. E., Callahan J., Trulove P. C., DeLong H. C., Fox D. M. (2004) Thermal degradation studies of alkyl-imidazolium salts and their application in nanocomposites, *Thermochimica Acta*, 409, 3-11.
- [126] Zhao Q., Anderson J. L. (2010) Highly selective GC stationary phases consisting of binary mixtures of polymeric ionic liquids, *Journal of Separation Science*, 33, 79-87.
- [127] Huddleston J. G., Visser A. E., Reichert W. M., Willauer H. D., Broker G. A., Rogers R. D. (2001) Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chemistry*, 3, 156-164.
- [128] Vygodskii Y. S., Melnik O. A., Lozinskaya E. I., Shaplov A. S., Malyshkina I. A., Gavrilova N. D., Lyssenko K. A., Antipin M. Y., Golovanov D. G., Korlyukov A. A., Ignat'ev N., Welz-Biermann U. (2007) The influence of ionic liquid's nature on free radical polymerization of vinyl monomers and ionic conductivity of the obtained polymeric materials, *Polymers for Advanced Technologies*, 18, 50-63.
- [129] Endres F., El Abedin S. Z. (2006) Air and water stable ionic liquids in physical chemistry, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8, 2101-2116.
- [130] Abbott A. P., McKenzie K. J. (2006) Application of ionic liquids to the electrodeposition of metals, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8, 4265-4279.
- [131] Chalumot G., Yao C., Pino V., Anderson J. L. (2009) Determining the stoichiometry and binding constants of inclusion complexes formed between aromatic compounds and cyclodextrin by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216, 5242-5248.
- [132] Meng Y., Pino V., Anderson J. L. (2011) Role of counteranions in polymeric ionic liquid - based solid phase microextraction coatings for selective extraction of polar compounds, *Analytica Chimica Acta*, 687, 141-149.
- [133] PN-A-79528-2:2002/2007, Spirytus (alkohol etylowy) - Metody badań - Część 2: Ocena organoleptyczna spirytusu i wyrobów spirytusowych.
- [134] PN-A-79528-4:2000, Spirytus (alkohol etylowy) - Metody badań - Oznaczanie zawartości aldehydów.
- [135] PN-A-79528-7:2001, Spirytus (alkohol etylowy) - Metody badań - Oznaczanie kwasowości.

- [136] Plutowska B., Wardencki W. (2009) Headspace solid-phase Microextraction and gas chromatography–olfactometry analysis of raw spirits of different organoleptic quality, *Flavour and Fragrance Journal*, 24, 177-185.
- [137] PN-A-79529-2:2005, Napoje spirytusowe i spirytus butelkowany - Metody badań - Część 2: Ocena organoleptyczna.
- [138] Pineau B., Barbe J.-C., Van Leeuwen C., Dubourdieu, D. (2009) Examples of perceptive interactions involved in specific “red-” and “black-berry” aromas in red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (9), 3702-3708.
- [139] Diaz-Maroto M. C., Schneider R., Baumes R. (2005) Formation pathways of ethyl esters of branched short-chain fatty acids during wine aging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3503-3509.
- [140] Rocha S., Ramalheira V., Barros A., Delgado I., Coimbra M. A. (2001) Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5142-5151
- [141] Tat L., Comuzzo P., Battistutta F., Zironi, R. (2007) Sweet-like off-flavor in aglianico Del Vulture wine: Ethyl phenylacetate as the mainly involved compound, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (13), 5205-5212.
- [142] Vianna E., Ebeler S. E. (2001) Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 589-595.
- [143] Sumbly K. M., Grbin P. R., Jiranek V. (2010) Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects, *Food Chemistry*, 121, 1-16.
- [144] Plutowska B. (2008) Wykorzystanie technik instrumentalnych do oceny jakości organoleptycznej i rozróżniania destylatów rolniczych i miodów, Politechnika Gdańska, Gdańsk.
- [145] Kohonen T. (1983) Self-Organization and associative memory. Springer Verlag, Berlin.
- [146] Vesanto J., Himberg J., Alhoniemi E., Parhankagas J. (2000) SOM Toolbox for Matlab 5, Report A57(<http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox/>).
- [147] Gramacki J., Gramacki A. (2008) Wybrane metody redukcji wymiarowości danych oraz ich wizualizacji, 1, 24, XIV Konferencja PLOUG, Szczyrk.
- [148] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2870/2000 z dnia 19 grudnia 2000 r. ustanawiające wspólnotowe metody referencyjne dla analizy napojów spirytusowych.
- [149] Konieczka P., Namieśnik J., Zygmunt B., Bulska E., Świtaj-Zawadka A., Naganowska A., Kremer E., Rompa M. (2004) Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych, Wydawnictwo CEEAM, Gdańsk
- [150] Ziółkowska A., Jeleń H. H. (2012) Differentiation of raw spirits of rye, corn and potato using chromatographic profiles of volatile compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (DOI 10.1002/jsfa.5677)
- [151] Cirlini M., Caligiani A., Palla L., Palla G. (2011) HS-SPME/GC–MS and chemometrics for the classification of Balsamic Vinegars of Modena of different maturation and ageing, *Food Chemistry*, 124, 1678-1683.
- [152] De Luca M., Terouzi W., Ioele G., Kzaiber F., Oussama A., Oliverio F., Tauler R., Ragno G. (2011) Derivative FTIR spectroscopy for cluster analysis and classification of morocco olive oils, *Food Chemistry*, 124, 1113-1118.
- [153] Jaitz L., Siegl K., Eder R., Rak G., Abranko L., Koellensperger G., Hann S. (2010) LC–MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage, *Food Chemistry*, 122, 366-372.

