

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Monika Kadrmasová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko - technologická

Analýza hořkých kyselin v pivu s využitím disperzní kapalinové mikroextrakce

Bc. Monika Kadrmasová

Diplomová práce

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Kadrmasová**  
Osobní číslo: **C16608**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Analýza hořkých kyselin v pivu s využitím disperzní kapalinové mikroextrakce**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši zabývající se rozvojem technik kapalinové mikroextrakce. Zaměřte se především na metodu disperzní kapalinové mikroextrakce (DLLME) a její varianty. Popište možnosti kombinace uvedených technik se separačními, a to především s technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Dále se zaměřte na analýzu složek piva, a to včetně rozdílů ve složení piv vyrobených klasickým způsobem chmelení a postupem tzv. studeného chmelení.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek techniky DLLME využívající ztuhnutí plovoucí organické fáze pro izolaci  $\alpha$ - a  $\beta$ - hořkých kyselin ze vzorků piva s následnou analýzou pomocí HPLC. Provéřte různé varianty dané metody (disperzní rozpouštědlo, využití ultrazvuku, popř. vzduchem asistovaný postup). Navržené metody vzájemně porovnejte prostřednictvím analýzy piv vyrobených oběma výše zmíněnými postupy chmelení a prověřte, zda je možné na základě analýzy hořkých kyselin dokázat, že byl opravdu při výrobě piva použit postup tzv. studeného chmelení.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Karolína Adámková**

Katedra analytické chemie


Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11. 5. 2018

Bc. Monika Kadrmasová

**Poděkování:**

V této části bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady, trpělivost a čas při konzultacích a pomoc při řešení problémů v průběhu vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za velkou finanční a zejména morální podporu a motivaci po celou dobu mého studia.

## **Anotace**

Tato diplomová práce je zaměřena na využití disperzní kapalinové mikroextrakce ve spojení s kapalinovou chromatografií s UV detekcí pro stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin v klasickém pivu a v pivu chmeleném za studena. V teoretické části jsou popsány různé způsoby modifikace disperzní kapalinové mikroextrakce, možnosti spojení této mikroextrakce s kapalinovou chromatografií a dalšími technikami. Zaměřena je i na výrobu piva, popis různých způsobů chmelení a stanovení látek obsažených v pivu, zejména těkavých látek a hořkých kyselin. V experimentální části byly nejprve optimalizovány podmínky 4 disperzních kapalinových mikroextrakcí využívající ztuhnutí organické kapky (DLLME-SFO, AA-LLME-SFO, UA-LLME-SFO, UA-DLLME-SFO), ze kterých byla vybrána nejvhodnější mikroextrakce pro stanovení hořkých kyselin. Dále jsou prezentovány výsledky analýzy reálných vzorků piv a porovnání množství hořkých kyselin v pivech chmelených klasicky a pivech chmelených za studena.

## **Klíčová slova**

Disperzní kapalinová mikroextrakce, kapalinová chromatografie, pivo, studené chmelení, hořké kyseliny

## **Title**

Analysis of bitter acids in beer using dispersive liquid-liquid microextraction.

## **Annotation**

This thesis deals with the use of dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography with UV detection for the determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids in classical beer and in dry-hopped beer. In the theoretical part there are described various modifications of dispersive liquid-liquid microextraction methods together with possibilities of their connection with liquid chromatography and other techniques. It is also focused on the production of beer, the description of the different ways of hopping and the determination of substances in beer, especially volatile compounds and bitter acids. In the experimental part, the conditions of the 4 dispersive liquid-liquid microextraction methods with solidification of floating organic drop (DLLME-SFO, AA-LLME-SFO, UA-LLME-SFO, UA-DLLME-SFO) were optimised and the most suitable approach for the determination of bitter acids was selected. In addition, the results of the analysis of real beer samples and the comparison of bitter acids in classical beer and dry-hopped beer are presented.

## **Keywords**

Dispersive liquid-liquid microextraction; Liquid chromatography; Beer; Dry-hopping; bitter acids.

# Obsah

Úvod.....	16
1 Teoretická část.....	17
1.1 Kapalinová mikroextrakce .....	17
1.1.1 Mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky .....	21
1.1.2 Princip disperzní kapalinové mikroextrakce.....	22
1.1.3 Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky .....	24
1.1.4 Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce.....	25
1.1.5 Vortexem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce .....	26
1.1.6 Vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce .....	27
1.1.7 Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající iontových kapalin.....	28
1.1.8 Spojení ultrazvukem asistované a vzduchem asistované disperzní kapalinové mikroextrakce .....	28
1.1.9 Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající rozrušení disperze rozpouštědlem.....	29
1.1.10 Disperzní kapalinová mikroextrakce s šumivou reakcí .....	31
1.1.11 Reverzní disperzní kapalinová mikroextrakce.....	31
1.1.12 Tandemová disperzní kapalinová mikroextrakce .....	31
1.1.13 Disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí vodnou fází.....	32
1.1.14 Automatizace v disperzní kapalinové mikroextrakci.....	32
1.1.15 Možnosti kombinace se separačními a spektrálními technikami.....	34
1.2 Kapalinová chromatografie .....	39
1.3 Pivo .....	45
1.3.1 Výroba piva.....	45
1.3.2 Mikrobiologie piva .....	52
1.3.3 Analýza složek piva .....	54
2 Experimentální část .....	58



2.1	Instrumentace .....	58
2.1.1	Kapalinový chromatograf s detektorem s diodovým polem.....	58
2.1.2	Další zařízení .....	58
2.2	Chemikálie a standardní látky .....	58
2.3	Vzorky piva.....	59
2.4	Pracovní postupy .....	60
2.4.1	Příprava kalibračních řad .....	60
2.4.2	Postupy extrakcí.....	60
2.4.3	Extrakce vzorků .....	62
3	Výsledky a diskuze.....	63
3.1	Kalibrační závislosti.....	63
3.2	Optimalizace extrakce .....	72
3.2.1	Výběr disperzního a extrakčního rozpouštědla.....	72
3.2.2	Disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou.....	74
3.2.3	Vzduchem asistovaná kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky .....	75
3.2.4	Ultrazvukem asistovaná kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou.....	76
3.2.5	Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky.....	76
3.2.6	Optimalizace doby a rychlosti odstředění.....	77
3.2.7	Výběr extrakční metody pro analýzu vzorků piva.....	78
3.3	Obsah hořkých kyselin ve vzorcích piva .....	81
4	Závěr.....	91
5	Použitá literatura.....	92
	Přílohy.....	103

## Seznam zkratk a značek

AA-DLLME	Vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce
AA-DLLME-SFO	Vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky
AA-LLME	Vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce bez použití disperzního rozpouštědla
ACN	Acetonitril
DAD	Detektor s diodovým polem
DLLME	Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina
DLLME-SAP	Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí vodné fáze
DLLME-SFO	Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky
DLPME	Disperzní mikroextrakce kapalnou fází
ETAAS	Elektrotermická atomová absorpční spektrometrie
EtOH	Ethanol
FAAS	Plamenová atomová absorpční spektrometrie
FIA	Průtoková injekční analýza
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem
GF-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s grafitovou pecí
HDS	Rozpouštědlo s vysokou hustotou
HDS-ST-DLLME	Disperzní kapalinová mikroextrakce s extrakčním rozpouštědlem s vyšší hustotou a rozrušením disperze rozpouštědlem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-DAD	Kapalinový chromatograf spojený s detektorem s diodovým polem
IL-DLLME	Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající iontové kapaliny
LDS	Rozpouštědlo s nízkou hustotou
LDS-DLLME	Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající extrakční rozpouštědla o nízké hustotě (nižší hustotě než voda)
LDS-ST-DLLME	Disperzní kapalinová mikroextrakce s extrakčním rozpouštědlem s nižší hustotou a rozrušením disperze rozpouštědlem
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
LPME	Mikroextrakce kapalně fáze
MetOH	Methanol
N-DLLME	Klasická disperzní kapalinová mikroextrakce
PCR	Polymerázová řetězová reakce

RP-DLLME	Disperzní kapalinová mikroextrakce s reverzní fází
SA-DLLME	Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající povrchově aktivních látek
SA-SFDME	Mikroextrakce s tuhnoucí kapkou využívající povrchově aktivních látek
SIA	Sekvenční injekční analýza
SDME	Mikroextrakce jednou kapkou
SFDME	Mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky
SI-DLLME	Sekvenční injekční disperzní kapalinová mikroextrakce
SM-DLLME	Supramolekulární disperzní kapalinová mikroextrakce
SPE	Extrakce tuhou fází
ST-DLLME	Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající rozrušení disperze rozpouštědlem
TEME	Emulzní mikroextrakce bez organických rozpouštědel
UA-DLLME	Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce
UA-DLLME-SFO	Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce s využitím plovoucí organické kapky
UA-LLME	Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce bez využití disperzního rozpouštědla
UA-LLME-SFO	Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce bez disperzního rozpouštědla s využitím ztuhnutí organické kapky
USAEME-SFD	Ultrazvukem asistovaná emulzifikační mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou
UV	Ultrafialové záření
VA-DLLME	Vortexem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce
VA-SFDME	Vortexem asistovaná mikroextrakce s tuhnoucí kapkou
VIS	Viditelné záření

## Seznam obrázků

Obrázek 1: 12 zásad zelené analytické chemie [11] .....	18
Obrázek 2: Zastoupení vzorků pro aplikaci disperzní kapalinové mikroextrakce [13] .....	18
Obrázek 3: Využití DLLME v různých odvětvích [2].....	19
Obrázek 4: Postupný vývoj nejčastějších modifikací disperzní kapalinové mikroextrakce.....	20
Obrázek 5: Rozdělení modifikací DLLME podle tvorby disperze a podle hustoty extrakčního rozpouštědla .....	20
Obrázek 6: Provedení mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky [17] .....	21
Obrázek 7: Jednotlivé kroky disperzní kapalinové mikroextrakce [18] .....	22
Obrázek 8: Jednotlivé kroky disperzní kapalinové mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky [18] .....	25
Obrázek 9: Uspořádání pro ultrazvukem asistovanou disperzní kapalinovou mikroextrakci ..	26
Obrázek 10: Provedení vortexem asistované disperzní kapalinové mikroextrakce s extrakčním rozpouštědlem s vyšší hustotou než je hustota vody (HDS) a s extrakčním rozpouštědlem s hustotou nižší než je hustota vody (LDS) [22] ...	27
Obrázek 11: Provedení vzduchem asistované disperzní kapalinové mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou [30] .....	27
Obrázek 12: Provedení disperzní kapalinové mikroextrakce kombinující ultrazvuk a vzduch [22] .....	29
Obrázek 13: Provedení disperzní kapalinové mikroextrakce rozrušení rozpouštědlem s využitím extrakčního rozpouštědla o hustotě nižší než je hustota vody [11] ...	30
Obrázek 14: Provedení tandemové disperzní kapalinové mikroextrakce [8] .....	31
Obrázek 15: Provedení disperzní kapalinové mikroextrakce s tuhnoucí vodnou fází [38] .....	32
Obrázek 16: Různé typy automatizace disperzní kapalinové mikroextrakce [41] .....	33
Obrázek 17: Schéma automatizace v automatickém dávkovači [42] .....	33
Obrázek 18: Provedení magnetického míchání ve stříkačce [46].....	34
Obrázek 19: Nejčastěji stanovované kovy pomocí AAS a příbuzných metod [7] .....	35
Obrázek 20: Schéma dělení látek v kapalinové chromatografii [58].....	39
Obrázek 21: Schéma zařízení pro kapalinovou chromatografii [61] .....	41
Obrázek 22: Princip detektoru s diodovým polem [63].....	43
Obrázek 23: Rozdělení chmelových silic [71].....	47
Obrázek 24: Vzorce $\alpha$ -hořkých kyselin [74] .....	47
Obrázek 25: Vzorce $\beta$ -hořkých kyselin [74].....	48

Obrázek 26: Schéma izomerace $\alpha$ -hořkých kyselin [75].....	48
Obrázek 27: Schématické znázornění procesu výroby klasického piva [77] .....	49
Obrázek 28: Automatizované chmelení za studena ve velkém objemu s použitím extraktoru chmele [82].....	52
Obrázek 29: Extraktor chmele napojený na pípu (vlevo) a extraktor chmele do sklenice (vpravo) [83,84].....	52
Obrázek 30: Analyzované vzorky pív .....	59
Obrázek 31: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro kohumulon.....	64
Obrázek 32: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro adhumulon + humulon .....	65
Obrázek 33: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro kolupulon.....	65
Obrázek 34: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro adlupulon + lupulon .....	66
Obrázek 35: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku po extrakci pro kohumulon.....	68
Obrázek 36: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku po extrakci pro adhumulon + humulon .....	68
Obrázek 37: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku po extrakci pro kolupulon.....	69
Obrázek 38: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku po extrakci pro adlupulon + lupulon .....	69
Obrázek 39: Porovnání kombinací směsí disperzních a extrakčních rozpouštědel pro 4 provedené extrakce.....	73
Obrázek 40: Porovnání disperzních rozpouštědel pro spojení s 1-undekanolem .....	74
Obrázek 41: Porovnání extrakcí při dvou různých hodnotách pH 4,53 (bez úpravy pH) a 3,0 (s úpravou pomocí kyseliny fosforečné).....	75
Obrázek 42: Grafy pro optimalizaci rychlosti a doby odstředění u všech extrakcí pro různé časy (n = 6) .....	77
Obrázek 43: Grafy pro optimalizaci rychlosti a doby odstředění u všech extrakcí pro různé rychlosti odstředění (n = 6).....	78
Obrázek 44: Porovnání extrakcí pro koncentraci 0,05 mg/ml (n = 6) .....	79
Obrázek 45: Porovnání extrakcí pro koncentraci 0,1 mg/ml (n = 6) .....	79

Obrázek 46: Porovnání extrakcí z pohledu množství extraktu (n = 6) .....	80
Obrázek 47: Porovnání ploch píků $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Bakalář (n=6).....	82
Obrázek 48: Porovnání ploch píků $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Krušovice (n = 6).....	83
Obrázek 49: Porovnání ploch píků $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Lobkowicz (n = 6) .....	84
Obrázek 50: Porovnání ploch píků $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Postřižinské (n =6).....	85
Obrázek 51: Porovnání ploch píků $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Primátor (n=6) .....	86
Obrázek 52: Porovnání ploch píků $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Svijany (n=6) .....	87
Obrázek 53: Porovnání piv za studena chmelených všech značek (n=6).....	89
Obrázek 54: Porovnání piv klasicky chmelených všech značek (n=6) .....	89
Obrázek 55: Porovnání obsahu $\alpha$ -hořkých kyselin u všech analyzovaných piv (n=6).....	90
Obrázek I-1: Vzorový chromatogram z měření kalibrace .....	104
Obrázek I-2: Vzorový chromatogram z měření kalibrace extrakce.....	104
Obrázek I-3: Chromatogram z měření piva Bakalář ležák .....	105
Obrázek I-4: Chromatogram z měření piva Bakalář nealko za studena chmelený.....	105
Obrázek I-5: Chromatogram z měření extrakce piva Bakalář za studena chmelený.....	106
Obrázek I-6: Chromatogram z měření extrakce piva Krušovice 12° ze žateckého chmele ...	106
Obrázek I-7: Chromatogram měření piva Krušovice za studena chmelené .....	107
Obrázek I-8: Chromatogram měření piva Lobkowicz premium .....	107
Obrázek I-9: Chromatogram měření piva Lobkowicz ALE .....	108
Obrázek I-10: Chromatogram měření piva Francinův ležák .....	108
Obrázek I-11: Chromatogram měření piva Jubilejní Hrabalův ležák.....	109
Obrázek I-12: Chromatogram měření piva Primátor premium .....	109
Obrázek I-13: Chromatogram měření piva Primátor IPA .....	110
Obrázek I-14: Chromatogram měření piva Svijanský máz .....	110
Obrázek I-15: Chromatogram měření piva Svijanský rytíř .....	111
Obrázek I-16: Chromatogram měření piva Raven IPA .....	111
Obrázek II-1: Odezvy kalibračních roztoků extrakce v celém koncentračním rozsahu pro kohumulon.....	112

Obrázek II-2: Odezvy kalibračních roztoků extrakce v celém koncentračním rozsahu pro adhumulon + humulon .....	112
Obrázek III-1: Odezvový profil pro metodu extrakce DLLME-SFO.....	113
Obrázek III-2: 3D vhodnostní profil pro metodu extrakce DLLME-SFO.....	114
Obrázek III-3: Odezvový profil pro metodu extrakce AA-LLME-SFO.....	115
Obrázek III-4: 3D vhodnostní profil pro metodu extrakce AA-LLME-SFO .....	116
Obrázek III-5: Odezvový profil pro metodu extrakce UA-LLME-SFO.....	117
Obrázek III-6: 3D vhodnostní profil pro metodu extrakce UA-LLME-SFO .....	118
Obrázek III-7: Odezvový profil pro metodu extrakce UA-DLLME-SFO.....	119
Obrázek III-8: 3D vhodnostní profil pro metodu extrakce UA-DLLME-SFO .....	120

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Body tání a tuhnutí nejčastěji využívaných extrakčních rozpouštědel u disperzní kapalinové mikroextrakce s tuhnoucí plovoucí kapkou [6,15].....	25
Tabulka 2: Obsah jednotlivých složek v chmelových šišticích [69] .....	46
Tabulka 3: Složky piva - obsah a množství látek [66].....	54
Tabulka 4: Složení ICE-3 standardu a retenční časy jednotlivých hořkých kyselin .....	63
Tabulka 5: Rovnice regrese s hodnotou koeficientu determinace jednotlivých kalibračních závislostí .....	66
Tabulka 6: Vypočtené směrodatné odchylky úseku a směrnice .....	66
Tabulka 7: Rovnice regrese s hodnotou koeficientu determinace jednotlivých kalibračních závislostí po extrakci.....	70
Tabulka 8: Vypočtené směrodatné odchylky úseku a směrnice v mg/ml pro kalibrační závislosti po extrakci.....	70
Tabulka 9: Hodnoty limitů detekce a kvantifikace pro přístroj a extrakci .....	71
Tabulka 10: Obsah $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Bakalář (n=6).....	82
Tabulka 11: Obsah $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Krušovice (n=6).....	83
Tabulka 12: Obsah $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Lobkowicz (n=6) .....	84
Tabulka 13: Obsah $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Postřižinské (n=6) .....	85
Tabulka 14: Obsah $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Primátor (n=6) .....	86
Tabulka 15: Obsah $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Svijany (n=6).....	87
Tabulka 16: Obsah $\alpha$ -hořkých kyselin v pivu značky Raven (n=6) .....	88
Tabulka IV-1: Podmínky pokusů pro optimalizaci extrakce DLLME-SFO a UA-DLLME-SFO .....	121
Tabulka IV-2: Podmínky pokusů pro optimalizaci extrakce AA-LLME-SFO a UA-LLME-SFO .....	122



## Úvod

Pivo se řadí mezi nejstarší nápoje. Je známé už od dob Mezopotámie, ale největší rozvoj zaznamenalo v 19. století. Je to alkoholický kvašený nápoj hořké chuti. Vyrábí se z ječmene, který je převáděn na slad, vody a chmele. Pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je prokvašován za vzniku ethanolu a oxidu uhličitého. Piva se nejčastěji dělí na spodně kvašená a svrchně kvašená, záleží na použitém typu kvasinek a teplotě kvašení. Nejrozšířenějším pivním stylem je spodně kvašený ležák vyráběný v České republice, ale po celém světě existuje spousta různých stylů pro výrobu piva. Lze tak kromě klasického piva nelézt např. pšeničná piva, trapistická piva, Porter nebo typ Ale. Na území České republiky je tento nápoj nejoblíbenější a od roku 2008 nese chráněné označení České pivo.

Hořké kyseliny jsou organické látky vyskytující se v chmelu. Při výrobě piva je chmel přidáván ve chmelovaru, kde dochází k přechodu těchto látek do mladiny. Při vyšší teplotě dochází k izomeraci těchto hořkých kyselin, které jsou zodpovědné za hořkou chuť piva. Chmelu existují různé odrůdy, které se mohou lišit složením, tedy i příspěvky k hořké chuti výsledného piva.

Cílem této práce je stanovení hořkých kyselin v pivu pomocí různých typů disperzní kapalinové mikroextrakce s následnou analýzou kapalinovou chromatografií a jejich porovnání v klasicky chmeleném pivu a v pivu chmeleném za studena.

# 1 Teoretická část

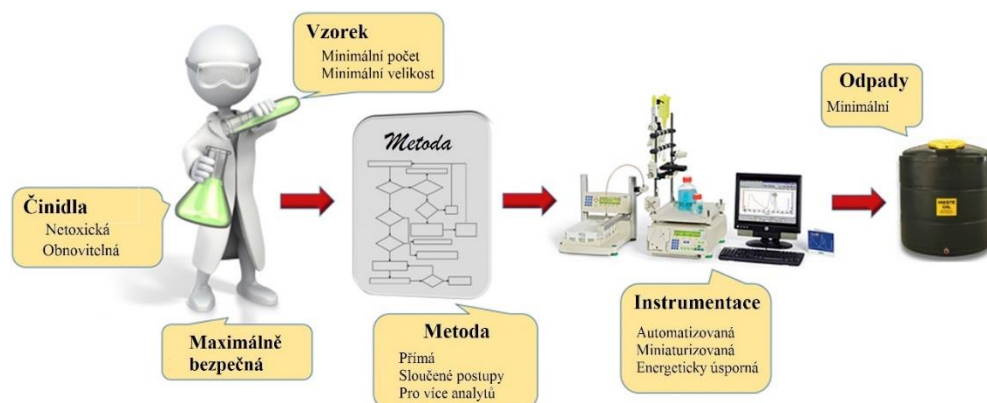
## 1.1 Kapalinová mikroextrakce

Analytický postup se skládá z několika kroků. Jedním z nejnáročnějších je příprava vzorku k analýze. Při zpracování vzorku k analýze je důležitým krokem odstranění nečistot, přebytečného množství matrice, čištění, izolace, zakoncentrování a separace stanovovaných analytů. K izolaci analytů je nejčastěji využíváno extrakčních technik kapalina-kapalina (LLE) a extrakce tuhou fází (SPE). Extrakce v systému kapalina-kapalina je jednou z nejstarších technik využívaných pro izolaci analytů v analytické chemii. Z důvodu práce s velkými objemy organických rozpouštědel, často zdraví škodlivých, velkého množství analyzovaného vzorku a časové náročnosti extrakce, byl kladen důraz zejména na vývoj rychlých, efektivních, ekonomických, přesných a citlivých metod pro dostatečné zakoncentrování i stopových množství analytů. Dalším požadavkem při vývoji nových extrakčních metod bylo minimalizování množství analytických operací a spotřeby zdraví škodlivých organických rozpouštědel. Tím došlo ke snížení nákladů na celou techniku, k miniaturizaci jednotlivých extrakcí, zlepšení kvality výsledků a zjednodušení celého procesu. Dále je vyžadována vysoká selektivita a urychlení celého procesu zakoncentrování a čištění vzorku. Nejdůležitějším požadavkem při vývoji je co nejnižší dopad na životní prostředí [1-8].

Mikroextrakce v kapalně fázi byla vyvinuta v polovině 90. let a její výhodou je spotřeba pouze mikrolitrových objemů rozpouštědla. V roce 1996 byla publikována kapalinová mikroextrakce využívající extrakce do jedné kapky, kdy ve velké vodní kapce je suspendována kapka organického rozpouštědla nemísitelného s vodou. V roce 1997 byla publikována mikroextrakce kapalnou fází (liquid phase microextraction, LPME) a mikroextrakce jednou kapkou (single drop microextraction, SDME) pro zakoncentrování analytů s malým množstvím organických rozpouštědel a minimalizací toxických účinků na lidský organismus. Základem metod mikroextrakce jednou kapkou je rovnovážná distribuce analytů mezi malým množstvím organického rozpouštědla a vodnou fází. Přestože jsou tyto techniky jednoduché a účinné, jejich nevýhodou je nízká stabilita kapky, která se velmi snadno rozpouští ve vzorku [5,6,9].

Kapalinová mikroextrakce využívá různých afinit analytu k vodnému vzorku a extrakčnímu organickému rozpouštědlu. Její výhodou je jednoduchost a rychlost provedení, snadná manipulace, malá spotřeba organických rozpouštědel, velký povrch mezi vodnou fází a extrakčním rozpouštědlem a tím je i zajištěn vysoký faktor obohacení. Některé vlastnosti kapalinové mikroextrakce splňují i podmínky zelené analytické chemie, jako jsou např. nízká

spotřeba vzorku a organického rozpouštědla, nízká spotřeba energie nebo málo odpadů. Všechny 12 zásad zelené analytické chemie je znázorněno na obrázku 1 [4,10,11].



Obrázek 1: 12 zásad zelené analytické chemie [11]

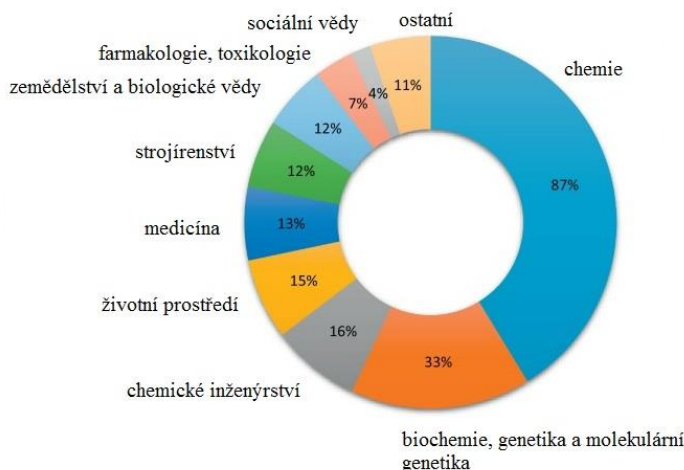
Disperzní kapalinová mikroextrakce (DLLME) byla poprvé publikována v roce 2006 pro extrakci polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a dalších organických pesticidů ve vzorcích vody s následnou analýzou pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID). Její výhody jsou jednoduchost provozu, rychlost, nízké náklady, vysoká návratnost a velký faktor obohacení. Tato extrakce byla vyvinuta z důvodu zvýšení účinnosti extrakce LPME. Použití DLLME zlepšuje limit detekce, minimalizuje efekt matrice při měření, snižuje množství odpadů a má nízké požadavky na činidla [1,4,5,10-12].

Od roku 2006 byla vydána řada publikací, ve kterých se autoři zabývají aplikací disperzní kapalinové mikroextrakce na další typy vzorků, jako jsou např. vzorky potravin a vzorky ze životního prostředí. Celkové zastoupení vzorků je znázorněno na obrázku 2 [10].



Obrázek 2: Zastoupení vzorků pro aplikaci disperzní kapalinové mikroextrakce [13]

Dále byla tato technika rozšířena nejen v rámci chemie a biochemie, ale i v genetice, molekulární biologii, chemickém inženýrství, analýze životního prostředí, medicíně, zemědělství, toxikologii, farmakologii a spoustě dalších odvětvích, které jsou znázorněny na obrázku 3 [2].



Obrázek 3: Využití DLLME v různých odvětvích [2]

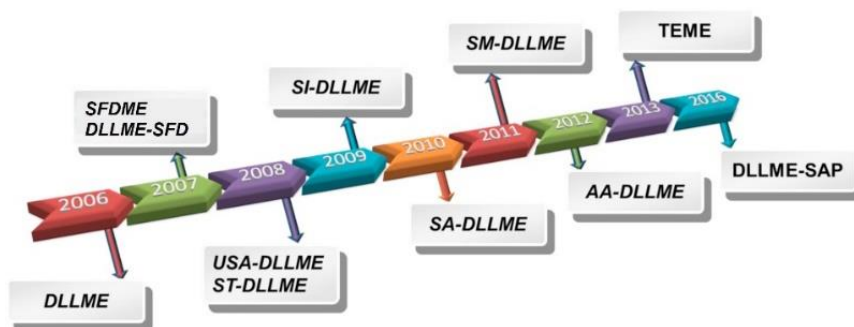
Bylo vyvinuto velké množství modifikací pro DLLME, které jsou založeny na využití míchání, asistované disperze, iontových rozpouštědel a rozpouštědel o různé hustotě v závislosti na hustotě vzorku. Ale je nutné rozlišovat pojem DLLME (dispersive liquid-liquid microextraction) a DLPME (dispersive liquid phase microextraction). Obě tyto techniky využívají disperze, ale DLLME využívá disperzního rozpouštědla a DLPME disperzi vytváří s využitím přídatných energií, jako např. ultrazvuk [10,14].

Často se při tvorbě disperze využívá ještě ultrazvuku, míchání, magnetického míchání, vzduchu, tvorbě bublinek v důsledku šumivé reakce, tlakového argonu, mikrovlnného záření, míchání třepáním nebo vyšší teploty. Dále jsou ke zvýšení efektivity extrakce přidávány povrchově aktivní látky, derivatizační činidla, chelatační činidla a iontpárové látky [14].

Dalšími modifikacemi disperzní kapalinové mikroextrakce je použití supramolekulární mikroextrakce, mikroextrakce v bodě zákalu, magnetických iontových kapalin, deemulzifikace, solí, nebo magnetických nanočástic. Některé tyto modifikace umožňují vynechání kroku odstředění [14].

Postupný vývoj jednotlivých modifikací v letech je vyznačen na obrázku 4, kde jsou znázorněny nejvyužívanější modifikace pro DLLME. Nejčastější rozdělení modifikací

DLLME techniky jsou znázorněny na obrázku 5, kde jsou metody děleny podle způsobu tvorby disperze na levé straně a podle hustoty organického rozpouštědla na straně pravé [13,15].

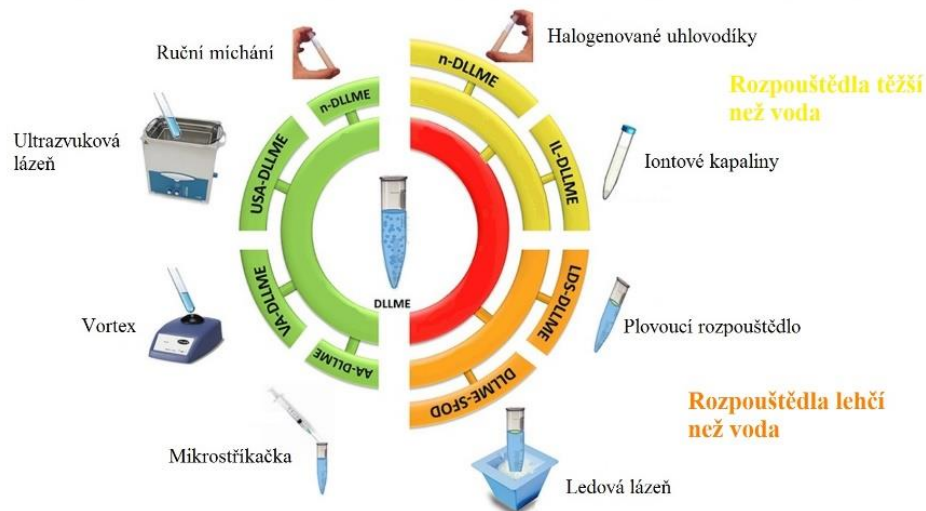


Obrázek 4: Postupný vývoj nejčastějších modifikací disperzní kapalinové mikroextrakce.

DLLME – disperzní kapalinová mikroextrakce; SFDME – mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky; DLLME-SFD – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky (častěji označovaná jako DLLME-SFO); USA-DLLME – ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce (častěji označována jako UA-DLLME); ST-DLLME – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ukončení disperze rozpouštědlem; SI-DLLME – sekvenční injekční disperzní kapalinová mikroextrakce; SA-DLLME – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající povrchově aktivních látek; SM-DLLME – supramolekulární disperzní kapalinová mikroextrakce; AA-DLLME – vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce; TEME – emulzní mikroextrakce bez organických rozpouštědel; DLLME-SAP – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí vodné fáze [15]

### Rozdělení podle disperzní techniky

### Rozdělení podle hustoty extrakčního činidla



Obrázek 5: Rozdělení modifikací DLLME podle tvorby disperze a podle hustoty extrakčního rozpouštědla  
*N-DLLME* – klasická disperzní kapalinová mikroextrakce; *USA-DLLME* (častěji označována *UA-DLLME*) – ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce; *VA-DLLME* – vortexem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce; *IL-DLLME* – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající iontové kapaliny; *LDS-DLLME* – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající rozpouštědla s nižší hustotou než je hustota vody; *DLLME-SFOD* (častěji označována *DLLME-SFO*) – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí kapky [13]

### 1.1.1 Mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky

Mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky (SFDME) byla popsána v roce 2007 pro extrakci polycyklických aromatických uhlovodíků pomocí 1-undekanolu. K vývoji této techniky přispěla nestálost kapky organického rozpouštědla na konci jehly u mikroextrakce jednou kapkou při míchání, kdy docházelo k rozpouštění a uvolňování při vyšších otáčkách. Jedná se o techniku rovnovážné mikroextrakce, kdy se kapička extrakčního rozpouštědla umístí na povrch promíchávaného roztoku magnetickým míchadlem, jak je znázorněno na obrázku 6. Po provedení extrakce se nechá extrakční rozpouštědlo ztuhnout a přenesení se k následné analýze. Tato technika byla také modifikována, kdy např. v roce 2010 byla vyvinuta metoda ultrazvukem asistovaná emulzifikační mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou (USAEME-SFD) využívající ultrazvuku v kombinaci se SFDME. Dále lze magnetické míchání nahradit využitím vortexu (VA-SFDME), disperzním rozpouštědlem (DLLME-SFO) nebo použitím povrchově aktivních látek (SA-SFDME) [6,7,16].



Obrázek 6: Provedení mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky [17]

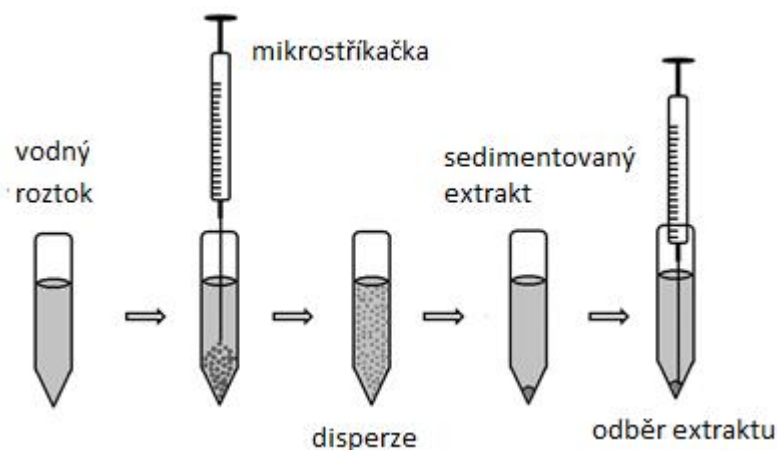
Koncentrace analytu v organickém roztoku se zvětšuje na určitý stupeň do dosažení rovnováhy a poté je konstantní. Výtěžnost extrakce je dána rozdělovacím koeficientem, objemem vzorku a objemem extrakční fáze. Pro SFDME je důležité míchání roztoku, které ovlivňuje také účinnost extrakce. Pokud je rychlost míchání příliš vysoká, může docházet k rozstříkávání jemných kapiček, což znesnadňuje oddělení extrakční fáze od vzorku. Ovlivnit účinnost míchání lze i objemem vzorku a z tohoto důvodu se nejčastěji využívají objemy v rozmezí 5–20 ml. Při vyšších objemech dochází ke snížení ploch píků, z důvodu nižší účinnosti míchání při stejných podmínkách. Dalším velmi důležitým parametrem je doba extrakce z důvodu účinnosti, přesnosti a citlivosti. Výhody metody SFDME jsou její jednoduchost, použitá rozpouštědla a vysoké faktory zakoncentrování. Metoda rovněž umožňuje možnost spojení jednostupňové derivatizace a extrakce, což vede ke zjednodušení

a zkrácení celkové doby analýzy. Díky tomu, že je pro extrakci brán vždy nový podíl extrakčního rozpouštědla, neexistuje zde paměťový efekt [6,7].

Účinnost extrakce je ale nižší v porovnání s disperzní kapalinovou mikroextrakcí z důvodu poskytování nejmenší možné mezifázové plochy, která je zvyšována tvorbou disperze kdy jsou vytvořeny malé kapičky. SFDME, využívající extrakci do jedné kapky extrakčního rozpouštědla na povrchu míchaného roztoku, je horší než DLLME-SFD, při které naopak dochází v roztoku k tvorbě disperze extrakčního rozpouštědla, v době extrakce a díky vysoké mezifázové ploše, protože extrakce nastává okamžitě, kdežto u SFDME je nutné míchání po určitou dobu [6].

### 1.1.2 Princip disperzní kapalinové mikroextrakce

Disperzní mikroextrakce je založena na tříložkovém systému rozpouštědel a skládá se ze dvou kroků. Prvním krokem je vytvoření disperze extrakčního rozpouštědla ve vodném roztoku vzorku umožňující rychlou extrakci analytů ze vzorku díky velké ploše pro extrakci a rychlému ustavení rovnováhy. Tvorbě disperze se napomáhá použitím disperzního rozpouštědla, které je společně s extrakčním rozpouštědlem prudce vstříknuto do vodného roztoku vzorku a po protřepání dochází k tvorbě jemných kapiček extrakčního rozpouštědla. Díky tomu vzniká velká plocha mezi extrakčním rozpouštědlem a vzorkem, což urychluje přenos analytu a snižuje tak dobu extrakce. Druhým krokem extrakce je odstředění roztoku, při kterém dojde k rozrušení disperze a umožnění odběru extraktu ze dna zkumavky, odkud bývá nejčastěji odebrán pomocí mikrostříkačky a přímo nastříknut do vhodného analytického přístroje. Byly ale popsány i extrakce, které byly prováděny přímo v injekční stříkačce nebo kapiláře. Jednotlivé tyto kroky jsou znázorněny také na obrázku 7 [1,4-6,10,13,14].



Obrázek 7: Jednotlivé kroky disperzní kapalinové mikroextrakce [18]

V prvních publikacích o DLLME bylo využito extrakční rozpouštědlo s vyšší hustotou, než je hustota vody. Těmito rozpouštědly jsou nejčastěji chlorovaná rozpouštědla, např. tetrachlorethylen, tetrachlormethan, chloroform, chlorbenzen, dichlormethan. Často využívaným rozpouštědlem je i sirouhlík. Tato rozpouštědla jsou ale toxická a nepolární. Z těchto důvodů byla tato technika dále modifikována. Byly hledány vhodnější rozpouštědla extrahující i polární analyty a rozpouštědla s hustotou nižší než je hustota vody [1,4,5,11].

Nejdůležitějšími parametry u výběru podmínek extrakce je typ disperzního a extrakčního rozpouštědla. Pro tvorbu disperze musí být splněno několik podmínek pro rozpouštědla. Při výběru disperzního rozpouštědla musí být splněna rozpustnost ve vodném prostředí. Nejčastěji se používá aceton, acetonitril, ethanol a methanol. Extrakční rozpouštědlo musí být naopak ve vodném prostředí nerozpustné, ale musí být rozpustné v disperzním rozpouštědle. Hustota rozpouštědla se musí lišit od hustoty vody pro snadné oddělení fází odstředěním. Ve vodném roztoku musí tvořit jemné kapičky (disperzi), kdy dochází k rovnoměrnému rozložení kapiček extrakčního rozpouštědla a tím i ke zvýšení extrakční účinnosti. Další podmínkou pro extrakční rozpouštědlo je jeho nízká těkavost, aby nedocházelo k odpařování a ztrátě rozpouštědla, čímž by mohla být ovlivňována rovnováha. Obě rozpouštědla by měla být levná a snadno dostupná pro snížení celkových nákladů na extrakci [1,2,15].

Dalším důležitým faktorem pro vysoké zakoncentrování analytu ze vzorku je vhodná kombinace objemů rozpouštědel, kdy bylo prokázáno že se zvyšujícím se objemem extrakčního rozpouštědla klesá obohacovací faktor extrakce a se zvyšujícím se objemem disperzního rozpouštědla se zvyšuje rozpustnost analytů ve vodném roztoku. Příliš nízký objem disperzního rozpouštědla ale způsobuje nedostatečnou tvorbu disperze a také snížení účinnosti extrakce. Nejčastěji využívané objemy u extrakcí jsou do 100  $\mu\text{l}$  extrakčního rozpouštědla a 200–800  $\mu\text{l}$  disperzního rozpouštědla. Důležitým parametrem je doba extrakce, která je definována jako časový interval mezi nástřikem směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla do vzorku a odstředěním roztoku. Dále se využívá optimalizace pH pro snížení ionizace, tím dochází i ke snížení rozpustnosti analytů ve vodné fázi a zvýšení účinnosti extrakce. Většinou se volí pH roztoku takové, aby bylo ionizováno co nejnižší množství analytů. Na druhou stranu ale může pH ovlivňovat i stabilitu analytů a oxidačně-redukční reakce, a proto je velmi důležité optimalizovat pH při extrakci [1,2,4,5,10,13,15].

Přídavek soli může zvýšit výtěžnost extrakce vzhledem k vysolovacímu efektu. Dochází ke zvýšení iontové síly a tím se sníží rozpustnost analytů a zlepšuje rozpustnost v organické fázi, ale může také snížit rychlost difúze, a tedy i účinnost extrakce. Při vyšších koncentracích přídavku soli může být omezen transport analytů díky zvýšení viskozity roztoku a tím je snížena



i difúze směrem k extrakčnímu rozpouštědлу. V některých případech nemá přídavek soli vliv na účinnost extrakce, ale v jiných případech může výrazně zlepšit účinnost extrakce vysušením roztoku a snížením rozpustnosti analytu ve vodném roztoku. Nejvíce využívanou solí je chlorid sodný, ale může být použit i síran hořečnatý nebo hydrogenfosforečnan sodný. Přídavek soli se většinou pohybuje v rozmezí od 1 do 30 % [4,6,7,15].

Někdy může být zkoumán i vliv teploty na extrakci, což může zlepšovat difúzi analytu mezi vodnou a organickou fází, ale teplota má i vliv na přesnost metody a ustavení rovnováhy. Z pohledu extrakční kinetiky by zvyšování teploty usnadňovalo difúzi a přenos analytů z vodného roztoku do extrakčního rozpouštědla, docházelo by i ke zkrácení extrakčního času k dosažení rovnováhy. Ke zvýšení teploty extrakčního roztoku se nejčastěji využívá vodní lázně. Vysoká teplota může ale také ovlivňovat rozpustnost organického rozpouštědla ve vodném prostředí nebo způsobovat jeho odpařování. Z těchto důvodů se nejčastěji využívá laboratorní teplota [7,15].

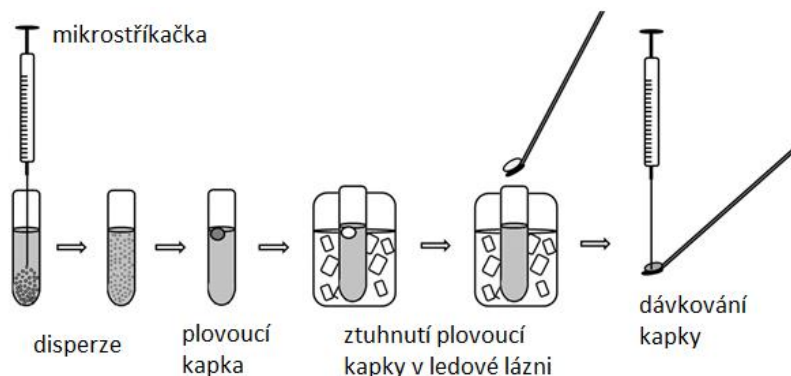
Měla by být zkoumána i kompatibilita extrakčního rozpouštědla s následnými kroky při analýze a analytickou instrumentací. Pokud není kompatibilita splněna, mělo by být organické rozpouštědlo odpařeno a analyt rozpuštěn ve vhodnějším rozpouštědle [13].