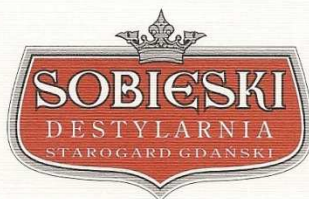
- [154] Joebstl D., Bandoniene D., Meisel T., Chatzistathis S. (2010) Identification of the geographical origin of pumpkin seed oil by the use of rare earth elements and discriminant analysis, *Food Chemistry*, 123, 1303-1309.
- [155] Longobardi F., Casiello G., Sacco D., Tedone L., Sacco A. (2011) Characterization of the geographical origin of Italian potatoes, based on stable isotope and volatile compound analyses, *Food Chemistry*, 124, 1708-1713.
- [156] Andreu-Navarro A., Russo P., Aguilar-Caballo M.P., Fernández-Romero J. M., Gómez-Hens A. (2011) Usefulness of terbium-sensitized luminescence detection for the chemometric classification of wines by their content in phenolic compounds, *Food Chemistry*, 124, 1753-1759.
- [157] Sun S., Guo B., Wei Y., Fan M. (2011) Multi-element analysis for determining the geographical origin of mutton from different regions of China, *Food Chemistry*, 124, 1151-1156.
- [158] Rebolo S., Peña R. M., Latorre M. J., García S., Botana A. M., Herrero C. (2000) Characterisation of Galician (NW Spain) Ribeira Sacra wines using pattern recognition analysis, *Analitica Chimica Acta*, 417, 211-220.
- [159] Jeleń H. H., Ziółkowska A., Kaczmarek A. (2010) Identification of the botanical origin of raw spirits produced from rye, potato, and corn based on volatile compounds analysis using a SPME-MS method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12585-12591.
- [160] Stanisław A. (2007) Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem Statistica PL na przykładach z medycyny. Tom 3 - Analizy wielowymiarowe, Wydawnictwo Statsoft.
- [161] Stanisław A. (2002) Podstawy statystyki dla prowadzących badania naukowe Odcinek 35: Analiza dyskryminacji, *Medycyna Praktyczna*, 6, 170-175.
- [162] Martín A., Alvarez J. B., Martín L. M., Barro F., Ballesteros J. (1999) The development of Tritordeum: A novel cereal for food processing, *Journal of Cereal Science*, 30, 85-95.
- [163] Hazelwood L. A., Daran J.-M., van Maris A. J. A., Pronk J. T., Dickinson J. R. (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2259-2266.
- [164] Smudzińska S. (1996) Normy żywienia drobiu, Wydawca Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, PAN, Jabłonna.
- [165] Zhu F., Cai Y.-Z., Keb J., Corke H. (2010) Compositions of phenolic compounds, amino acids and reducing sugars in commercial potato varieties and their effects on acrylamide formation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2254-2262.
- [166] Vuralhan Z., Morais M. A., Tai S.-L., Piper M. D. W., Pronk J. T. (2003) Identification and Characterization of Phenylpyruvate Decarboxylase Genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Environmental Microbiology*, 69 (8), 4534-4541.
- [167] Zellner B. A., Bicchi C., Dugo P., Rubiolo P., Dugo G., Mondello L. (2008) Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review, *Flavor and Fragrance Journal*, 23, 297-314.
- [168] Bianchi F., Careri M., Mangia A., Musci M. (2007) Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: database creation and evaluation of precision and robustness, *Journal of Separation Science*, 30, 563-572.
- [169] Bicchi C., Rubiolo P., Camargo E. E. S., Vilegas W., Gracioso J. S., and Brito, A. R. M. S. (2003) Components of *Turnera diffusa* Willd. var. *afrodisiaca* (Ward) Urb. essential oil, *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 59-61.
- [170] Binder R. G., Turner C. E., Flath R. A. (1990) Volatile components of purple starthistle, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1053-10556.

- [171] Brunton N. P., Cronin D. A., Monahan F. J. (2002) Volatile components associated with freshly cooked and oxidized off-flavours in turkey breast meat, *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 327-334.
- [172] Chung T.Y., Eiserich J.P., Shibamoto T. (1994) Volatile compounds produced from peanut oil heated with different amounts of cysteine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1743-1746.
- [173] Cullere L., Escudero A., Cacho J., Ferreira V. (2004) Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653-1660.
- [174] Fan W., Qian M. C. (2006) Characterization of aroma compounds of Chinese "Wuliangye" and "Jiannanchun" liquors by aroma extract dilution analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2695-2704.
- [175] Ferreira V., Aznar M., Lopez R., Cacho J. (2001) Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4818-4824.
- [176] Fukami K., Ishiyama S., Yaguramaki H., Masuzawa T., Nabeta Y., Endo K., Shimoda M. (2002) Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5412-5416.
- [177] Galindo-Cuspinera V., Lubran M. B., Rankin S. A. (2002) Comparison of volatile compounds in water- and oil-soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2010-2015.
- [178] Hognadottir A., Rouseff R. L. (2003) Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry, *Journal of Chromatography A.*, 998, 201-211.
- [179] Hwan C.-H., Chou C.-C. (1999) Volatile components of the Chinese fermented soya bean curd as affected by the addition of ethanol in ageing solution, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 243-248.
- [180] Innocenzi P. J., Hall D. R., Cross J. V., Masuh H., Phythian S. J., Chittamaru S., Guarino S. (2004) Investigation of long-range female sex pheromone of the European tarnished plant bug, *Lygus rugulipennis*: chemical, electrophysiological, and field studies, *Journal of Chemical Ecology*, 30, 1509-1529.
- [181] Chung T. Y., Eiserich J. P., Shibamoto T. (1993) Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1693-1697.
- [182] Le Guen S., Prost C., Demaimay M. (2000) Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 896, 361-371.
- [183] Lee S.-J., Noble A. C. (2003) Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8036-8044.
- [184] Pino J.A., Marbot R. (2001) Volatile flavor constituents of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5880-5882.
- [185] Qian, M., Reineccius, G. (2003) Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method, *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 252-259.
- [186] Ruther J. (2000) Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 890, 313-319.