### 1.1.3 Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky

Využívá se stejného postupu jako při DLLME, ale extrakční rozpouštědlo má nižší hustotu, než je hustota vody. Jako extrakční rozpouštědlo pro tento typ extrakce bývá použita taková látka, která je při laboratorní teplotě kapalná, ale tuhne při vyšší teplotě než voda. Nejčastěji využívány jsou alkoholy 1-undekanol, 1-dodekanol, 1-hexanol, 1-oktanol, 1-dekanol a rozpouštědla hexadekan, m-xylen, cyklohexan nebo n-hexan. U vybraných rozpouštědel jsou body tání a hustota uvedeny v tabulce 1. Dalším rozdílem je ochlazení roztoku po odstředění a ztuhlé organické rozpouštědlo se odebere z povrchu vodného roztoku a nechá se před analýzou opět rozpustit při laboratorní teplotě. Jednotlivé kroky pro tento typ mikroextrakce jsou znázorněny na obrázku 8. Výhodou této extrakce je použití rozpouštědel s nízkou teplotou tání v rozmezí 10–30 °C. Nevýhodou této mikroextrakce je ale možnost přilnutí extraktu ke stěnám zkumavky nebo rozpadnutí ztuhlé kapičky na jemnější částice, což způsobuje obtížnější odběr ztuhlého extraktu a snížení jeho výsledného objemu [1,4,6,19].

Tabulka 1: Body tání a tuhnutí nejčastěji využívaných extrakčních rozpouštědel u disperzní kapalinové mikroextrakce s tuhnoucí plovoucí kapkou [6,15]

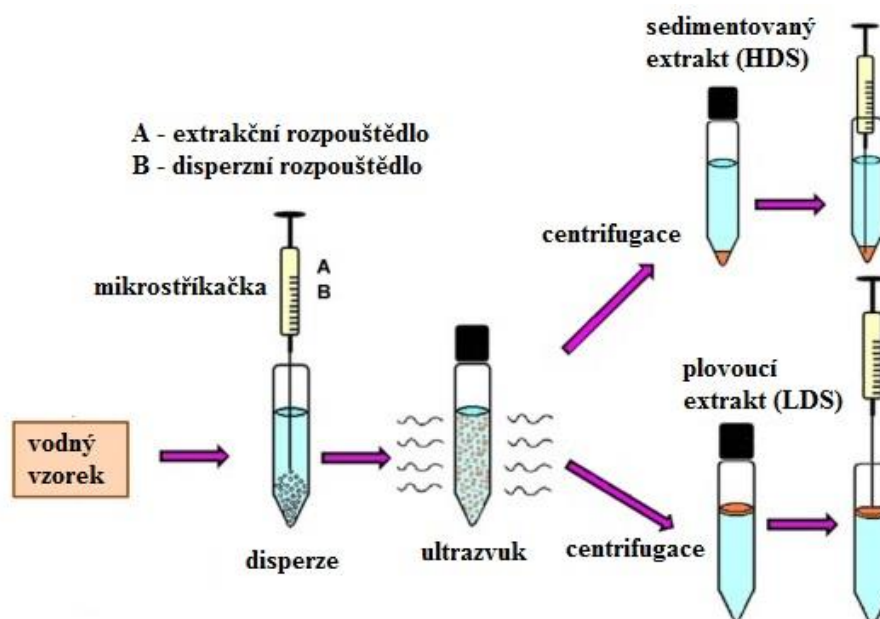
Název rozpouštědla	Bod tání [°C]	Hustota [g/ml]
1-undekanol	13–15	0,83
1-dodekanol	22-24	0,83
2-dodekanol	17-18	0,80
1-dekanol	6,4	0,83
n-hexadekan	18	0,77
Cyklohexanol	25,9	0,96



Obrázek 8: Jednotlivé kroky disperzní kapalinové mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky [18]

#### 1.1.4 Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce

Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívá pro tvorbu disperze ultrazvuku, jak je znázorněno na obrázku 9. První využití ultrazvuku v kapalně mikroextrakci bylo popsáno v roce 2006. S disperzní kapalinovou mikroextrakcí byl poprvé spojen v roce 2009 pro extrakci kadmia ze vzorků vody. Tuto extrakci lze využít ve spojení s LDS (extrakční rozpouštědlo s nižší hustotou) nebo HDS (extrakční rozpouštědlo s vyšší hustotou). Dále lze ultrazvukem asistovanou disperzní kapalinovou mikroextrakci spojit s teplotně řízenou disperzní kapalinovou mikroextrakcí, vzduchem asistovanou disperzní kapalinovou mikroextrakcí nebo disperzní kapalinovou mikroextrakcí s iontovými kapalinami. Její výhodou je snižování doby extrakce a zvyšování výtěžků [20-22]

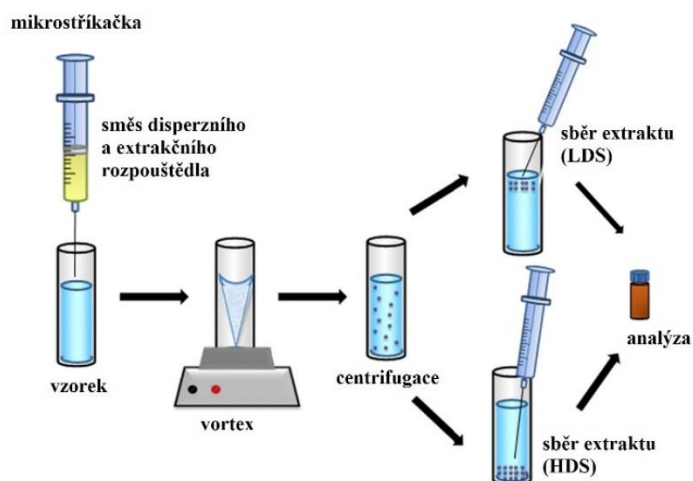


Obrázek 9: Uspořádání pro ultrazvukem asistovanou disperzní kapalinovou mikroextrakci  
 LDS – extrakční rozpouštědlo s nízkou hustotou; HDS – extrakční rozpouštědlo s vyšší hustotou [21]

Vlivem ultrazvukových vln dochází k usnadnění tvorby emulze, homogenizace a urychluje přenos analytů mezi nemísitelnými fázemi. Využívá se rozptýlení extrakčního rozpouštědla účinkem ultrazvuku do jemných kapiček pro účinnější a rychlejší extrakci analytů ze vzorku vlivem lepšího rozptýlení kapiček extrakčního rozpouštědla a urychlení přenosu analytů z vodné fáze do extrakčního rozpouštědla. Ultrazvukové vlny mohou nahrazovat disperzní rozpouštědlo nebo může být ultrazvuk použit společně s disperzním rozpouštědlem. Byla prokázána vyšší extrakční účinnost oproti klasickému ručnímu míchání v disperzní kapalinové mikroextrakci [6,13,23,24].

#### 1.1.5 Vortexem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce

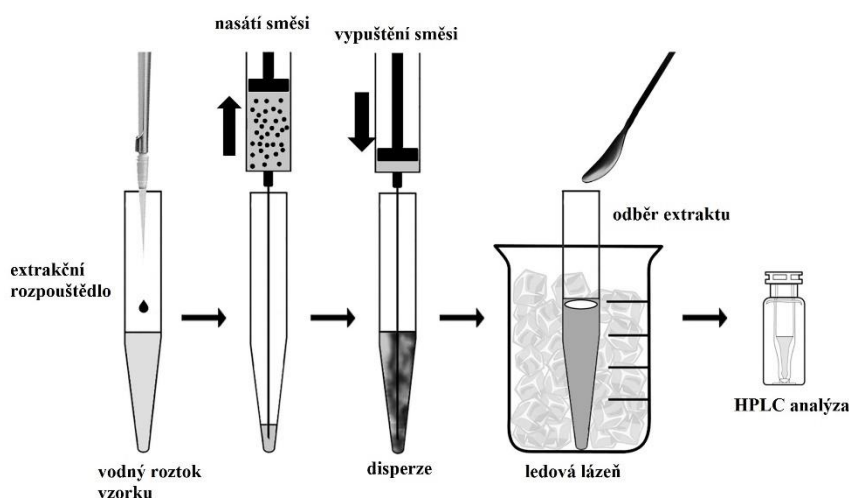
Vortexem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce byla poprvé publikována v roce 2013. Vzorek je mechanicky míchán za použití vortexu, kdy dochází k tvorbě víru, jak je znázorněno na obrázku 10, a tím dochází k tvorbě disperze extrakčního rozpouštědla. Může být využito i disperzní rozpouštědlo, ale není to podmínkou. Tvorba víru zvyšuje extrakční účinnost a byla prokázána i vyšší účinnost ve srovnání s tvorbou disperze u ultrazvuku a klasického uspořádání v disperzní kapalinové mikroextrakci. Při využití vortexu lze dosáhnout urychlení extrakce oproti klasické DLLME při dosažení srovnatelné účinnosti [13,25,26].



Obrázek 10: Provedení vortexem asistované disperzní kapalinové mikroextrakce s extrakčním rozpouštědlem s vyšší hustotou než je hustota vody (HDS) a s extrakčním rozpouštědlem s hustotou nižší než je hustota vody (LDS) [22]

### 1.1.6 Vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce

Vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce byla vyvinuta v roce 2012 pro extrakci esterů kyseliny ftalové ze vzorků vod. Přidávaný vzduch podporuje proces extrakce. Jedná se o velmi ekologické a levné spojení zvyšující účinnost. Disperze extrakčního rozpouštědla je vytvářena rychlým nasátím směsi vodného roztoku a rozpouštědla do stříkačky s částí vzduchu a jeho opětovného vstříknutí zpět do zkumavky, jak je znázorněno na obrázku 11. Tyto kroky jsou opakovány až do vzniku zakaleného roztoku díky vzduchovým bublinám. Tato technika nevyužívá přidání disperzního rozpouštědla, které může snižovat rozdělovací koeficient mezi analytem a extrakčním rozpouštědlem a tím i snižovat účinnost extrakce [13,27-29].



Obrázek 11: Provedení vzduchem asistované disperzní kapalinové mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou [30]

### 1.1.7 Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající iontových kapalin

Iontové kapaliny jsou organické nemolekulární kapaliny tvořeny z kombinace velkých organických kationtů a různých organických nebo anorganických aniontů obsahující různé funkční skupiny. Jejich fyzikální vlastnosti, např. tenze par, rozpustnost v organických a anorganických rozpouštědlech nebo vysoká tepelná stabilita, závisí zejména na konstrukci, velikosti a uspořádání molekuly [2,19].

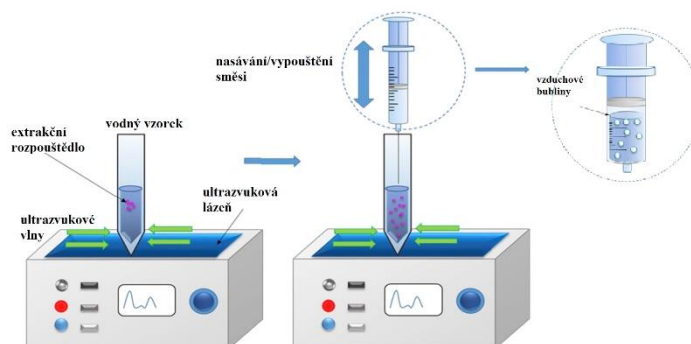
Iontové kapaliny jako extrakční rozpouštědla používaná pro DLLME mají většinou vyšší hustotu než je hustota vody. Po odstředění jsou na dně extrakční nádoby, což vede ke snadnější manipulaci a odběru extraktu než u mikroextrakcí s plovoucími rozpouštědly. Dále pro tato rozpouštědla platí, že nesmí být mísitelná s vodnou fází. Využívají se tedy nejčastěji rozpouštědla obsahující hexafluorofosátové ionty. Jedná se o polární látky. Jejich velkou výhodou je opětovné použití po předchozí izolaci a ionizaci. Další velkou výhodou je jejich variabilita, kdy lze vybrat vhodný iont s příslušnými vlastnostmi, které jsou potřebné pro výběr extrakčního rozpouštědla pro použití při DLLME. Kromě toho jsou využívány i pro mikroextrakci s jednou kapkou, kapalinovou mikroextrakci, mikroextrakci tuhou fází a extrakci tuhou fází. Pro tvorbu disperze není využito disperzní rozpouštědlo a tvorba disperze je prováděna pomocí ultrazvuku nebo se využívá i ohřevu vzorku (= teplotně řízená iontová disperzní kapalinová mikroextrakce) [1,2].

U IL-DLLME je využíváno 6 různých přístupů: konvenční, s řízenou teplotou, s ultrazvukem, s využitím mikrovln, vortex a in-situ. V těchto přístupech může být využito organické rozpouštědlo, povrchově aktivní činidlo nebo hydrofilní iontové látky. U in-situ IL-DLLME se využívá jako extrakční rozpouštědlo hydrofilní iontová kapalina, která se po přidavku anion-výměnného činidla mění na hydrofobní a dochází tak k samovolnému oddělení fází [2,19].

### 1.1.8 Spojení ultrazvukem asistované a vzduchem asistované disperzní kapalinové mikroextrakce

Spojení ultrazvukem asistované a vzduchem asistované disperzní kapalinové mikroextrakce napomáhá k rychlejšímu vytváření disperze tvořené velmi jemnými kapičkami extrakčního rozpouštědla. Tato mikroextrakce kombinuje ultrazvuk a vzduchem asistovanou mikroextrakci, kdy se do zkumavky vstříkne extrakční rozpouštědlo a vloží se do ultrazvuku. Současně se provádí nasávání do stříkačky a vypouštění zpět do zkumavky, jak je znázorněno na obrázku 12. Díky ultrazvuku a přidávanému vzduchu se zvětšuje plocha mezi extrakčním

rozpouštědlem a vodným roztokem a zvyšuje se účinnost extrakce. Podle použitého typu extrakčního rozpouštědla je po odstředění odebrán extrakt nebo je zkumavka ještě vložena do ledové lázně pro ztuhnutí extraktu. Ultrazvuk je zde využíván pro urychlení tvorby jemných kapiček a pro urychlení extrakční rovnováhy [22,28].

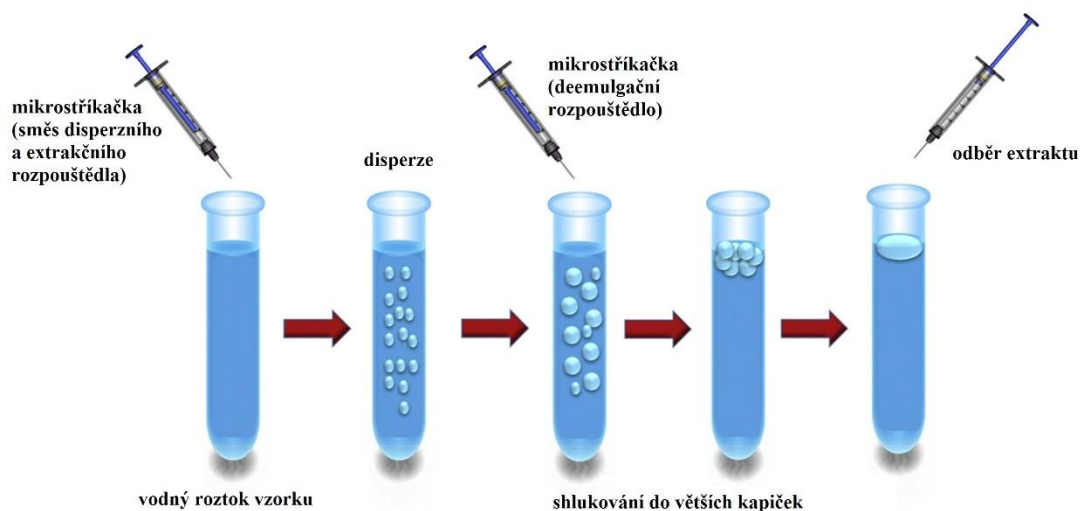


Obrázek 12: Provedení disperzní kapalinové mikroextrakce kombinující ultrazvuk a vzduch [22]

### 1.1.9 Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající rozrušení disperze rozpouštědlem

Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající rozrušení disperze pomocí rozpouštědla (ST-DLLME) byla zavedena v roce 2010. Využívá stejného postupu jako klasická DLLME, ale pro rozrušení disperze je vstříknuto deemulgační rozpouštědlo vyvolávající rychlou separaci organické a vodné fáze, což nahrazuje celý proces odstředění. Výhodami této techniky je zkrácení celkové doby potřebné pro extrakci, ale největší výhodou je lepší možnost automatizace [11,31].

Při vstříknutí směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla dochází k tvorbě disperze. Přidáním deemulgačního rozpouštědla přecházejí drobné kapičky extrakčního rozpouštědla ve větší, dokud se nespojí do jedné fáze, která se podle hustoty extrakčního rozpouštědla usadí buď na dně zkumavky nebo na povrchu vodného roztoku, jak je znázorněno na obrázku 13 [11].



Obrázek 13: Provedení disperzní kapalinové mikroextrakce rozrušení rozpouštědlem s využitím extrakčního rozpouštědla o hustotě nižší než je hustota vody [11]

Při optimalizaci této techniky je nutné zahrnout všechny podmínky ovlivňující účinnost extrakce u klasické DLLME, ale navíc je nutné optimalizovat typ a objem deemulgačního rozpouštědla i dobu potřebnou k rozrušení disperze vzhledem k účinnosti extrakce. Doba deemulgace je definována jako časový interval mezi vstříknutím deemulgačního rozpouštědla a odběrem extraktu. Účinnost oddělení fází může také ovlivňovat i rychlost míchání roztoku, teplota, viskozita roztoku, ale i přítomnost možných nečistot. Deemulgační rozpouštědlo by mělo mít vysokou povrchovou aktivitu, nízké povrchové napětí pro indukci separace fází a nemělo by být mísitelné s extrakčním rozpouštědlem, aby nedocházelo ke zvyšování objemu extraktu, a tedy i snížení zakoncentrovávacího faktoru. Dále by mělo splňovat podmínky zelené analytické chemie, tedy být levné, bezpečné, ekologické a použitelné v malém objemu. Nejčastěji se jako deemulgační rozpouštědlo využívá přídavek dalšího podílu disperzního rozpouštědla, ale může být použita i jakákoliv jiná látka splňující podmínky pro použití. Pokud je přidáno stejné rozpouštědlo pro disperzi a deemulgaci, dochází nejprve k posílení disperze, ale poté následuje rychlé rozdělení fází [11,31].

Podle typu extrakčního rozpouštědla se dále tato technika dělí na LDS-ST-DLLME s využitím extrakčního rozpouštědla s nižší hustotou, než je hustota vody (toluen, xylen, nebo 1-oktanol) a HDS-ST-DLLME využívající rozpouštědlo s vyšší hustotou. Tuto techniku lze spojit i s DLLME-SFO a s jinými přístupy tvorby disperze, než je klasické třepání, jako ultrazvuk, mechanické míchání, využití promíchání vzduchem nebo lze použít i iontové kapaliny. Tato extrakce je nejčastěji využívána pro stanovení anorganických i organických analytů ve vodě a biologických materiálech [11].

### 1.1.10 Disperzní kapalinová mikroextrakce s šumivou reakcí

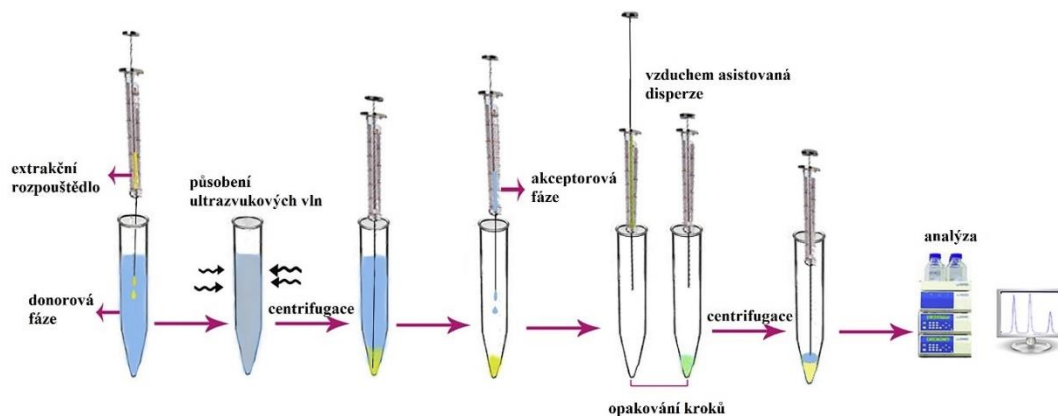
Disperzní kapalinová mikroextrakce s tvorbou disperze pomocí šumivé reakce byla vyvinuta pro stanovení fungicidů v jablečné šťávě. Tato modifikace disperzní kapalinové mikroextrakce využívá tvorby disperze pomocí šumění, kdy dochází k rozkladu uhličitanu nebo hydrogenuhličitanu pomocí kyseliny za tvorby bublinek oxidu uhličitého. Činidlo způsobující šumění je šetrné k životnímu prostředí, neinterferuje s analyty a způsobuje pouze zanedbatelnou změnu pH roztoku. Do optimalizace musí být ještě kromě podmínek klasické DLLME zahrnut objem šumivé směsi a její složení. Tuto modifikaci lze využít i ve spojení s plovoucí tuhnoucí organickou kapkou [32,33].

### 1.1.11 Reverzní disperzní kapalinová mikroextrakce

Reverzní DLLME se využívá pro stanovení polárních analytů, které nelze klasickou metodou DLLME extrahovat z důvodu použití nepolárních organických rozpouštědel. Jako extrakční rozpouštědlo se tedy využívá polární látka, nejčastěji malé množství vody nebo vodného roztoku pufru. To je dispergováno do organického roztoku vzorku s hustotou lehčí než voda, např. toluen [34-36].

### 1.1.12 Tandemová disperzní kapalinová mikroextrakce

Provádí se dvě po sobě jdoucí disperzní kapalinové mikroextrakce, jak je znázorněno na obrázku 14. Díky tomuto typu extrakce dochází ke zvýšení účinnosti extrakce analytů. Nejčastěji se využívá v jednom stupni extrakce z alkalického roztoku a v druhém stupni z kyselého roztoku. Mohou být kombinovány dva různé přístupy pro tvorbu disperze nebo zopakován stejný přístup [8,37].

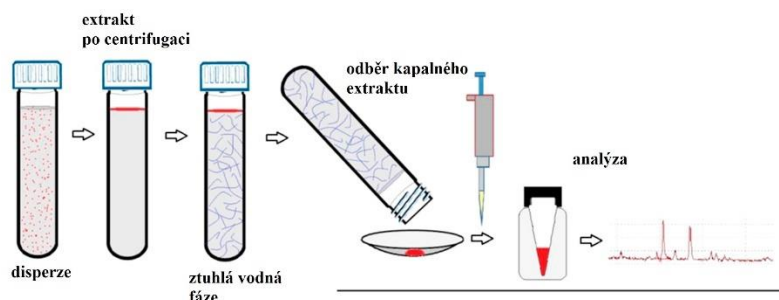


Obrázek 14: Provedení tandemové disperzní kapalinové mikroextrakce [8]



### 1.1.13 Disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí vodnou fází

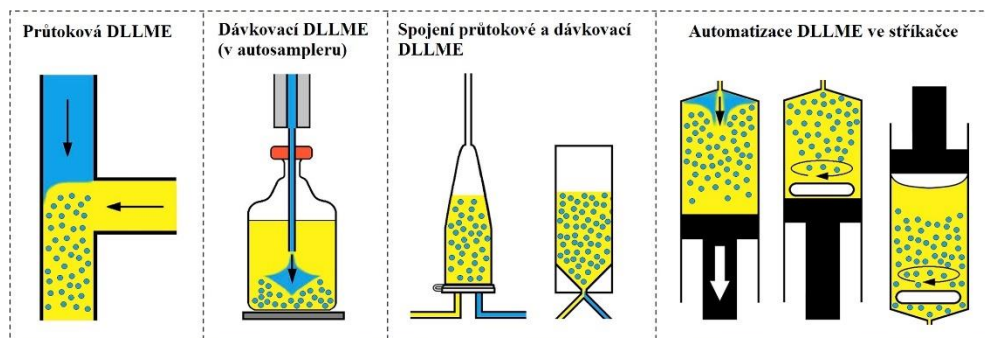
Disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí vodnou fází využívá ztuhnutí vodné fáze vzorku po odstředění namísto organické kapky. Kapalným organickým extrakt je následně odebrán k analýze, jak je znázorněno na obrázku 15. Pro výběr extrakčního rozpouštědla by měla být sledována teplota tání, aby nedocházelo k tuhnutí organického rozpouštědla, dále schopnost extrakce, toxicita a vhodnost v následné analýze [38].



Obrázek 15: Provedení disperzní kapalinové mikroextrakce s tuhnoucí vodnou fází [38]

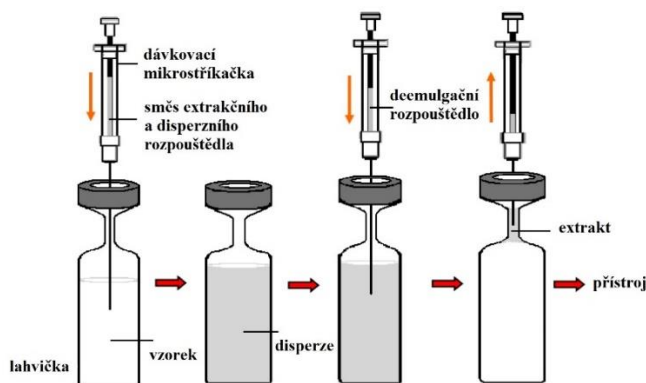
### 1.1.14 Automatizace v disperzní kapalinové mikroextrakci

Automatizace disperzní kapalinové mikroextrakce je velmi náročný proces. Kromě optimalizace všech potřebných parametrů vybraného typu disperzní kapalinové mikroextrakce vyžaduje i optimalizaci automatizace. Nejvíce brání proces odstředění, který lze nahradit využitím deemulgačního činidla, které rozruší emulzi a vyvolá fázové rozdělení. Dalším způsobem nahrazení odstředění je sedimentace indukované vrstvy. Odstraněním kroku odstředění se sníží i celková doba extrakce. Výhodou automatizace je minimalizace chyb spojených s manipulací při sběru extraktu a operacích s ním, snížení spotřeby vzorku a rozpouštědel, zlepšení přesnosti a citlivosti metody. Provádí se pomocí automatického dávkování nebo průtokových technik (např. průtokové injekční analýzy (FIA) nebo sekvenční injekční analýzy (SIA) a automatizace v injekční stříkačce). Různé metody automatizace jsou znázorněny na obrázku 16 [39-41].



Obrázek 16: Různé typy automatizace disperzní kapalinové mikroextrakce [41]

S využitím automatického dávkování byla automatizována metoda disperzní kapalinové mikroextrakce. Lahvička, ve které byla prováděna extrakce, je umístěno do dávkovače. Pomocí dávkovací jehly je prudce vstříknuta směs disperzního a extrakčního rozpouštědla. Po proběhnutí doby extrakce je do lahvičky přidáno deemulgační rozpouštědlo. Po rozdělení fází je extrakt o hustotě nižší než je hustota vody vytlačen do úzkého hrdla (znázorněno na obrázku 17), což umožňuje snadnější nadávkování extraktu do přístroje. Tato automatizace vyžaduje některé manuální kroky, jako je např. výměna lahviček a jejich doplňování. Ale umožňuje zpracování více vzorků naráz [41,42].



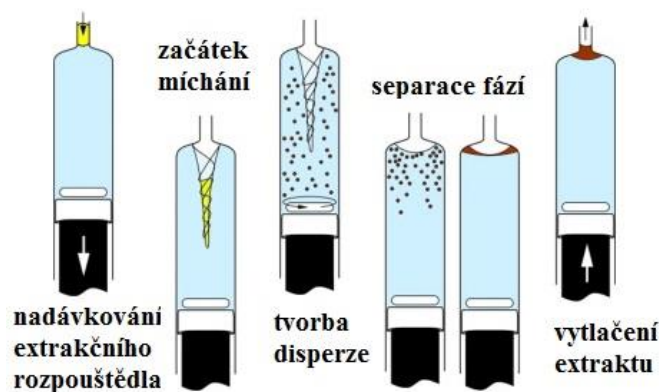
Obrázek 17: Schéma automatizace v automatickém dávkovači [42]

Druhým způsobem automatizace jsou průtokové metody, které využívají nadávkování směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla do kontinuálního toku vodného vzorku. Fáze jsou děleny v průběhu toku, kdy jsou kapičky extraktu zadržovány na hydrofobním sorbentu. První automatizace byla provedena v roce 2009 pomocí SIA. Využívá on-line sekvenčního vstřikovacího systému pro vzduchem asistovanou disperzní kapalinovou mikroextrakci ve spojení s plamenovou atomovou absorpční spektrometrií (FAAS). Nejprve je do držáku

zaváděn vzduch, extrakční a disperzní rozpouštědlo. Následuje vytvoření disperze. Extrakt je uchováván v kolonce obsahující sorbent, ze které je následně eluován do přístroje. Pomocí sestavy FIA byl v roce 2010 částečně automatizován proces mikroextrakce. Proces vyžaduje manuální nadávkování chelatačního činidla, iontové kapaliny a roztoku vzorku. Následuje plně automatizovaná tvorba disperze, oddělení fází v ledové lázni a nadávkování do elektrotermické atomové absorpční spektrometrie (ETAAS). Výhodou těchto automatizací je možnost kontinuálního toku vzorku a tvorba komplexů před vlastním provedením disperzní kapalinové mikroextrakce [41,43,44].

Spojení průtokové a dávkovací automatizace v DLLME je složeno z dávkovací lahvičky, která je propojena s průtokovým systémem. V lahvičce probíhají všechny kroky při zastaveném průtoku, ale je nutné míchání roztoku pomocí magnetického míchadla. Pomocí průtokových operací jsou do lahvičky přiváděny a odváděny potřebné kapaliny [41].

Automatizace ve stříkačce využívá uzavřeného extrakčního prostoru. Výhodou je automatizovatelné nastavení velikosti prostoru. Poprvé byla plně automatizovaná metoda s využitím stříkačky publikována v roce 2011 ve spojení s disperzní kapalinovou mikroextrakcí využívající extrakční rozpouštědlo lehčí než voda. Další vývoj pro tuto automatizaci byl v roce 2013, kdy bylo poprvé publikováno míchání pomocí magnetického míchadla ve stříkačce, jak je znázorněno na obrázku 18 [41,45,46].



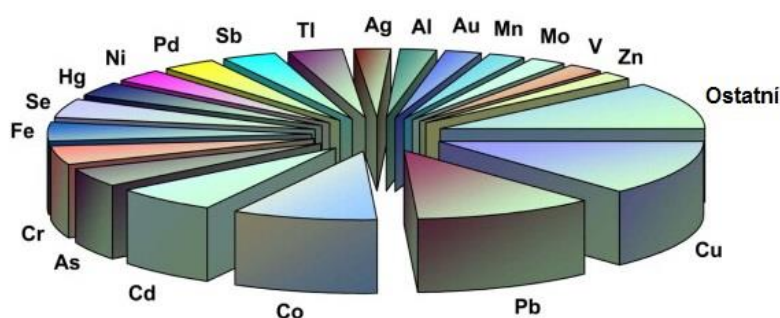
Obrázek 18: Provedení magnetického míchání ve stříkačce [46]

#### 1.1.15 Možnosti kombinace se separačními a spektrálními technikami

Disperzní kapalinovou mikroextrakci a její modifikace lze použít ke stanovení různých organických sloučenin a kovových iontů. Extrakce je kompatibilní s HPLC. Jedná se o velmi vhodné spojení, protože používaná extrakční rozpouštědla lze přímo vstříknout do přístroje bez

dalších úprav. Lze ji využít ale i ve spojení s plynovou chromatografií a kapilární elektroforézou. V některých publikacích je doporučeno před analýzou separačními technikami ředění extrakční fáze z důvodu vyšší viskozity. Je nutné vybírat extrakční rozpouštědla kompatibilní s instrumentací. Pro některé analyty nevhodné pro stanovení pomocí plynové chromatografie nebo nedetekovatelné vybranou spektrální technikou se využívá derivatizace před DLLME nebo postkolonová derivatizace. Nejčastěji stanovovanými kontaminanty v potravinách jsou pesticidy [1,3,6,7,10].

Pro stanovení kovů ve vzorcích se využívá přidavku chelatačního činidla, kdy jsou ionty extrahovány do extrakčního činidla ve formě komplexu a následně se analyzují pomocí Atomové absorpční spektrometrie s grafitovou pecí (GF-AAS) nebo plamenovou atomovou absorpční spektrometrií (FAAS). Nevýhodou je nutná optimalizace teploty grafitové pece pro zvýšení citlivosti a přesnosti stanovení a snížení interferencí. U FAAS je velmi důležité zvolit vhodné organické rozpouštědlo pro zavedení do plamene. Nejčastěji stanovované prvky jsou na obrázku 19 [1,6,7].



Obrázek 19: Nejčastěji stanovované kovy pomocí AAS a příbuzných metod [7]

#### 1.1.15.1 Příklady spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Pro extrakci triazinových herbicidů a triazolových fungicidů ve vodě a hroznovém džusu byla využita disperzní kapalinová mikroextrakce využívající k tvorbě disperze šumivé reakce. Směsný roztok methanolu, kyseliny citronové a 1-undekanolu byl rychle nadávkován na dno roztoku vzorku, ve kterém byl předem rozpuštěn uhličitán sodný a chlorid sodný. Při reakci došlo k vytvoření oxidu uhličitého, který se uvolňoval a vytvářel disperzi. Po odstředění byla vzniklá kapka na povrchu vodného roztoku odebrána, naředěna methanolem a k analýze bylo využito spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. V tomto článku byla vyvinuta nová metoda mikroextrakce poskytující nízké limity detekce, opakovatelnosti a dobrou linearitu [33].

Dalším příkladem spojení je metoda odstředivé disperzní kapalinové mikroextrakce pro extrakci sudanových barviv z vodných a potravinových vzorků. Tato mikroextrakce je založena na efektu vysychání, kdy po provedení extrakce je z důvodu oddělení fází roztok přefiltrován přes patronku obsahující chlorid sodný. Po přidání 1-undekanolu jako extrakčního rozpouštědla byla disperze vytvářena pomocí opakovaného nasávání a vypouštění zpět do zkumavky. Po získání dostatečné disperze byla směs přefiltrována přes patronku. Jemné kapičky extrakčního rozpouštědla byly shromažďovány jako samostatná vrstva a po ztuhnutí v lázni s ledovou vodou byl 1-undekanol odebrán. Výsledné extrakty byly po roztátí extraktu analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Tento článek popisuje novou metodu mikroextrakce bez využití odstředění. Tato metoda byla také využita pro extrakci sudanových barviv ze vzorků kurkumy, chilli omáčky a vzorků odpadních vod [47].

Stanovení antidepresiva venlafaxin bylo provedeno pomocí disperzní kapalinové mikroextrakce ve vzorcích vody z životního prostředí. K extrakci byla vybrána směs acetonitrilu a chloroformu jako disperzního a extrakčního činidla v poměru 1:2. Roztok byl mechanicky promíchán pro tvorbu disperze. Po odstředění byla sedimentovaná fáze odebrána ze dna zkumavky, vysušena proudem dusíku a rozpuštěna ve vodě. Analýza byla provedena pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Použitá metoda je rychlá, má nízké náklady a spotřeby organických rozpouštědel a umožňuje použití pro více typů vzorků, nejen pro vodu. Bylo prokázáno, že tato metoda není ovlivněna komplexní maticí ve vodě z čistírny odpadních vod [48].

Stanovení formaldehydu v kosmetických výrobcích uvolňujícího se z konzervačních látek bylo provedeno pomocí disperzní kapalinové mikroextrakce s reverzní fází (RP-DLLME) umožňující extrakci vysoce polárních látek. K extrakci byl použit toluenový roztok vzorku, směs vody a acetonitrilu jako extrakční a disperzní rozpouštědlo. Pro analýzu bylo zvoleno spojení kapalinové chromatografie s derivatizací pro UV/VIS detekci. Jako derivatizační činidlo byl použit pentan-2,4-dion v octanu amonném pro derivatizaci na 3,5-diacetyl-1,4-dihydrotoluidin s absorbcí při 407 nm. Byla optimalizována metoda disperzní kapalinové mikroextrakce poskytující vysoké obohacovací faktory. Byly stanoveny nízké limity detekce, dobrá linearita a opakovatelnost. Ve výsledku byla navržena metoda pro kontrolu množství formaldehydu v prodáváných kosmetických výrobcích [34].

Pro sledování léčiv v lidské plazmě a odpadních vodách byla zvolena metoda tandemové disperzní kapalinové mikroextrakce. Vzorky byly nejprve upraveny pro odstranění interferencí a vlivu matrice. V prvním stupni tandemové mikroextrakce byl pro tvorbu disperze použit ultrazvuk a v druhém stupni, provedeném po odstředění, bylo využito promíchávání pomocí

vícenásobného nasátí a vypuštění z injekční stříkačky. Jako extrakční rozpouštědlo byl vybrán tetrachlormethan. Získané extrakty byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Pomocí tandemové disperzní kapalinové mikroextrakce bylo dosaženo ve velmi krátké době vysoké účinnosti extrakce s nízkými limity detekce a kvantifikace. U této metody mikroextrakce bylo dosaženo vysokých hodnot zakoncentrování [8].

Stanovení N-nitrosaminů obsažených v potravinách bylo provedeno pomocí ultrazvukem asistované disperzní kapalinové mikroextrakce. Pro extrakci byla zvolena směs chloroformu a acetonitrilu jako extrakčního a disperzního rozpouštědla. Extrakty byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie a detekovány fluorescenčním a hmotnostním detektorem. Tato metoda prokázala nižší limity detekce než dosud používané metody pro stanovení N-nitrosaminů. Další výhodou použití této metody pro kontrolu potravin je její rychlost a jednoduchost provedení a výborná selektivita [49].

Pro stanovení benzylmočovinových insekticidů ve vzorcích vod a čajů byla použita disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhneoucími iontovými kapalinami. Do roztoku vzorku byla dispergována nerozpustná kvartérní amoniová sůl. Po provedení extrakce byla po přidavku činidla změněna povaha na hydrofobní a dochází k oddělení fází. Výsledné extrakty po ztuhnutí a odebrání byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Použití iontových kapalin urychluje přípravu vzorku, protože dochází současně k extrakci analytu a tvorbě extrakčního činidla. Další výhodou této metody je snadnější oddělení extraktu bez nutnosti odstředění [19].

Plně automatická metoda disperzní kapalinové mikroextrakce, využívající spojení průtokového a dávkovacího principu s magnetickým mícháním, byla použita ke stanovení kofeinu v kávě a nápojích. Jako extrakční rozpouštědlo byl vybrán dichlormetan. Výsledný extrakt byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Tento postup je výhodný pro stanovení v rutinní praxi, protože se jedná o rychlé, jednoduché a plně automatizované zařízení. Lze ho využít nejen pro kontrolu obsahu kofeinu v nápojích, ale i pro kontrolu kvality kávy [50].

Disperzní kapalinová mikroextrakce s reverzní fází byla použita pro stanovení N-nitrosodietanolaminu v kosmetických výrobcích. Sledovaná látka byla extrahována do vody s pomocí acetonu jako disperzního rozpouštědla z toluenového roztoku vzorku. Výsledný extrakt byl nejprve separován pomocí kapalinové chromatografie a následně derivatizován za vzniku azobarviva detekovaného pomocí UV/VIS detektoru. U této metody bylo prokázáno, že vliv matrice vzorku nemá vliv na stanovení analytu. Metoda byla ověřena u vzorků s různou

povahou (hydrofilní, lipofilní vzorky). Bylo dosaženo velkého zlepšení citlivosti na rozdíl od metody, která je dána pro stanovení N-nitrosodietanolaminu normou [36].

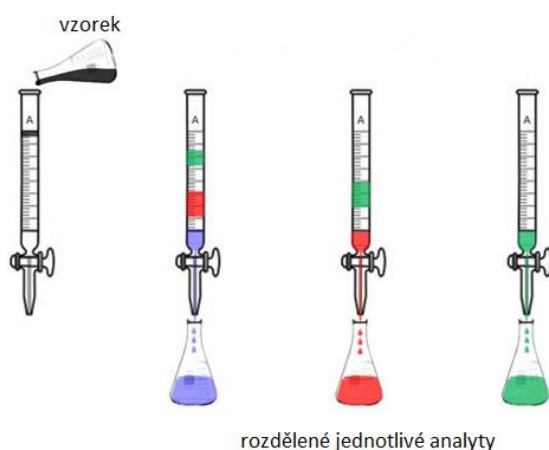
Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající disperzní rozpouštědlo s výměnnou polaritou byla využita pro stanovení ochratoxinu v kuřecím masu. K extrakci byla využita směs dichlormetanu (extrakčního rozpouštědla) a akrylové kyseliny (disperzní rozpouštědlo), která byla prudce vstříknuta do alkalického roztoku vzorku. Disperzní rozpouštědlo bylo rozpuštěno ve vodném roztoku a napomáhá tak tvorbě disperze. Díky alkalickému prostředí došlo k převedení akrylové kyseliny na rozpustnou sůl a k fázové separaci. Tento proces byl navíc automatizován s využitím průtokového systému a přímo spojen s kapalinovou chromatografií a fluorescenční detekcí. Při použití této metody je odstraněn negativní vliv běžně využívaných disperzních rozpouštědel na rozpustnost analytu ve vodné fázi. Nevýhodou této extrakce je její použití pouze v alkalickém a neutrálním prostředí [51].

Ve vzorcích červeného vína, bílého vína a piva byly stanovovány organofosfáty pomocí disperzní kapalinové mikroextrakce s vortexem a kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Byla navržena spolehlivá metoda pro stanovení organofosfátů, která je jednoduchá, levná a rychlá [52].

Vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce byla využita pro stanovení deoxynivalenonu ze vzorků rýže. Disperze chloroformu jako extrakčního rozpouštědla byla provedena pomocí vzduchových bublin. Extrakty byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s detektorem s diodovým polem. Byla prokázána možnost použití této mikroextrakce pro stanovení ve vzorcích rýže. Bylo zjištěno, že se jedná o přesnou a efektivní metodu. Tato metoda je zároveň i rychlá a jednoduchá [53].

## 1.2 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je definována jako analytická technika, při níž je rozdělena směs analytů díky rozdílným interakcím s mobilní a stacionární fází. Stacionární fáze je nejčastěji tvořena jemnými tuhými částicemi, které mají velký povrch, nebo tenkým filmem. Látky mohou se stacionární fází interagovat různými mechanismy. Podle síly interakce dochází k jejich zadržení, zpomalení rychlosti a tím i separaci, jak je znázorněno na obrázku 20. Jednotlivé mechanismy interakcí mohou působit jednotlivě nebo být kombinovány. Nejčastějším mechanismem je adsorpční. Stacionární fází je nejčastěji silikagel, a to buď samotný nebo modifikovaný. Dále lze využít i například oxid hlinitý, zirkoničitý nebo titaničitý. Mobilní fáze je podle typu chromatografie kapalná nebo plynná a pohybuje se celým chromatografickým systémem. Dále lze kromě typu mobilní fáze chromatografii dělit i podle uspořádání na kolonovou a v plošném uspořádání (tenkovrstvou a papírovou) [54-57].