- [187] Sanz C., Ansorena D., Bello J., Cid C. C. (2001) Optimizing headspace temperature and time sampling for identification of volatile compounds in ground roasted Arabica coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1364-1369.
- [188] Umamo R. P., Hagi Y., Shibamoto T. (2002) Volatile chemicals identified in extracts from newly hybrid citrus, Dekopon (Shiranuhi mandarin Suppl. J.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5355-5359.
- [189] Valim M. F., Rouseff R. L., Lin J. (2003) Gas chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1010-1015.
- [190] Yanagimoto K., Ochi H., Lee K.-G., Shibamoto, T. (2004) Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 592-596.
- [191] Goodner K. L. (2008) Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds, *LWT - Food Science and Technology*, 41, 951-958.
- [192] Choi H.-S. (2003) Character Impact Odorants of Citrus Hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel Oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2687-2692.
- [193] Escriche I., Kadar M., Juan-Borrás M., Domenech E. (2011) Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys, *Food Research International*, 44, 1504-1513.
- [194] Vermeir S., Hertog M. L. A. T. M., Vankerschaver K., Swennen R., Nicola B.M., Lammertyn J. (2009) Instrumental based flavour characterization of banana fruit, *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1647-1653.
- [195] Kaškonienė V., Venskutonis P. R., Čeksteryte V. (2008) Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania, *Food Chemistry*, 111, 988-997.
- [196] Perestrelo R., Barros A. S., Camara J. S., Rocha S. M. (2011) In-depth search focused on furans, lactones, volatile phenols, and acetals as potential age markers of madeira wines by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3186-3204.
- [197] Wardencki W., Sowiński P., Curyło J. (2003) Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages, *Journal of Chromatography A*, 984, 89-96.
- [198] Sowiński P. (2004) Nowe procedury chromatograficznego oznaczania związków karbonylowych w alkoholach z wykorzystaniem derywatywacji i wybranych technik ekstrakcyjnych, Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska, Gdańsk.
- [199] López-Vázquez C., Orriols I., Perelló M.-C., de Revel G. (2012) Determination of aldehydes as pentapluorobenzyl derivatives in grape pomace distillates by HS-SPME/GC-MS, *Food Chemistry*, 130, 1127-1133.
- [200] López-Darias J., Pino V., Meng Y., Anderson J. L., Afonso A. M. (2010) Utilization of a benzyl functionalized polymeric ionic liquid for the sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, parabens and alkylphenols in waters using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography – flame ionization detection, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7189-7197.
- [201] Clare B., Sirwardana A., MacFarlane D. R. (2009) Synthesis, purification and characterization of ionic liquids, *Topics in current chemistry*, 290/201, 1-40.
- [202] Nockemann P., Binnemans K., Driesen K. (2005) Purification of imidazolium ionic liquids for spectroscopic applications, *Chemical Physics Letters*, 415, 131-136.

- [203] Hsieh Y.-N., Huang P.-C., Sun I.-W., Whang T.-J., Hsu C.-Y., Huang H.-H., Chun- Kuei H. (2006) Nafion membrane-supported ionic liquid–solid phase microextraction for analyzing ultra trace PAHs in water samples, *Analytica Chimica Acta*, 557, 321-328.
- [204] Jeleń H. H., Szczurek A. (2010) Solid phase microextraction for profiling volatile compounds in liquered white wines, *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 9 (1) 2010, 23-32.
- [205] Meine N., Benedito F., Rinaldi R. (2010) Thermal stability of ionic liquids assessed by potentiometric titration, *Green Chemistry*, 12, 1711-1714.
- [206] Anderson J. L., Ding R., Ellern A., Armstrong D. W. (2005) Structure and properties of high stability geminal dicationic ionic liquids, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 593-604.
- [207] Hsieh Y.-N., Horng R. S., Ho W.-Y., Huang P.-C., Hsu C.-Y., Whang T.-J., Kuei C.-H. (2008) Characterizations for vinylimidazolium based ionic liquid polymer stationary phases for capillary gas chromatography, *Chromatographia*, 67, 413-420.
- [208] Pawliszyn J. (2002) Sampling and sample preparation for field laboratory, Wilson and Wilson's, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier.
- [209] Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J. (2000) Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 880, 35-62.
- [210] Peñalver A., Pocurull E., Borrull F., Marcé R. M. (1999) Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples, *Trends in analytical chemistry*, 18 (8), 557-568.
- [211] Prosen H., Zupančič-Kralj L. (1999) Solid-phase microextraction, *Trends in analytical chemistry*, 18 (4), 272-282.
- [212] Zhao Q., Wajert J. C., Anderson J. L. (2010) Polymeric ionic liquids as CO₂ selective sorbent coatings for solid-phase microextraction, *Analytical Chemistry*, 82, 707-713.
- [213] Baltazar Q. Q., Leininger S. K., Anderson J. L. (2008) Binary ionic liquid mixtures as gas chromatography stationary phases for improving the separation selectivity of alcohols and aromatic compounds, *Journal of Chromatography A*, 1182, 119–127.
- [214] Brown P. R., Hartwick R. A. (1989) *High Performance liquid chromatography*, Wiley, New York.
- [215] Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. (2010) *Techniki separacyjne*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego.
- [216] Rodríguez-Bencomo J. J., Conde J. E., García-Montelongo F., Pérez-Trujillo J. P. (2003) Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 991, 13-22.