Obrázek 20: Schéma dělení látek v kapalinové chromatografii [58]

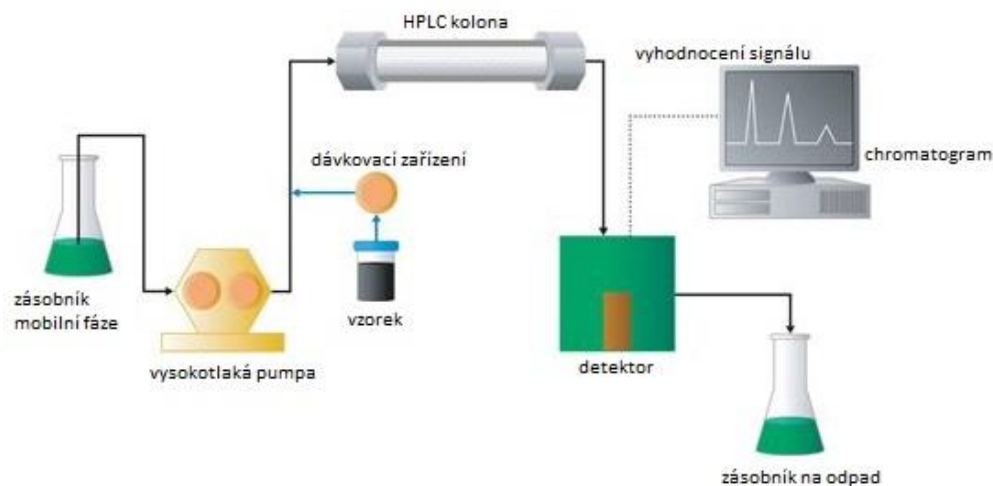
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se řadí mezi separační techniky založené na separaci mezi tuhou stacionární fází a kapalnou mobilní fází. Oproti plynové chromatografii, která využívá jako mobilní fázi plyn, má výhody ve stanovení málo těkavých a netěkavých látek. Většinou jsou látky oproti plynové chromatografii separovány při laboratorní teplotě. Podle polaritě stacionární a mobilní fáze se dělí na chromatografii s normálními fázemi, kdy je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární. Příkladem stacionární fáze je polyethylenglykol, silikagel nebo vázané aminové skupiny. Druhým a častěji využívaným typem chromatografie je chromatografie s obrácenými fázemi, kdy se využívá nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Mobilní fázi tvoří nejčastěji voda s vhodným



organickým rozpouštědlem, např. methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Stacionární fázi tvoří při využití obrácených fází nejčastěji silikagel modifikovaný různými organickými sloučeninami. Mezi nejběžnější stacionární fáze patří např. oktadecylsilikagel. Chromatografii s obrácenými fázemi lze využít pro celou řadu látek v širokém rozmezí velikostí molekul, polarity a iontových sil. Výhodou stacionárních fází na bázi modifikovaného silikagelu je jejich mechanická stabilita a výborné vlastnosti přenosu hmoty, ale velkou nevýhodou je jejich omezení pro použití v rozmezí pH 2–8 a do teploty 60 °C. V kyselé oblasti může docházet k hydrolyze stacionární fáze a při velmi alkalickém pH může docházet k uvolňování části stacionární fáze v důsledku rozpouštění. Při vyšších teplotách dochází k rozkladu silikagelu a tím i k ovlivňování celkové účinnosti kolony. Těmto omezením lze předejít při použití např. oxidu zirkoničitého nebo titaničitého, ale jejich využití není moc rozšířeno z důvodu rozdílů v retenčním mechanismu. Dalšími mechanismy separace může být iontová výměna pro iontové látky, nebo dělení podle velikosti molekul, kdy se jedná o gelově permeační chromatografii [54-56,59,60].

Jednotlivé aplikace chromatografie jsou v rozmezí malých iontů a molekul až po velké biologické makromolekuly a polymery. Má široké oblasti použití v medicíně, farmacii, klinické chemii, ale i v životním prostředí, chemickém průmyslu a analýze potravin [57].

Kapalinový chromatograf je znázorněn na obrázku 21. Skládá se ze zásobníku mobilní fáze, degaséru pro odplynění, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího ventilu nebo automatického dávkování, předkolony nebo předkolonového filtru, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Zásobník mobilní fáze je obvykle skleněná lahev o objemu od 0,5–2 litrů. Dalšími podmínkami pro použití nádoby jako zásobníku mobilní fáze je uzávěr pro zamezení odpařování rozpouštědla a možné kontaminace z prostředí, ale uzávěr by měl umožňovat protažení hadičky pro nasávání rozpouštědla. Všechna využívaná rozpouštědla by měla být čerstvá a nejlépe přefiltrovaná pro odstranění možných jemných rozptýlených nečistot. K odstranění nečistot v mobilní fázi slouží ochranná předkolonka nebo předkolonový filtr. Slouží pro odstranění částic nebo sraženin vznikajících během čerpání mobilní fáze, aby nedocházelo k zanášení a snižování účinnosti chromatografické kolony. Všechna rozpouštědla by měla být i odplyněna a odvzdušněna. K tomuto kroku slouží nejlépe degasér [54,56].



Obrázek 21: Schéma zařízení pro kapalinovou chromatografii [61]

Pro čerpání mobilní fáze v HPLC slouží vysokotlaké pumpy, které mají za úkol provádět reprodukovatelné, konstantní a bezimpulzní toky mobilní fáze. Podle módu čerpání mohou být dvě čerpadla pro gradientový systém nebo jedno čerpadlo pro izokratický systém. Při izokratické eluci směsí slabšího a silnějšího rozpouštědla je jejich koncentrační poměr po celou dobu analýzy konstantní. Při gradientové eluci se během separace mění poměr koncentrací jednotlivých složek mobilní fáze. Výhodou při gradientové eluci je zkrácení doby separace přispívající k urychlení eluce jednotlivých analytů a zkrácení i celé doby analýzy [54,56].

Další částí chromatografu je nástřik vzorku, který může být tvořen manuálním nástřikovým ventilem tvořeným dávkovací smyčkou, kdy ale dochází k horší reprodukovatelnosti měření oproti využití automatického dávkovače. Dávkovací zařízení slouží pro zavedení vzorku do chromatografického systému bez snížení tlaku v systému. Další možností je dávkovací systém tvořen dávkovací smyčkou, která má objem o velikosti nástřiku. Dávkovací ventil lze umístit do polohy nástřiku. V této poloze se nejčastěji dávkuje vyšší objem, než je objem smyčky pro současné propláchnutí a naplnění celé smyčky vzorkem. Přebytečný objem je vypouštěn do odpadu. Po přepnutí ventilu dochází ke změně průtoku mobilní fáze čímž dochází k vypláchnutí smyčky a nadávkování vzorku na kolonu. Výhodou použití automatického dávkovače je automatické nadávkování více vzorků za sebou pomocí programu dávkování vzorků bez nutnosti obsluhy, další výhodou je možnost vyhřívání zásobníku vzorků na nastavenou teplotu pro uchovávání vzorků při konstantní teplotě, což je důležité pro teplotně nestálé analyty. Další výhodou je i nastavení automatického smíchání

činidel před nadávkováním, čehož se využívá při předkolonové derivatizaci pro zlepšení separačních vlastností nebo pro zlepšení detekce [56,57].

Následuje kolona obsahující stacionární fázi, na které dochází k vlastnímu dělení analytů mezi mobilní a stacionární fázi. Většinou jsou tvořeny pláštěm z nerezové oceli díky odolnosti na vyšší tlak, ale mohou být tvořeny i sklem, titanem nebo z plastu. Nejčastějšími rozměry je 10–30 cm a průměr 4–10 mm. Velikost částic je nejčastěji 3, 5 nebo 10  $\mu\text{m}$  s účinností 40000–60000 pater/m [54,56,57].

Po výstupu z kolony přecházejí rozdělené analyty do detektoru, který je využíván pro monitorování a měření analytů ve vzorcích. Následuje sběr dat a vyhodnocovací software. Při průchodu detektorem dochází k převodu chemické nebo fyzikální vlastnosti analytu na elektrický signál, který lze zesilovat a upravovat vhodnou elektronikou. Detektory využívané v HPLC se dělí na detektory koncentrační reagující na změnu koncentrace složky nezávisle na průtoku mobilní fáze (např. vodivostní nebo spektrofotometrický detektor), a hmotnostní detektory reagující na množství látky v závislosti na průtoku mobilní fáze (detektor rozptylu světla, refraktometrický, nebo hmotnostní detektor). Koncentrační detektory bývají citlivější než hmotnostní detektory. Ideálními vlastnostmi detektorů jsou vysoká citlivost, stabilita, linearita, krátká doba odezvy, spolehlivost a nedestruktivnost. Nejčastěji využívané detektory jsou založené na spektrofotometrické detekci v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti spektra. Dalšími použitelnými detektory v kapalinové chromatografii jsou elektrochemické, refraktometrické nebo hmotnostní [54,56,57,59].

Spektrofotometrický detektor měří schopnost rozpuštěných látek absorbovat buď UV nebo VIS záření a vyžaduje tedy aby sledovaná látka obsahovala nějaký chromofor nebo byl na látku navázán při předchozí derivatizaci. Detektor se skládá z průtokové cely s malým objemem, kterou prochází paprsek záření a absorpcí určité vlnové délky světla dochází ke generování signálu, který je úměrný koncentraci rozpuštěné látky. Z důvodu možného rušení signálu analytu by měly být složky mobilní fáze vybírány tak, aby u nich nedocházelo k absorpci záření nebo jen minimální. Tyto detektory se dělí na detektory s konstantní vlnovou délkou sledující pouze specifickou vlnovou délku a detektory s proměnlivou vlnovou délkou, který umožňuje nastavit jakoukoliv vlnovou délku pro měření z širokého intervalu. Posledním typem je detektor s diodovým polem (DAD), který má vysoké spektrální rozlišení. Skládá se z velkého množství citlivých fotodiod pro sledování více vlnových délek najednou. Polychromatické záření vycházející ze zdroje prochází štěrbinou a vzorkem. Dále je štěpeno na difrakční mřížce monochromátoru rozloženo na jednotlivé vlnové délky v rozmezí

190–430 nm, které jsou sledovány na fotodiodách. Princip detektoru je znázorněn na obrázku 22 [56,57,59,62].



Obrázek 22: Princip detektoru s diodovým polem [63]

Fluorescenční detektor využívá schopnosti fluorescence analytů po ozáření, je tedy specifický pro látky obsahující fluorofor, což umožňuje selektivnější detekci oproti spektrofotometrickému detektoru. Využívá se sady vlnových délek pro ozáření vzorku. Vyzařované světlo z analytu je detekováno kolmo na průchod budícího paprsku z důvodu snížení šumu. Hlavní výhodou použití tohoto detektoru je vysoká selektivita a citlivost na fluorescenční látky. Nevýhodou je malý počet rozpuštěných látek se schopností přirozené fluorescence, a proto se nejčastěji volí derivatizace analytů.

Elektrochemické detektory měří proud odpovídající oxidaci nebo redukci analytu, které jsou eluovány z kolony. Jejich výhodou je vysoká citlivost, selektivita a široký lineární rozsah. Vodivostní detektor lze využít pro sledování iontových analytů, což je dáno schopností směsi mobilní fáze a analytů vést elektrický proud.

Refraktometrické detektory porovnávají rozdíl mezi eluátem z kolony a čistou mobilní fází. Tento typ detektorů je nejuniverzálnějším z důvodu detekce kterékoliv rozpuštěné látky, pokud je její refraktometrický index odlišný od mobilní fáze. Jeho velkou nevýhodou je použití pouze při izokratické eluci. Protože se jedná o hmotnostní detektor je velice citlivý na změny ve složení mobilní fáze. Refraktometrický index je citlivý na změny teploty a tlaku [56,57].

Detektor rozptylu světla se využívá ke sledování rozpuštěných látek, které jsou méně těkavé než složky mobilní fáze. Směs mobilní fáze a rozpuštěných analytů je rozptýlena do malých kapiček a mobilní fáze je odpařena. U zbylých kapiček analytu je sledována schopnost

rozptýlit světlo, která souvisí s velikostí kapiček a množstvím analytu. Výhodou tohoto detektoru je schopnost detekce analytů neobsahující chromofor nebo fluorofor [57].

Hmotnostní detektory jsou často využívány pro detekci analytů v kapalinové chromatografii, i když spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie bylo velmi obtížné z důvodu velkého objemu mobilní fáze. K detekci se využívá molekulární a fragmentové ionty, které vznikají v hmotnostním spektrometru. Směs mobilní fáze a analytů vycházející z kolony je pomocí ionizační techniky převedena na ionty, které jsou dále děleny na základě poměru hmotnosti a náboje [56].

Mezi detektorem a zásobní lahví na odpad může být zařazen ještě sběr frakcí pro následnou analýzu. Výsledným záznamem je chromatogram, což je závislost odezvy detektoru nebo množství analytu na době analýzy nebo objemu mobilní fáze. Nejčastěji se využívá odezva detektoru na čase. Pro identifikaci analytů se z chromatogramu vyhodnocuje obvykle retenční čas látky a dále plocha nebo výška píku pro kvantifikaci analytu [57].

## 1.3 Pivo

Pivo je v zákoně o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb. Definováno v oddílu 3 prováděcí vyhlášky č. 335/1997 Sb., v platném znění, jako „pěnivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, chmelových hlávek, upraveného chmele nebo chmelového extraktu, který vedle kvasným procesem vzniklého ethanolu (ethylalkoholu) a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu“. V této vyhlášce jsou definovány i požadavky na výrobu a jakost, rozdělení jednotlivých druhů piv a jejich označování [64].

Pivo je ale potravinářský výrobek, proto musí splňovat všechny podmínky, které jsou kladeny na potraviny a jejich distribuci. Dále musí být splněny i hygienické podmínky pro zamezení kontaminace chemickými, ale i mikrobiálními kontaminanty, kvůli kterým může docházet k nežádoucí změně chuti nebo vůně. Z důvodu pH výsledného produktu, obsahu chmelových látek, alkoholu a anaerobnímu prostředí, při kterém jsou metabolizovány všechny cukry pomocí kvasinek, se v pivě nevyskytují patogeny a jiné mikroorganismy. Výskyt mikroorganismů je také eliminován díky mnoha výrobním postupům, jako jsou fermentace, pasterace, var a filtrace [65,66].

Z pohledu prospěšnosti pro lidské zdraví je přínosem nízký obsah sacharidů, neobsahuje konzervační látky, ale pouze aminokyseliny, které se podílejí na konzervaci. Pivo je dále cenným zdrojem vitamínů B-komplexu, minerálů, antioxidantů a výborným zdrojem biologicky dostupného křemíku [66].

### 1.3.1 Výroba piva

#### 1.3.1.1 Výchozí suroviny

Pro výrobu piva jsou nejdůležitější zdroje sacharidů, které jsou nejčastěji využívány ze sladového ječmene, ale mohou být získávány i z kukuřice, čiroku, žita, triticales, pšenice nebo i ovsu. Použití speciálních sladů z dalších obilovin rozdílných od ječmene, které mohou být přidávány v určitém množství do pšenice nebo využívány samostatně, se podílí nejen na chuti, ale i barvě. Složení ječmene se liší podle odrůdy, způsobu pěstování, klimatických podmínek, ale i způsobu sklizně. Provádí se vizuální posouzení (vůně, barva, homogenita nebo lesk), sleduje se i homogenita (přítomnost jiných odrůd), poměr živých a mrtvých zrn, přítomnost škůdců a hodnotí se i výsledky chemické analýzy (obsah vody, bílkovin a sacharidů) pro výběr správné šarže [66,67].

Hlavní složkou piva je voda, která musí mít vysokou čistotu a kvalitu. Musí být pitná, čistá a bez patogenů, což je sledováno mikrobiologickými i chemickými metodami. Doplňkovými požadavky je hodnota pH, obsah hořečnatých a vápenatých iontů. [66]

Nejvýznamnější surovinou při výrobě piva je ale chmel, který se z největší části podílí na chuti piva. Nejvýraznějším přínosem je charakteristická hořkost a výrazné chmelové aroma. Vše ale závisí na způsobu použití chmele, ale i na jeho odrůdě. Vlastnosti chmele jsou také ovlivňovány okolním prostředím a místem pěstování, ale i dobou sklizně. Složení chmele se mění v závislosti na vegetačním období, a proto je i velmi důležitý čas sklizně. Chmel se skládá z pryskyřičných olejů, tříslovin, pektinů, bílkovin, vosků a sacharidů. Všechny látky obsažené v chmelu jsou znázorněny v tabulce 2 [66-68].

Tabulka 2: Obsah jednotlivých složek v chmelových šišticích [69]

Látka	Obsah [%]
Voda	8–12
Celkové pryskyřice	15–20
Polyfenolické látky	2–6
Silice	0,2–2,5
Vosky a lipidy	1–3
Dusíkaté látky	12–15
Sacharidické látky (celulóza)	40–50
Minerální látky	6-8

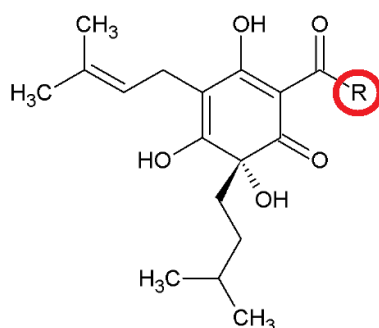
Z hlediska výroby piva jsou významné chmelové pryskyřice, silice, chuťové látky a polyfenoly. Rozdělení chmelových silic je znázorněno na obrázku 23. Chmelové pryskyřice představují celkový součet všech hořkých látek, mezi které se nejvíce řadí  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořké kyseliny, jejichž hořkost se ale liší. Na hořkosti piva se v největší míře podílejí izo-formy těchto kyselin, které vznikají izomerací v chmelovaru.  $\beta$ -hořké kyseliny nepodléhají stejnému typu izomerace jako  $\alpha$ -hořké kyseliny, ale dochází k tvorbě transformačních produktů kohuloponu a hydroxytricycokolupulonu. Tyto vznikající látky však nepřispívají v takové míře k hořkosti piva. Vzorce hořkých kyselin jsou zobrazeny na obrázku 24 a 25 a schématické rovnice

izomerace  $\alpha$ -hořkých kyselin na obrázku 26.  $\alpha$ - i  $\beta$ -hořké kyseliny se ve vodě špatně rozpouštějí, ale  $\beta$ -hořké kyseliny jsou hůře rozpustné ve sladidně a i ve výsledném pivu a díky tomu přispívají k hořkosti jen málo. Existují tři hlavní formy  $\alpha$ -hořkých kyselin – humulon, kohumulon a adhumulon. Nejčastější je izo-humulon, který přispívá nejvíce k hořkosti piva. Záleží ale i na typu jejich izomerace, protože cis-izomery mají vyšší hořkost než trans-izomery. K celkové hořkosti piva přispívají nejen hořké kyseliny, ale i chmelové polyfenoly v závislosti na stupni jejich polymerace. Chmelové pryskyřice zvyšují také fyziologickou stravitelnost, stabilitu pěny a bakteriostatické účinky. Vznikající izo- $\alpha$ -hořké kyseliny brání kontaminaci Gram-negativními bakteriemi, ale některé Gram-pozitivní bakterie jsou vůči nim rezistentní, zejména *Lactococcus* a *Pediococcus* [66-68,70-73].

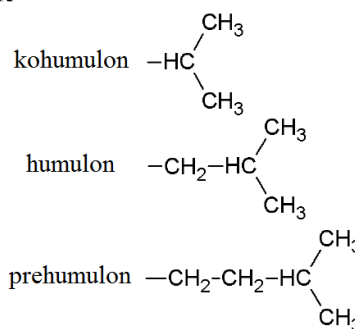


Obrázek 23: Rozdělení chmelových silic [71]

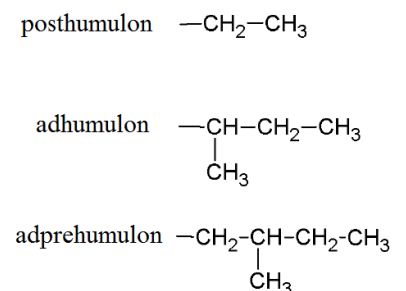
$\alpha$ -hořké kyseliny



R



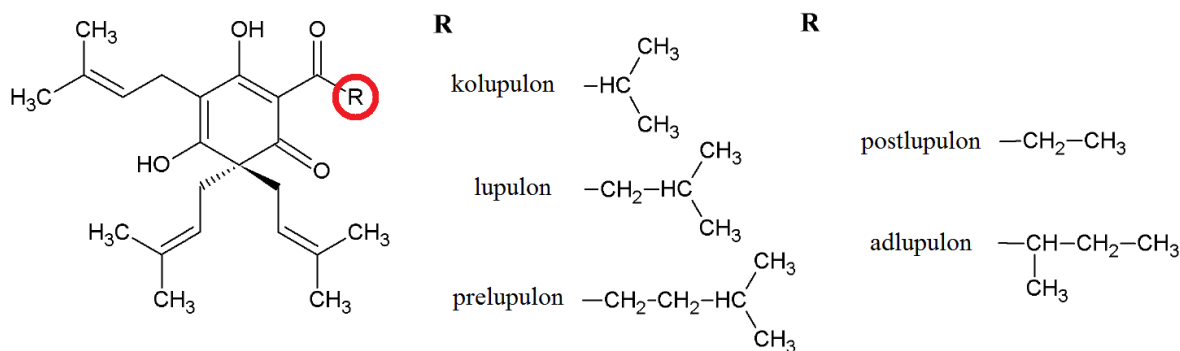
R



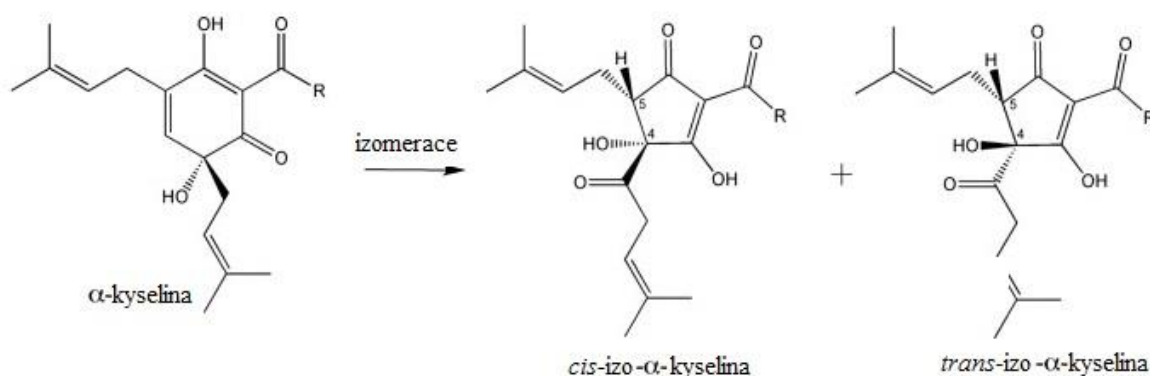
Obrázek 24: Vzorce  $\alpha$ -hořkých kyselin [74]



## $\beta$ -hořké kyseliny



Obrázek 25: Vzorce  $\beta$ -hořkých kyselin [74]



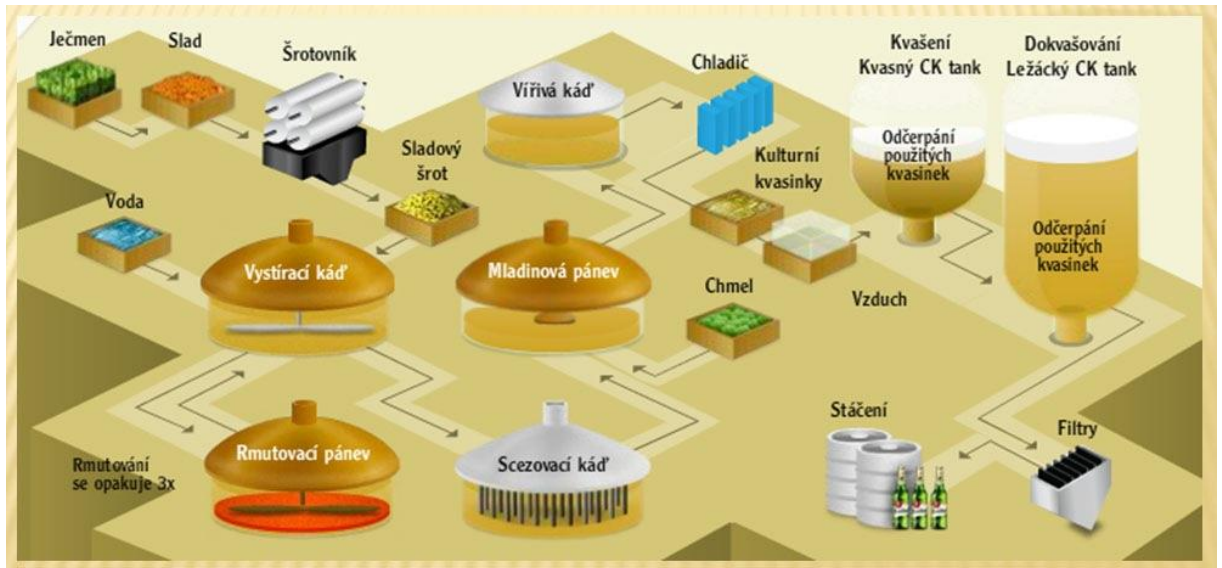
Obrázek 26: Schéma izomerace  $\alpha$ -hořkých kyselin [75]

Kvasinky používané pro výrobu piva se podílejí nejvíce na výsledných vlastnostech piva. Pomáhají při procesu fermentace vytvářet ethanol a sekundární metabolity. Jejich rozmanitost je velká, ale v pivovarství se nejvíce používají kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Pro spodní kvašení probíhající při teplotách 8–14 °C se využívají kvasinky *Saccharomyces carlbergensis*. Pro svrchní kvašení se využívají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a toto probíhá při teplotách 18–24 °C [72,76].

### 1.3.1.2 Proces výroby piva

Celý proces výroby klasického piva se skládá ze sladování (výroba sladu), šrotování sladu, vystírání, rmutování, chmelovaru a fermentace. Schématické znázornění je na obrázku 27. Každý krok výroby ovlivňuje kvalitu a výsledné vlastnosti piva. Dle použitého typu kvasinek a teploty kvašení se piva dělí na spodně kvašená a svrchně kvašená. Další dělení piv je upraveno

legislativou. Nejvíce vyráběným typem piva je spodně kvašený ležák, jehož výroba je popsána v následujících odstavcích. Svrchně kvašená piva na rozdíl od spodně kvašených díky vyšším teplotám při fermentaci obsahují vyšší podíl esterů a aromatických produktů. Díky těmto látkám je jejich chuť sladší a připomínající ovoce [66,72,76].



Obrázek 27: Schématické znázornění procesu výroby klasického piva [77]

Pro výrobu nealkoholického piva je popsáno velké množství postupů, lze je ale rozdělit na dva hlavní přístupy. Prvním přístupem je odstranění ethanolu z již vyrobeného klasického piva (např. vakuovou destilací, dialýzou nebo reverzní osmózou). Druhým přístupem je ovlivnění fermentace (např. nižší obsah zkvasitelných cukrů ve sladince nebo speciální kvasinky neprodukující tolik ethanolu), fermentace při velmi nízké teplotě nebo zastavení fermentace při dosažení limitu alkoholu 0,5 % obj. v nealkoholickém pivu (dán legislativou). Při druhém postupu se ale výsledné pivo liší složením a výslednými vlastnostmi z důvodu neúplného proběhnutí kvašení. Kvalitu chuti lze zlepšit kombinací obou postupů [66,78].

Slad je vyráběn v procesu sladování, kdy dochází k uměle vytvořenému klíčení ječmene nebo jiných použitých obilovin. Je nutné při procesu klíčení zajistit dostatečnou vlhkost, přítomnost kyslíku, teplotu a odvod vznikajícího oxidu uhličitého. Při klíčení jsou aktivovány enzymy. Po dostatečném naklíčení je vzniklý slad vysušen (hvozďen). Podle teploty a času hvozďení se slady dělí na světlé, tmavé a karamelové. Zbarvení sladů je způsobeno karamelizací jednoduchých cukrů a Maillardovými reakcemi. Barva použitého sladu je volena podle barvy výsledného piva, ale také se podílí na výsledné chuti [66,72,76].

Prvním krokem při výrobě mladiny je šrotování sladu, kdy dochází k rozmělnění sladových zrn na jemné částice. Provádí se to z důvodu snadnějšího přechodu enzymů a extraktivních látek do roztoku. Kvalita šrotování ovlivňuje následující krok vystírání. Oddělené obilné slupky a větší části jsou využity v pozdější filtraci výsledné mladiny, což je také ovlivněno kvalitou šrotování [66].

Dalším krokem je vystírání, kdy se míchá rozdrčený slad s vodou a vzniká kašovitá směs, tzv. vystírka. Následuje rmutování, při kterém je dosaženo teploty okolo 60 °C. Dochází k aktivaci enzymů (amylázy a proteázy), které štěpí škrob a bílkoviny za vzniku směsi jednoduchých zkvasitelných cukrů a aminokyselin. Tyto enzymy jsou vytvářeny v endospermu při klíčení. Po proběhnutí celého procesu se směs přefiltruje a získá se cukerný roztok nazývaný sladina. Pro filtraci je důležitá teplota, protože při zvyšování teploty je snižována viskozita roztoku, ale při teplotách nad 80 °C je zastaven enzym amyláza. Nerozštěpený škrob může způsobovat ve výsledném pivu zákal [66,76].

Následuje chmelovar, ve kterém je do zahříváné sladiny přidáván chmel (*Humulus lupulus L.*) a směs se povaří. Při tomto stupni mohou být také přidávány i některé pomocné přísady, jako např. kukuřičný škrob nebo dextróza. Z celé směsi jsou odpařovány těkavé látky a voda, vznikají barevné reakce a aromatické látky, sterilizuje se mladina a inaktivují se enzymy. Dochází k tvorbě nerozpustných komplexů s nerozštěpenými bílkovinami a polypeptidy přispívající ke stabilitě piva. Dále dochází k izomeraci  $\alpha$ -hořkých kyselin na izo- $\alpha$ -hořké kyseliny podílející se nejvíce na výsledné chuti. Chmel se podílí i na mikrobiologické stabilitě výsledného piva. Po ochlazení směsi a filtraci je získána tzv. mladina. Před fermentací by měla být ještě provedena filtrace, při které se odstraní vysrážené bílkoviny a části chmele, které by mohly ovlivňovat metabolismus kvasinek. Směs by měla být také rychle ochlazená pro zamezení rozmnožování kontaminujících mikroorganismů [66,76,79].

Při kvašení se do získané mladiny přidává poslední surovina, kterou jsou kvasinky. Před přidáváním do mladiny jsou kvasinky podrobeny procesu propagace, při kterém dochází k dostatečnému namnožení buněk v aerobním prostředí. Mladina je bohatým zdrojem živin pro kvasinky, protože obsahuje směs aminokyselin, sacharidů, lipidů, vitaminů a minerálních látek. Kvasinky v anaerobním prostředí využívají jednoduché cukry a přeměňují je na ethanol a oxid uhličitý (tzv. alkoholové kvašení). Teplota kvašení je velmi důležitá, protože při vyšších teplotách probíhá proces sice rychleji, ale také je produkováno více nežádoucích vedlejších produktů. Díky uzavřeným cylindrokónickým tankům může být při fermentaci regulován i tlak, který také snižuje možnost vzniku vedlejších produktů. Doba kvašení je různá podle typu piva. Konec fermentace je regulován množstvím zkvasitelných cukrů, které by ve výsledném pivě

neměly být přítomny z důvodu možnosti vzniku kontaminace cizími mikroorganismy. Dalším důležitým parametrem při sledování fermentace je hodnota pH, která by měla klesnout na výslednou hodnotu okolo 4,5, protože kyselé prostředí také inhibuje přítomnost cizích mikroorganismů. Po proběhnutí procesu vzniká tzv. mladé pivo. Při fermentaci vzniká řada vedlejších látek, které negativně ovlivňují chuť a vůni piva. Tyto látky se v procesu zrání, kdy dochází k fermentaci zbytkového extraktu, dále rozkládají a uvolňují společně se vznikajícím oxidem uhličitým. Zrání probíhá při nízkých teplotách v ležáckých sklepích [66,72,76].

Pro zajištění čirého roztoku jsou některá piva před plněním ještě filtrována nebo odstředována. Dochází tak k odstranění koloidních hrubých částic, buněk kvasinek nebo jiných mikroorganismů. Některé nežádoucí částice mohou být také odstraněny adsorpcí, např. bílkoviny na silikagelu. Stupeň vyčištění závisí na požadavcích pro výsledný produkt. Některé produkty jsou prodávány nefiltrované, jsou ale určeny pro rychlou spotřebu díky možné mikrobiální kontaminaci. Pro zajištění mikrobiální stability je ještě prováděna tepelná pasterace. Dochází k inaktivaci možných mikrobiologických kontaminantů [66,76,80].

Výsledné pivo se balí do různých obalů (skleněných lahví, plastových lahví, sudů nebo plechovek). Při balení musí být zachována kvalita piva. Nejčastěji se provádí plnění pod tlakem, kdy je omezena pěnovost piva a přítomnost kyslíku negativně ovlivňující vzhled piva (vznikají koloidní částice). Mělo by být také zabráněno kontaminaci piva [66,76].

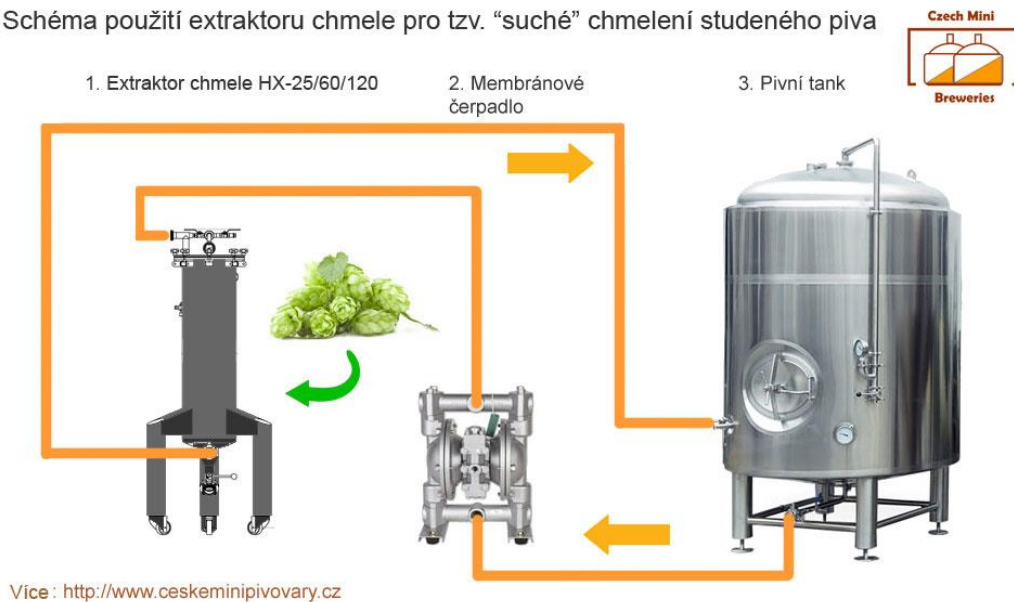
### 1.3.1.3 Různé způsoby chmelení

V klasickém pivu je chmel přidáván pouze v chmelovaru, ale existují i další možnosti přidávání chmele v procesu výroby piva. Prvním způsobem je přidávání chmele do chmelovaru těsně před ukončením varu. Tento postup se nazývá pozdní chmelení, při kterém je chmel ještě podrobován teplotní úpravě, ale už nedochází k tak výrazné ztrátě těkavých látek. Druhým způsobem je studené chmelení. Chmel je přidáván ve formě celých chmelových hlavic, chmelových pelet nebo chmelových extraktů. Při obou způsobech dochází k přechodu složek chmele do vodných matric. Získávají se tak specifické vlastnosti piva podobné použitému chmelu díky látkám, které při klasickém vaření v chmelovaru unikají [71,76,79,81].

Při chmelení za studena může být chmel přidáván při fermentaci, zrání, těsně před stáčením hotového piva nebo i při točení piva, kdy se do pípy vkládají chmelové patrony. Jedná se tedy o extrakci látek z chmele za studena. Provedení studeného chmelení v automatizované verzi je znázorněno na obrázku 28. Na obrázku 29 je znázorněno studené chmelení v menším měřítku. Je nutné sledovat u chmele složení silic, které se může lišit v závislosti na jednotlivých

odrodných. Důležitou roli hraje i sledování kontaminace používaného chmele. Na výsledné celkové chuti a aroma se tedy podílejí látky vznikající při výrobě piva spojené s látkami dodávanými v chmelu při studeném chmelení [70,79].

Schéma použití extraktoru chmele pro tzv. “suché” chmelení studeného piva



Obrázek 28: Automatizované chmelení za studena ve velkém objemu s použitím extraktoru chmele [82]



Obrázek 29: Extraktor chmele napojený na pívku (vlevo) a extraktor chmele do sklenice (vpravo) [83,84]

### 1.3.2 Mikrobiologie piva

Mikrobiologická nezávadnost piva je velmi důležitou částí. Při celém procesu výroby musí být dodrženy všechny hygienické požadavky a požadavky na čistotu. Celé zařízení pivovaru musí být sanitováno pro zamezení šíření kontaminace mezi jednotlivými šaržemi. Výsledné

pivo má několik selektivních vlastností zabraňující možné mikrobiální kontaminaci, jako jsou anaerobní podmínky, nízká hodnota pH, hořké kyseliny a složky chmele, ethanol, nedostatek jednoduchých cukrů a aminokyselin. U některých piv, mohou být tyto účinky potlačeny a může docházet k možné mikrobiální kontaminaci, kdy dochází ke zhoršení vůně, kvality chuti nebo srážení. V pivu se ale nemohou vyskytovat patogenní mikroorganismy [66,72].

#### 1.3.2.1 Cizí mikroorganismy

Pro sledování účinnosti sanitace a čistících procesů jsou využívány různé metody, jako např. lyzinová metoda stanovení cizích kvasinek. Cizí kvasinky ovlivňují fermentaci kulturních kvasinek a způsobují nežádoucí změny chuti, redukci dusičnanů na dusitany a tvorbu karcinogenních nitrosaminů. Může být také ovlivněna hodnota pH výsledného piva nebo aroma [72].

Kromě kontaminujících kvasinek jsou ještě stanovovány aerobní a anaerobní bakterie. Nejčastěji vyskytujícími se bakteriemi jsou *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus*. Dále je pomocí stěrových metod sledována kontaminace používaných přístrojů nebo obalových materiálů. Tyto metody jsou časově náročné a vyžadují kultivaci nejméně 24 hodin. Pro okamžité sledování kontaminace se využívají automatizované metody PCR (polymerázová řetězová reakce) v reálném čase, multiplexní PCR, bioluminiscenční metody nebo fluorescenční metody [72,85].

Největším možným nebezpečím v kontaminaci piva jsou mykotoxiny. Ty mohou do piva přecházet z kontaminovaných obilovin, nejčastěji tedy ječmene. Kontaminace mykotoxiny ale může být v celém procesu výroby, protože tyto jsou vysoce tepelně stabilní a také odolné kyselým pH. Nejčastěji vyskytujícími se mykotoxiny v ječmeni jsou fusáriové mykotoxiny snižující klíčivost zrna a tím i celkovou produkci pivovaru. Nejvíce sledované mykotoxiny v pivu jsou deoxynivalenol, zearalenon, HT-2, T-2 toxiny. Při výrobě piva by měly být všechny mykotoxiny odstraněny v procesu máčení, sušení sladu, vystírání nebo kvašení [86].

#### 1.3.2.2 Stanovení kulturních kvasinek

U kulturních kvasinek je sledována životaschopnost buněk nejčastěji pomocí methylenové modři nebo fluorescenčního barviva. Sleduje se počet neobarvených buněk, což jsou životaschopné buňky, a počet mrtvých obarvených buněk. Fluorescenční barviva jsou naopak vázána do životaschopných buněk na proteiny v cytoplazmě. Nevýhodou tohoto stanovení je nutnost fluorescenčního mikroskopu [72].

### 1.3.3 Analýza složek piva

Pivo se skládá z velkého množství sloučenin, které pocházejí ze surovin použitých k výrobě. Tyto sloučeniny procházejí buď celým procesem beze změny, nebo jsou v procesu výroby piva přeměňovány na jiné sloučeniny. Hlavní složky piva jsou uvedeny v tabulce 3. Z anorganických iontů je významný obsah fosforu, draslíku, sodíku, vápníku, hořčíku, síranů a fosfátů [66].

Tabulka 3: Složky piva - obsah a množství látek [66]

Sloučenina	Obsah v pivu	Počet látek v pivu
Voda	90–94 %	1
Ethanol	3–5 %	1
Uhlovodíky	1–6 %	± 100
Oxid uhličitý	3,5–4,5 mg/l	1
Anorganické soli	500–4000 mg/l	± 25
Celkový dusík	300–1000 mg/l	± 100
Organické kyseliny	50–250 mg/l	± 200
Vyšší alkoholy	100–300 mg/l	± 80
Aldehydy	30–40 mg/l	± 50
Estery	25–40 mg/l	± 150
Sloučeniny obsahující síru	1–10 mg/l	± 40
Látky z chmele	20–60 mg/l	> 100
Vitamín B	5–10 mg/l	13

#### 1.3.3.1 Rozdíl mezi klasickým chmelením a chmelením za studena

Rozdíl mezi pivem vyráběným klasicky a za studena chmeleným lze pozorovat nejvíce v aroma piva. Na něm se nejvíce podílejí terpenické uhlovodíky, zejména linalool, geraniol a myrcen. Linalool je nejvíce přispívající látkou ke chmelové vůni. V pivu klasicky chmeleném

jsou tyto uhlovodíky transformovány, kdežto u piv za studena chmelených nebo piv pozdně chmelených se vyskytují v původní formě [70,71].

Kromě terpenických uhlovodíků byly na rozdíl od klasického piva u piva chmeleného za studena stanoveny metodou headspace mikroextrakce tuhou fází spojené s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí a olfaktometrií i sloučeniny síry. Olfaktometrie je analytická metoda využívaná pro stanovení těkavých látek extrahovaných z potravinových vzorků. Autoři také prokázali že vliv studeného chmelení, zejména přenos těkavých látek, závisí i na velikosti výroby [79,87].

Rozdíl lze pozorovat i v chuti piva, kdy studené chmelení má větší vliv na chuť než pozdní chmelení. Vliv na chuť piva má obsah hořkých kyselin a silic v chmelových šišticích [70].

#### 1.3.3.2 Příklady analýzy piva

Byl sledován vliv místa pěstování na aroma chmele a zejména na konečné vlastnosti piva chmeleného za studena. Testování bylo prováděno senzorycky, kdy 12 členů hodnotící komise nejprve hodnotilo surový chmel a poté vzorky piv chmelených za studena. Chmelení za studena bylo prováděno ze stejných chmelů, které byly hodnoceny, přidaných do nakoupeného ležáku. Byla sledována schopnost konzumentů poznat rozdíly v aroma. Pro hodnocení byly vybrány chmely stejné odrůdy pocházející z Kanady, USA a Velké Británie. Výsledky byly hodnoceny pomocí projektivního mapování. Bylo prokázáno, že chmel pěstovaný v Kanadě se liší od chmelu pěstovaného v USA a Velké Británii. Mezi těmito dvěma zeměmi nebyl velký rozdíl v hodnocení [88].

Těkavé sloučeniny obsažené v pivu byly sledovány po extrakci na membráně se separační vrstvou obsahující polyvinylalkohol. Pro analýzu byly vybrány španělská piva typu ležák a nealkoholická piva. Výsledné extrakty byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí. Bylo zjištěno, že obsah těkavých aromatických sloučenin v pivu (ethylacetát, izoamylacetát, izobutylalkohol, 3-methylbutanol a 2-methylbutanol) je nižší u nealkoholických piv [89].

Pro stanovení aroma v pivu byly využity 4 různé extrakce – sorpční extrakce na míchací tyčince, headspace sorpční extrakce, headspace mikroextrakce tuhou fází a extrakce s odpařováním rozpouštědla. Všechny získané extrakty byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Získané aromatické látky byly rozděleny do 6 skupin – estery, alkoholy, kyseliny, aldehydy, ketony a terpeny. Mezi stanovené terpeny patří např. geraniol, citronellol, nerol, linalool, fenchol, myrtenol,  $\beta$ -myrcen nebo humulen. Bylo



prokázáno, že je velmi důležitý výběr extrakční metody pro stanovení těkavých sloučenin v pivu z pohledu typu analyzovaných sloučenin [90].