ZAŁĄCZNIK



www.wodki.gda.pl

Starogard Gdański, 8 października 2009 r.

REFERENCJE

Pani Paulina Biernacka – studentka I roku dziennych studiów doktoranckich przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, w okresie od 7 września do 7 października 2009 roku odbyła nieodpłatny staż w Destylarni Sobiński Spółka Akcyjna w Starogardzie Gdańskim w Dziale Zapewnienia Jakości na stanowisku Kontroler jakości - laborant.

Do podstawowych obowiązków Pani Pauliny Biernackiej należało:

- zapoznanie się z obowiązującą w dziale dokumentacją Systemu Zarządzania Jakością zgodnego z wymaganiami normy ISO 9001:2000,
- zapoznanie się z zasadami kontroli odbiorczej dostaw destylatów pochodzenia rolniczego,
- pomoc w opracowaniu i wdrożeniu ilościowej oraz jakościowej metody analizy chromatograficznej ubocznych produktów fermentacji alkoholowej obecnych w destylatach pochodzenia rolniczego.

W trakcie stażu Pani Paulina Biernacka wykazała się sumiennością, zaangażowaniem i odpowiedzialnością, co gwarantowało rzetelne wykonanie powierzonych jej zadań. Ujawniała przy tym bardzo dużo własnej inwencji i inicjatywy.

Pani Paulina Biernacka jest osobą komunikatywną, szybko odnajduje się w nowym otoczeniu i łatwo nawiązuje kontakty interpersonalne. Bardzo dobrze sprawdzała się zarówno w sytuacjach wymagających indywidualnego wysiłku, jak i umiejętności pracy w zespole.

Jako bezpośrednia przełożona miałam okazję na bieżąco obserwować efekty codziennej pracy Pani Pauliny Biernackiej i z pełną odpowiedzialnością polecam ją jako pracownika. Z pewnością sprostą ona wielu ambitnym zadaniom i będzie w stanie spełnić oczekiwania najbardziej wymagającego pracodawcy.

W razie potrzeby jestem otwarta na dalsze szczegółowe pytania na temat stażystki.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Działu Zapewnienia Jakości
Agnieszka Kochanowska
Agnieszka Kochanowska

DESTYLARNIA SOBIEŃSKI S.A.
UL. SKARSZEWSKA 1, 83-200 STAROGARD GDAŃSKI
TEL. (+48 58) 53 39 400, FAX (+48 58) 53 39 406 – <http://www.wodki.gda.pl>
NIP 592-020-27-79, NIP UE: PL 5920202779

Destylarnia Sobiński S.A. wpisana do Krajowego Rejestru Sądowego prowadzonego przez Sąd Rejonowy Gdańsk-Północ w Gdańsku, VII Wydział Gospodarczy pod Nr KRS 0000063761
Kapitał zakładowy 49 500 000,00 PLN - wpłacony w całości.