Pro stanovení profilu hořkosti bylo vybráno stanovení izo- $\alpha$ -hořkých kyselin po extrakci pomocí kapalinové chromatografie. Vzorokly piv byly před stanovením nejprve okyseleny kyselinou fosforečnou a poté extrahovány do izooktanu. Získaný extrakt byl odpařen do sucha pomocí proudu dusíku a poté rozpuštěn v acetonitrilu. Dále byly extrahovány fenolické kyseliny po okyselení piva do ethylacetátu. Po provedení extrakce byl získaný extrakt opět odpařen a rozpuštěn v methanolu. Extrakty izo- $\alpha$ -hořkých kyselin a fenolických kyselin byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Byl stanoven i celkový obsah polyfenolických sloučenin reagujících s železitými ionty v alkalickém prostředí. Výsledný produkt byl stanoven spektrofotometricky při 600 nm. Pomocí analytických metod byl zjištěn vliv odrůdy chmele na intenzitu a povahu hořkosti výsledného piva. Tyto výsledky byly podloženy i senzoricou analýzou [73].

V další studii byl sledován obsah těkavých látek u trapistických a „craft“ piv (po domácí vařeně) pomocí dvoudimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Použití dvoudimenzionální plynové chromatografie umožňuje lepší stanovení profilu těkavých látek, kdy jsou odděleny i látky s malými rozdíly retence. Pro sledování těkavých sloučenin byly zvoleny 4 různé extrakce – headspace mikroextrakce tuhou fází, sorpční extrakce na míchací tyčince, statická headspace a dynamická headspace extrakce. Jako nejlepší extrakce byla zvolena dynamická headspace extrakce ve spojení s dvoudimenzionální plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí [91].

V pivu chmeleném za studena byly stanoveny těkavé látky pomocí headspace mikroextrakce tuhou fází spojené s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí. Stanoveny byly těkavé látky myrcen, linalool, geraniol, geranylacetát, humulen, ethyl-2-methylpropanoát, ethyl-2-methylbutanoát. Bylo prokázáno, že chemické složení a aroma piva chmeleného za studena závisí na době studeného chmelení, ale i na měřítku ve kterém se provádí. Rozdíl byl sledován zejména u látek linalool a myrcen [79].

Byl sledován i vliv ječmene na aroma piva pomocí mikroextrakce tuhou fází s následnou analýzou pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Bylo identifikováno 41 sloučenin spadajících do různých funkčních skupin, ze kterých jsou nejvýznamnější aldehydy, ketony a alkoholy. Z aldehydů byl stanoven např. acetaldehyd, 2-methylpropanal, pentanal a hexanal. Z alkoholů např. 2-methyl-1-propanol, 1-pentanol a 1-hexanol [92].

Pro komplexní chuť piva jsou důležité aromatické látky vznikající při fermentaci, zejména estery. V tomto článku byly sledovány různé podmínky fermentace, jako je teplota, pH nebo přidávané látky do mladiny. Sledována byla intenzita barvy piva spektrofotometricky při 430 nm a analyzovány volné estery v pivu pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem. Ke zvýšení využití živin a produkci ethanolu vede přídavek leucinu a síranu zinečnatého, které přispívají k růstu a metabolismu kvasinek. Teplota a pH roztoku ovlivňuje fermentační kinetiku, kdy při teplotách v rozmezí 10-25 °C je vyšší produkce esterů [93].

V pivu byly stanoveny  $\alpha$ -hořké kyseliny pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Byly stanovovány izo- $\alpha$ -hořké kyseliny a humulinony, což jsou zoxidované  $\alpha$ -hořké kyseliny, které lze stanovit v pivech chmelených za studena. Pro stanovení chmelových flavonoidů, jako jsou např. kaempferol, multifidol a kvercetin, je nutné použít spojení plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Byl prokázán rozdíl mezi pivy chmelenými za studena v obsahu flavonoidů [94].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Instrumentace

#### 2.1.1 Kapalinový chromatograf s detektorem s diodovým polem

- Kapalinový chromatograf (Nexera X2, Schimadzu corporation, Duisburg, Německo)
- Degasér (DGU-20A, Schimadzu corporation, Duisburg, Německo)
- Čerpadla mobilní fáze (2x LC-30AD, Schimadzu corporation, Duisburg, Německo)
- Automatické dávkovací zařízení (Nexera X2 SIL-30AC, Schimadzu corporation, Duisburg, Německo)
- Detektor s diodovým polem (Nexera X2 SPD-M30A, Schimadzu corporation, Duisburg, Německo)

#### 2.1.2 Další zařízení

- Odstředivka Nuve typ NF 400 + rotor výkyvný 4x 100 ml (Nuve sanaci malzemeleri imalat ve ticaret, Ankara, Turecko)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex TK 52 (Bandelin electronic, Berlín, Německo)
- Třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Laboratorní váhy ABT 220-4M (Kern, Balingen, Německo)
- Digitální pH metr s pH elektrodou (Schott Glas, Mainz, Německo)
- Automatické pipety Biohit (Biohit OY, Helsinky, Finsko)

### 2.2 Chemikálie a standardní látky

- ICE-3 standard (Labor Veritas, Zurich, Švýcarsko)
- Methanol (pro HPLC 99,9 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Ethanol (96 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Acetonitril (pro HPLC 99,9 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina fosforečná (85 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- 2-propanol (99,9 %, Merck, Darmstadt, Německo)
- NaOH p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Destilovaná voda (centrální rozvod Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)
- Redestilovaná voda (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)

- 1-dekanol (99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- 1-undekanol (99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- 1-dodekanol (98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

## 2.3 Vzorky piva

Piva zakoupená v obchodních řetězcích pro analýzu, znázorněná na obrázku 30, byla uchovávána v lednici před otevřením i po jejich otevření. Před analýzou byla všechna třepána po přelití do vhodné nádoby na třepače při 1000 otáčkách po dobu 40 minut pro odstranění oxidu uhličitého.



Obrázek 30: Analyzované vzorky piv

1 - Bakalář světlý ležák, 4,9 % obj.; 2 - Bakalář za studena chmelený, 5,2 % obj.; 3 - Bakalář nealko za studena chmelený, max. 0,5 % obj. (všechny tři - Tradiční pivovar v Rakovníku, a.s., Rakovník, ČR); 4 - Krušovice 12 ze žateckého chmele, 5,0 % obj.; 5 - Krušovice ležák za studena chmelený, 4,8 % obj. (oba - Královský pivovar Krušovice, Krušovice, ČR); 6 - Lobkowicz premium ležák, 4,7 % obj.; 7 - Lobkowicz premium ALE (za studena chmelený), 4,4 % obj. (oba - Pivovar Vysoký Chlumeč a.s., Vysoký Chlumeč, ČR); 8 - Francinův ležák (Postržižinské pivo), 5,1 % obj.; 9 - Jubilejní Hrabalův ležák (Postržižinské pivo, za studena chmelené), 5,8 % obj. (oba - Pivovar Nymburk spol. s.r.o., Nymburk, ČR); 10 - Primátor premium, 5,0 % obj.; 11 - India Pale Ale Primátor (za studena chmelený), 6,5 % obj. (oba - Primátor a.s., Náchod, ČR); 12 - Svijanský máz, 4,8 % obj.; 13 - Svijanská rytíř (za studena chmelený), 5,0 % obj. (oba - Pivovar Svijany a.s., Svijany, ČR); 14 - Raven Gunslinger Indian Pale Ale (chmelený za studena), 6,4 % obj. (Pivovar Raven, Plzeň, ČR)

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Příprava kalibračních řad

#### 2.4.1.1 Příprava kalibrační řady pro zjištění limitů detekce a kvantifikace přístroje

Pro přípravu kalibrační řady byl použit standard hořkých látek ICE-3. Potřebné množství standardu pro přípravu zásobního roztoku o koncentraci 5,13 mg/ml, ze kterého byly připravovány jednotlivé roztoky kalibrační řady, bylo naváženo, rozpuštěno v methanolu a doplněno na přesný objem v odměrné baňce o objemu 100 ml. Jednotlivé kalibrační roztoky v koncentračním rozsahu  $6,16 \cdot 10^{-4}$  až 2,565 mg/ml byly připraveny odměřením vypočteného množství zásobního roztoku a doplněny methanolem v odměrné baňce. Takto připravené roztoky byly proměřeny vybranou metodou pro měření hořkých látek.

#### 2.4.1.2 Příprava kalibrační řady pro kvantifikaci

Při přípravě kalibrační řady byl použit standard ICE-3 o koncentraci 5,96 mg/ml v 96% ethanolu. Z tohoto roztoku byly připraveny kalibrační roztoky. Každý kalibrační roztok byl okyselen na pH 2. 10 ml bylo podrobeno extrakci. Do zkumavky bylo společně s kalibračním roztokem přidáno 30  $\mu$ l 1-undekanolu jako extrakčního rozpouštědla. Zkumavka byla vložena na 2 minuty do ultrazvuku a poté odstředěna při 3500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Po 25 minutách v mrazničce byl extrakt odebrán a po roztátí zředěn v poměru 1:1 methanolem.

### 2.4.2 Postupy extrakcí

Pro extrakci byl nejprve připraven zásobní roztok o koncentraci 5,96 mg/ml navážením příslušného množství standardu ICE-3 a rozpuštěn v 96% ethanolu. Z takto připraveného roztoku byl připraven druhý zásobní roztok o koncentraci 0,05 mg/ml v 5% ethanolu, který byl poté podroben příslušné extrakci a odstředěn. Po odstředění byl vložen do mrazničky na 25 minut a po uplynutí této doby bylo ztuhlý extrakt vyjmut a vložen do chromatografické nádoby (Lab Logistic Group, Meckenheim, Německo) s vložkou. Po rozpuštění byl extrakt naředěn v poměru 1:1 methanolem.

#### 2.4.2.1 Disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky

U zásobního roztoku o koncentraci 0,05 mg/ml bylo nejprve upraveno pH na hodnotu 5. Dále bylo odměřeno 10 ml takto upraveného roztoku do plastové zkumavky s kónickým dnem (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Prudce byla vstříknuta směs 30  $\mu$ l 1-undekanolu

jako extrakčního rozpouštědla a 600 µl ethanolu jako disperzního rozpouštědla. Roztok byl ponechán 7 minut ve stojánku pro proběhnutí extrakce. Poté byl odstředěn v odstředivce při 3500 otáčkách/min po dobu 15 minut.

#### 2.4.2.2 Vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky

Pro extrakci bylo odměřeno 10 ml zásobního roztoku o koncentraci 0,05 mg/ml a pH 4,5 do plastové zkumavky s kónickým dnem. K touto roztoku bylo přidáno 30 µl 1-undekanolu jako extrakčního rozpouštědla a směs byla 16x vtáhnuta do stříkačky i s částí vzduchu a prudce vstříknuta zpět. Takto připravená disperzní směs byla ihned odstředěna při 4000 otáčkách/min po dobu 10 minut.

#### 2.4.2.3 Ultrazvukem asistovaná kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky

Pro extrakci bylo odměřeno 10 ml roztoku standardu o koncentraci 0,05 mg/ml a pH 2 do zkumavky. K takto připravenému roztoku bylo stříkačkou prudce vstříknuto 30 µl 1-undekanolu jako extrakčního rozpouštědla a roztok byl vložen na 2 minuty do ultrazvuku. Poté byl odstředěn při 3500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut.

#### 2.4.2.4 Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí plovoucí organické kapky

K extrakci bylo odměřeno 10 ml roztoku o koncentraci 0,05 mg/ml a pH 6. Prudkým vstříknutím bylo přidáno 30 µl 1-undekanolu jako extrakčního rozpouštědla a 100 µl ethanolu, jako disperzního rozpouštědla. Takto připravená směs byla ponechána 10 minut v ultrazvukové lázni a poté odstředěna při 4000 otáček za minutu po dobu 10 minut.

#### 2.4.2.5 Metoda analýzy hořkých kyselin

Gradientová eluce (90–100 % methanolu – program gradientu: 2 minuty 90 %, 7 minut 93 %, 9 minut 95 %, 27 minut 100 %), mobilní fáze methanol/redestilovaná voda (pH = 2, okyseleno kyselinou fosforečnou), průtok 0,7 ml/min, dávkovaný objem 10 µl, detekce 314 nm.

Kolona Ascentis® C18 25 cm x 4,6 mm, 5 µm (Supelco analytical, Bellefonte, PA, USA)

### 2.4.3 Extrakce vzorků

Do zkumavky s kónickým dnem bylo odměřeno 10 ml vzorku piva o s hodnotou pH upravenou na 2. Bylo přidáno 30  $\mu$ l 1-undekanolu (extrakční rozpouštědlo). Takto připravený roztok byl vložen na 2 minuty do ultrazvuku a poté odstředěn při 3500 otáček za minutu po dobu 10 minut. Získané extrakty byly vloženy na 25 minut do mrazničky, kde došlo ke ztuhnutí extraktu. Následovalo odebrání extraktu do chromatografické nádoby s vložkou, zředění methanolem v poměru 1:1 a provedení analýzy pomocí HPLC-DAD.

Obsah hořkých kyselin ve vzorcích piva byl vyhodnocen pomocí kalibrační řady a metodou standardního přídatku. Standartní přídatek byl prováděn přidáním 84  $\mu$ l ICE-3 standardu o koncentraci 5,96 mg/ml ve 100 % ethanolu. U takto připraveného roztoku bylo upraveno pH na hodnotu 2 a podrobno stejnému postupu jako u vzorků piva.

## 3 Výsledky a diskuze

### 3.1 Kalibrační závislosti

Pro stanovení limitů detekce a kvantifikace přístroje bylo připraveno 8 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí  $6,16 \cdot 10^{-4}$  až 2,565 mg/ml  $\alpha$ -hořkých kyselin a 7 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí  $3,08 \cdot 10^{-3}$  až 2,565 mg/ml  $\beta$ -hořkých kyselin ze standardu chmelového extraktu ICE-3. Použitý standard obsahuje směs  $\alpha$ -hořkých kyselin (kohumulon, adhumulon a humulon) a  $\beta$ -hořkých kyselin (kolupulon, adlupulon a lupulon), jejichž zastoupení je uvedeno v tabulce 4. Připravené kalibrační roztoky ze standardu tedy obsahovaly směs  $\alpha$ -hořkých kyselin a  $\beta$ -hořkých kyselin, ale z důvodu nižšího obsahu  $\beta$ -hořkých kyselin ve standardu nebyly již tyto v 8. kalibračním roztoku detekovány.

Po proměření roztoku standardu při zvoleném průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min byly zjištěny retenční časy jednotlivých látek, které jsou uvedeny v tabulce 4 společně se složením standardu zjištěném na lahvičce ICE-3 standardu.

Tabulka 4: Složení ICE-3 standardu a retenční časy jednotlivých hořkých kyselin

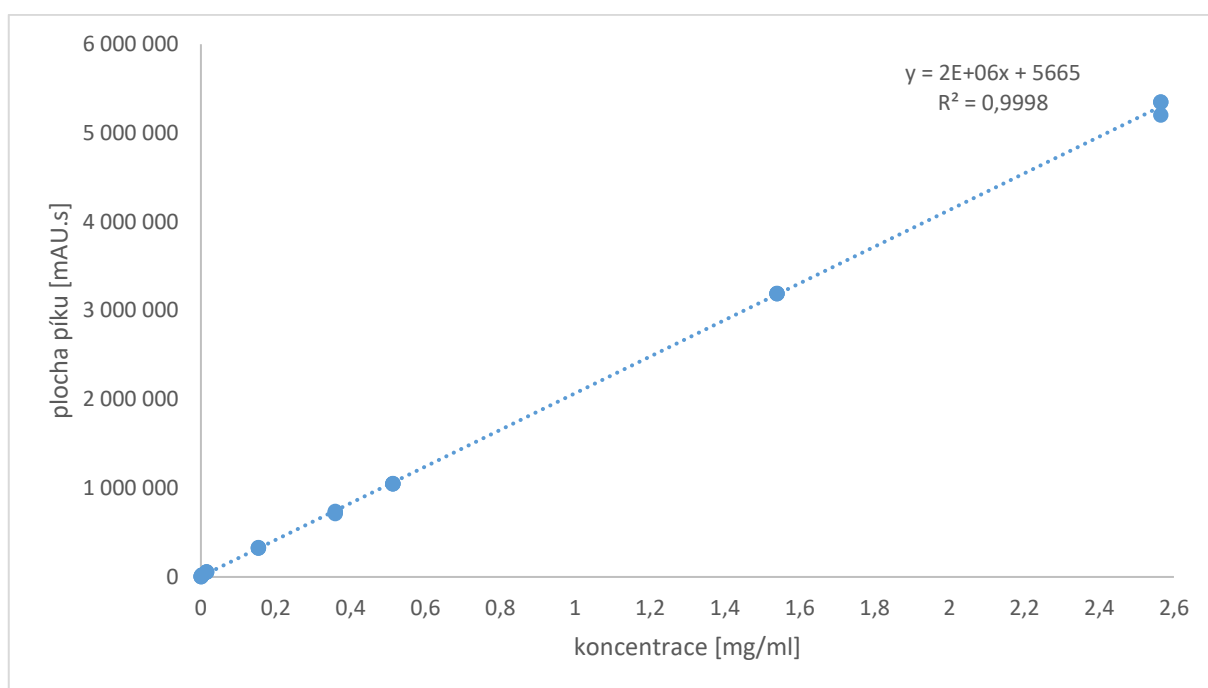
Látka		Obsah ve standardu [%]	$t_R$ [min]
$\alpha$ -hořké kyseliny	Kohumulon	13,88	8,5
	Adhumulon + humulon	30,76	9,3
$\beta$ -hořké kyseliny	Kolupulon	13,44	10,7
	Adlupulon + lupulon	10,84	11,8

Kalibrační roztoky byly připraveny dle postupu popsaném v kapitole 2.5.1.1 do odměrných baněk o objemu 25 ml. Jednotlivé koncentrace byly připravovány postupným ředěním roztoků o vyšší koncentraci. Výchozí zásobní roztok měl koncentraci 5,13 mg/ml standardu ICE-3. Pro měření byl odebrán 1 ml methanolického roztoku do chromatografické nádoby k analýze. Každý kalibrační bod byl proměřen 3x. Nejnižší koncentrace kalibračního roztoku byla volena podle nejnižší možné plochy, kterou lze na přístroji naměřit. U získaných chromatogramů byl nejprve odečten pomocí vyhodnocovacího programu šum detektoru získaný proměřením počátečního složení mobilní fáze. Z takto upravených chromatogramů byly odečteny plochy pro jednotlivé látky v kalibračních roztocích a byly vytvořeny kalibrační

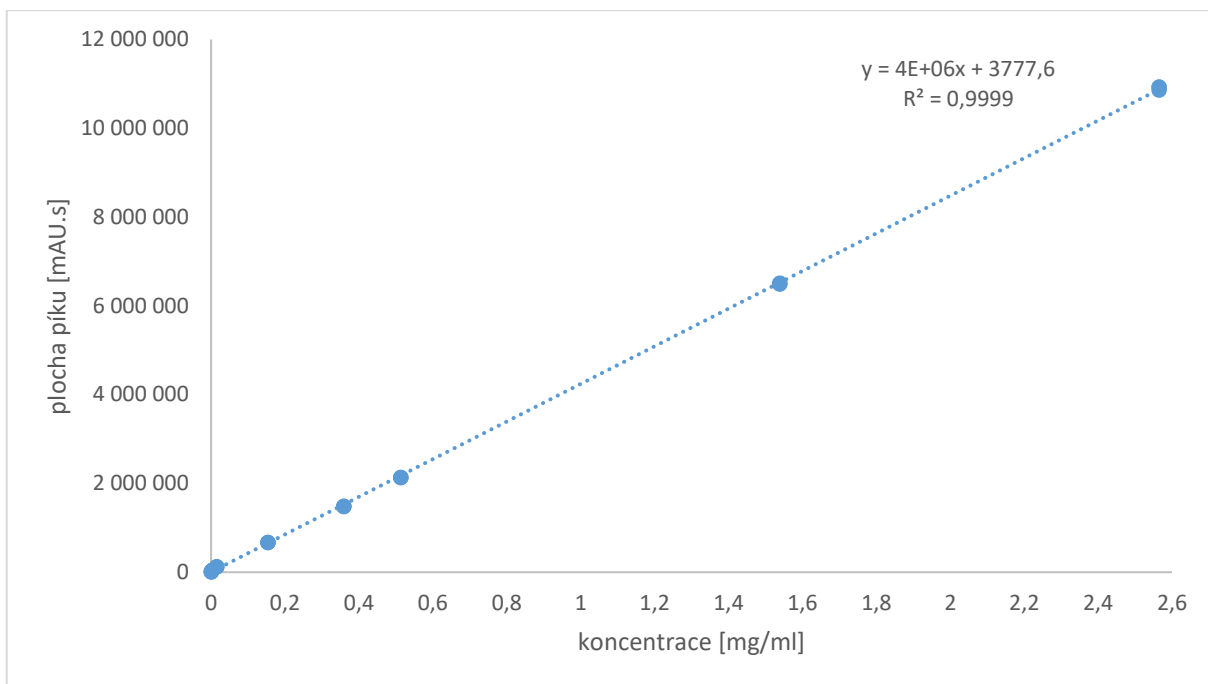


závislosti plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro jednotlivé hořké kyseliny. Kalibrační závislost pro kohumulon je znázorněna na obrázku 31, pro adhumulon + humulon na obrázku 32, pro kolupulon na obrázku 33 a pro adlupulon + lupulon na obrázku 34. Získané rovnice regrese společně s hodnotou koeficientu determinace jsou v tabulce 5 a vypočtené směrodatné odchylky úseku a směrnice jsou uvedeny v tabulce 6. Vypočítány byly pomocí maticového výpočtu v programu Excel. Vzorový chromatogram z měření této kalibrace je uveden v příloze I.

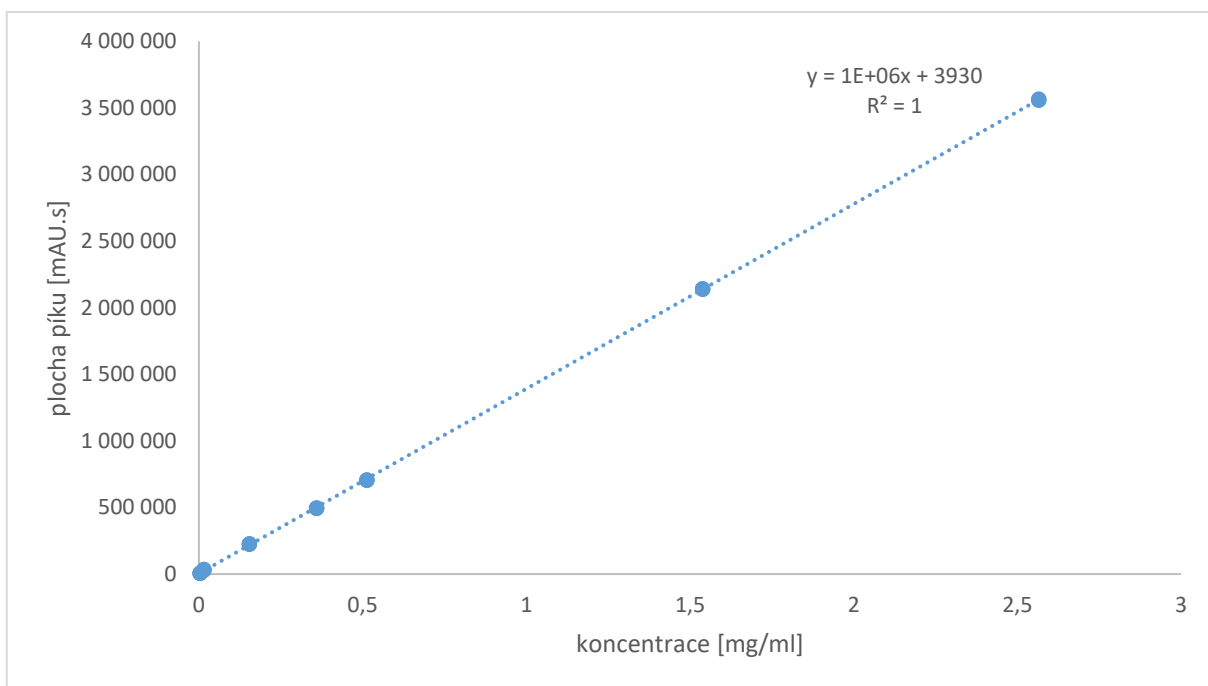
Měření kalibračních roztoků bylo provedeno popsanou metodou pro hořké kyseliny v kapitole 2.4.2.5. Tato metoda vycházela z metody EBC 7.7 využívané pro stanovení  $\alpha$ -hořkých kyselin a  $\beta$ -hořkých kyselin v chmelu a pivu, ale byla drobně modifikována.



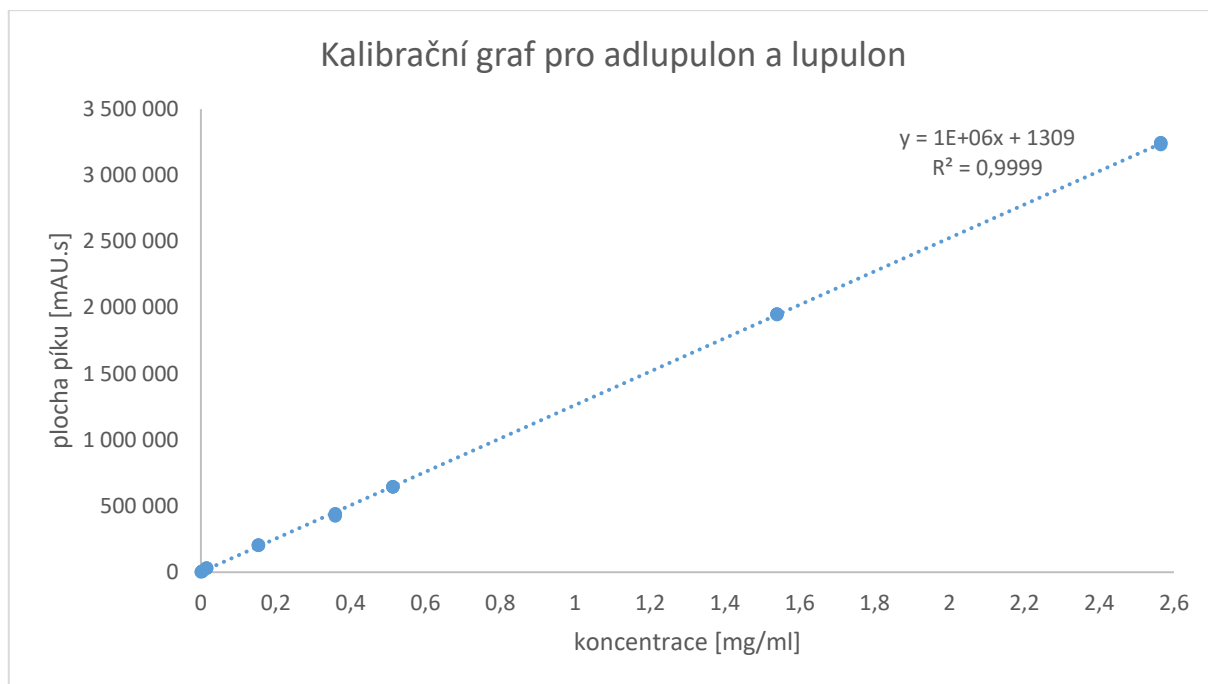
Obrázek 31: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro kohumulon



Obrázek 32: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro adhumulon + humulon



Obrázek 33: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro kolupulon



Obrázek 34: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku pro adlupulon + lupulon

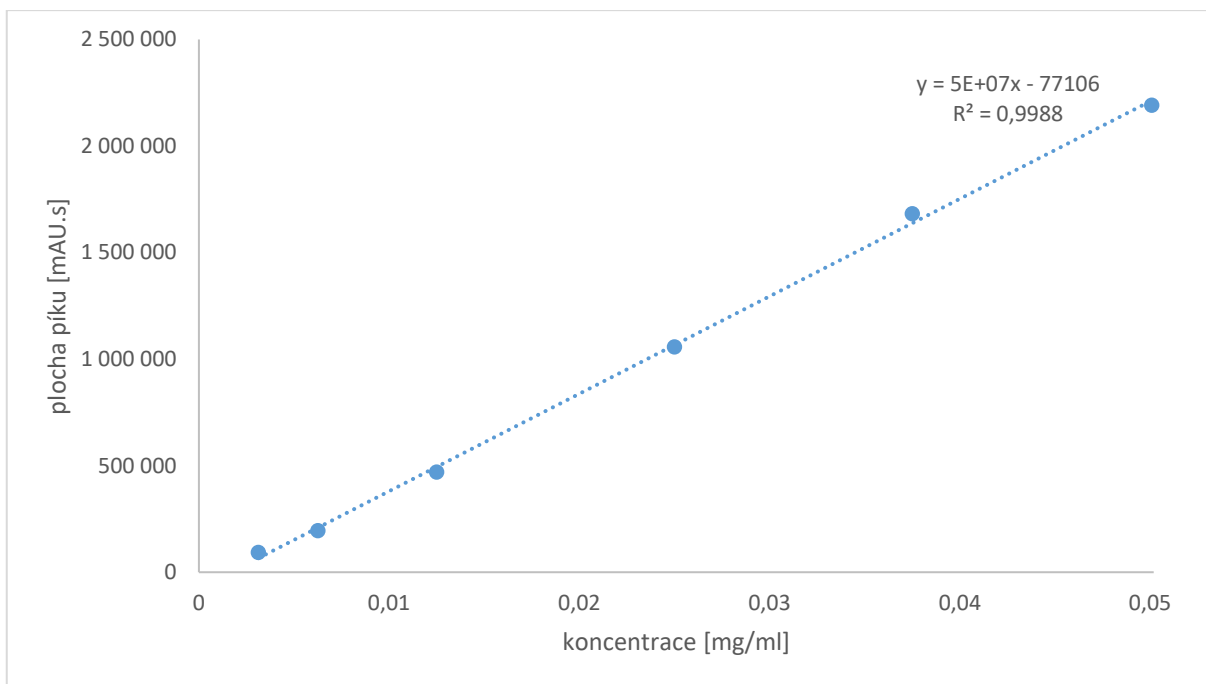
Tabulka 5: Rovnice regrese s hodnotou koeficientu determinace jednotlivých kalibračních závislostí

Látka	Rovnice regrese	$R^2$
Kohumulon	$y = 2 \cdot 10^6 x + 5665$	0,9998
Adhumulon + humulon	$y = 4 \cdot 10^6 x + 3778$	0,9999
Kolupulon	$y = 1 \cdot 10^6 x + 3930$	1,0000
Adlupulon + lupulon	$y = 1 \cdot 10^6 x + 1309$	0,9999

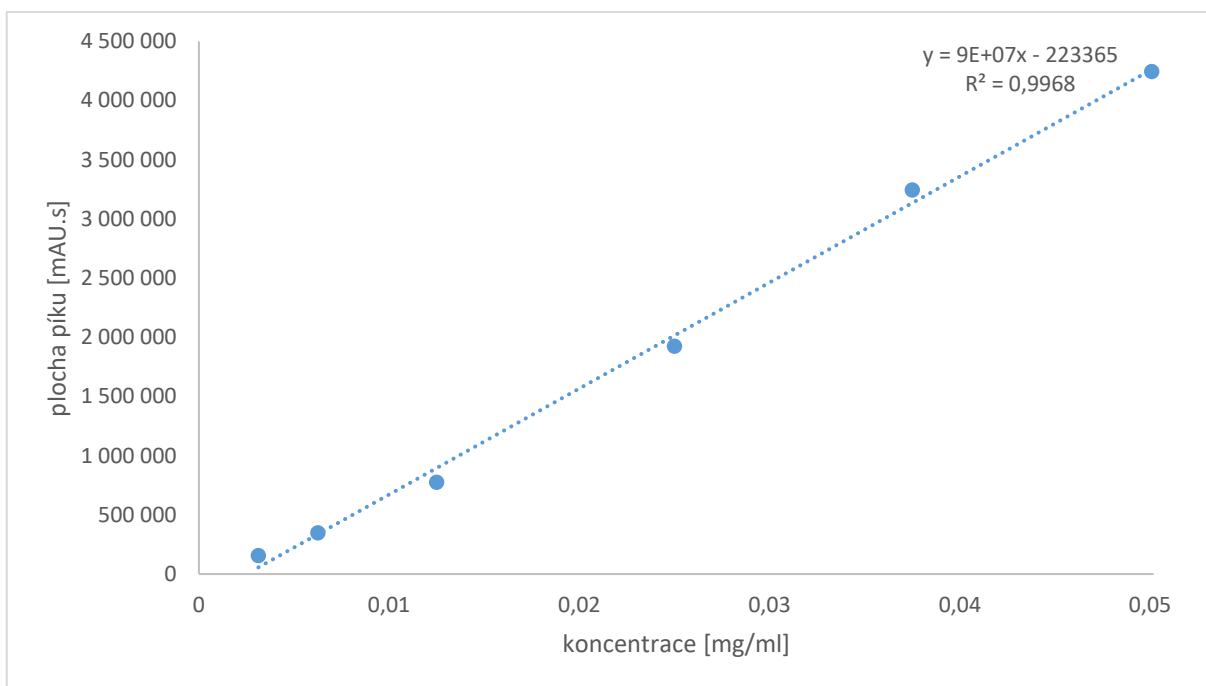
Tabulka 6: Vypočtené směrodatné odchylky úseku a směrnice

Látka	Směrodatná odchylka směrnice	Směrodatná odchylka úseku
Kohumulon	6849	7410
Adhumulon + humulon	8910	9640
Kolupulon	1688	1952
Adlupulon + lupulon	2583	2988

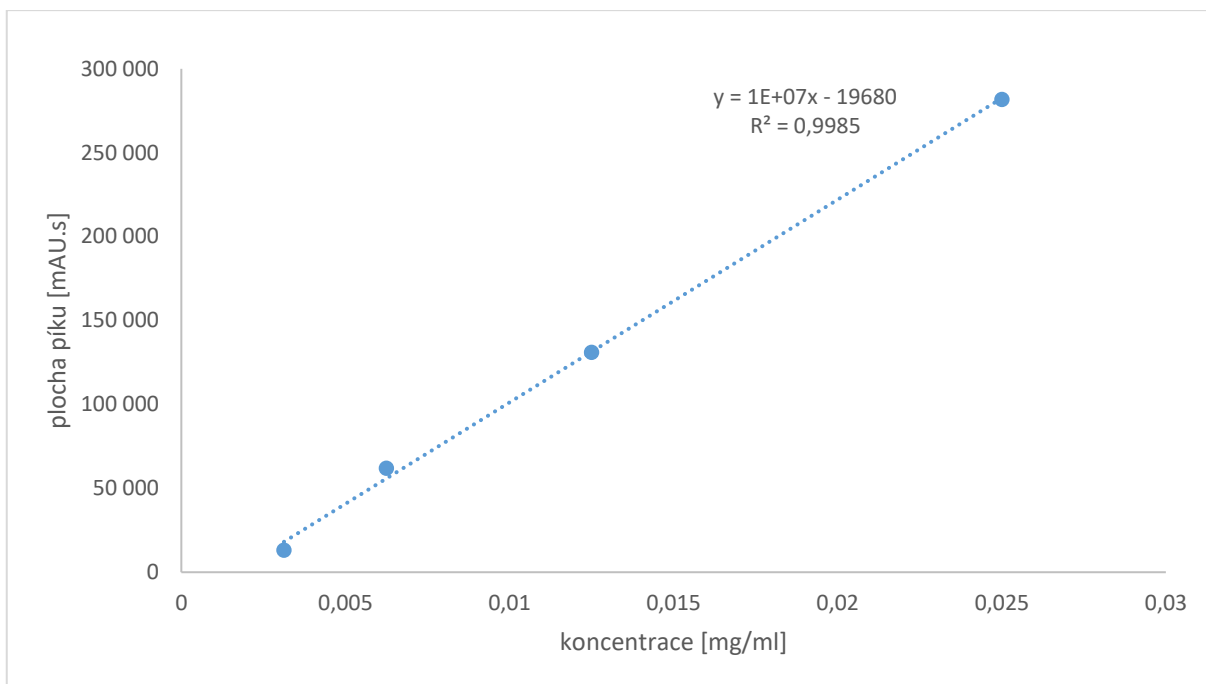
Kalibrační závislosti pro extrakci byly připraveny dle postupu v kapitole 2.4.1.2 do odměrných baněk o objemu 50 ml. Bylo připraveno 9 kalibračních roztoků z chmelového standardu ICE-3 v koncentračním rozmezí 0,00313 – 0,2 mg/ml hořkých kyselin a proměřeny metodou pro hořké kyseliny. U přípravy kalibračních roztoků byl nejprve připraven koncentrovanější standard v 96% ethanolu o koncentraci 5,13 mg/ml, ze kterého byly následně ředěním připraveny kalibrační roztoky s nižší koncentrací a doplněny 5% ethanolem. Z důvodu použití kalibrační přímky pro kvantifikaci ve vzorcích piva bylo jako rozpouštědlo pro hořké kyseliny zvolen 5% ethanol, aby bylo co nejvíce přiblíženo prostředí v reálném vzorku. V 5% ethanolu ale není standard rozpustný, proto bylo zvoleno rozpuštění v 96% ethanolu a následné ředění 5% ethanolem. Pro každou koncentraci byly provedeny 4 extrakce UA-LLME-SFO z 10 ml připraveného roztoku a každý výsledný ethanolový extrakt byl proměřen 3x. Po vyhodnocení a vytvoření kalibračních křivek bylo zjištěno, že kalibrace není ve zvoleném rozsahu koncentrací lineární (uvedeno v příloze II). Z tohoto důvodu musel být kalibrační rozsah upraven na 6 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí 0,00313 – 0,025 mg/ml hořkých kyselin. Získané kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci kalibračních roztoků jsou pro jednotlivé hořké kyseliny znázorněny na obrázku 35 pro kohumulon, na obrázku 36 pro adhumulon + humulon, na obrázku 37 pro kolupulon a na obrázku 38 pro adlupulon + lupulon. V tabulce 7 jsou uvedeny jednotlivé rovnice kalibrační přímky společně s hodnotami koeficientu determinace a v tabulce 8 hodnoty směrodatných odchylek úseku a směrnice příslušných kalibračních závislostí. Vzorový chromatogram z měření této kalibrace je uveden v příloze I.



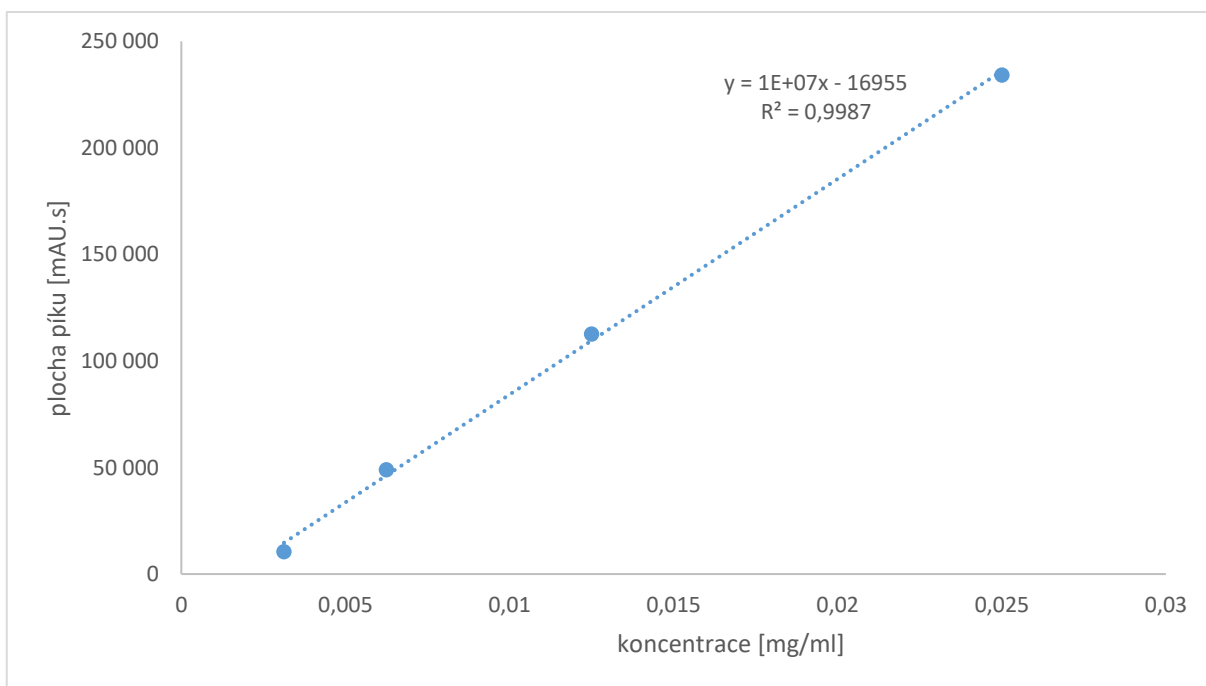
Obrázek 35: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku po extrakci pro kohumulon



Obrázek 36: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku po extrakci pro adhumulon + humulon



Obrázek 37: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku po extrakci pro kolupulon



Obrázek 38: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku po extrakci pro adlupulon + lupulon

Tabulka 7: Rovnice regrese s hodnotou koeficientu determinace jednotlivých kalibračních závislostí po extrakci

Látka	Rovnice regrese	$R^2$
Kohumulon	$y = 5 \cdot 10^7 x - 77106$	0,9988
Adhumulon + humulon	$y = 9 \cdot 10^7 x - 223365$	0,9968
Kolupulon	$y = 1 \cdot 10^7 x - 19680$	0,9985
Adlupulon + lupulon	$y = 1 \cdot 10^7 x - 16955$	0,9987

Tabulka 8: Vypočtené směrodatné odchylky úseku a směrnice v mg/ml pro kalibrační závislosti po extrakci

Látka	Směrodatná odchylka směrnice	Směrodatná odchylka úseku
Kohumulon	777195	21859
Adhumulon + humulon	2554898	71858
Kolupulon	333564	4805
Adlupulon + lupulon	259329	3736

Ze získané rovnice kalibrační přímky bez extrakce byly stanoveny limity detekce a kvantifikace přístroje. Vypočítány byly pomocí šumu, který byl stanoven jako směrodatná odchylka úseku. Limit detekce odpovídá trojnásobku šumu ( $LOD = 3 \cdot S/N$ ) a limit kvantifikace desetinásobku šumu ( $LOQ = 10 \cdot S/N$ ). Stejným způsobem byly stanoveny i hodnoty těchto limitů pro extrakci. Hodnoty limitů detekce a kvantifikace pro přístroj jsou zobrazeny v tabulce 9 společně s hodnotami limitů detekce a kvantifikace pro extrakci. Z porovnání těchto limitů je patrné, že při extrakci dochází k vysokému zakoncentrování. Pro zjištění vhodné vlnové délky pro měření hořkých kyselin byly sledovány 3 různé vlnové délky, a to 314 nm, 237 nm a 202 nm. Při 202 nm absorbují většina sloučenin, proto tato vlnová délka nebyla jako selektivní zvolena. Bylo tedy rozhodováno mezi 237 nm a 314 nm. Z důvodu nižších limitů detekce a kvantifikace při 314 nm byla tato vlnová délka zvolena pro kvantifikaci.

Tabulka 9: Hodnoty limitů detekce a kvantifikace pro přístroj a extrakci

Látka	Limity pro přístroj		Limity pro extrakci	
	LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Kohumulon	8,03	33,16	0,39	0,78
Adhumulon a humulon	5,93	21,86	0,24	0,44
Kolupulon	1,39	11,24	0,56	1,12
Adlupulon a lupulon	6,04	22,61	2,8	5,4



## 3.2 Optimalizace extrakce

Pro výběr optimálních podmínek jednotlivých extrakcí bylo použito statistického programu STATISTICA Cz 12 (StatSoft, Praha, ČR), ve kterém byl navrhován experiment pomocí ortogonálního centrálního kompozitního plánování. Pro optimalizaci byla zvolena koncentrace 0,05 mg/ml odpovídající přibližně dvojnásobku limitu detekce přístroje (viz tabulka 9). Tento roztok byl připraven přes koncentrovanější roztok v 96% ethanolu z důvodu nerozpustnosti standardu v 5% ethanolu. Obsah ethanolu byl zvolen z důvodu podobného složení, jako je složení analyzovaného piva.

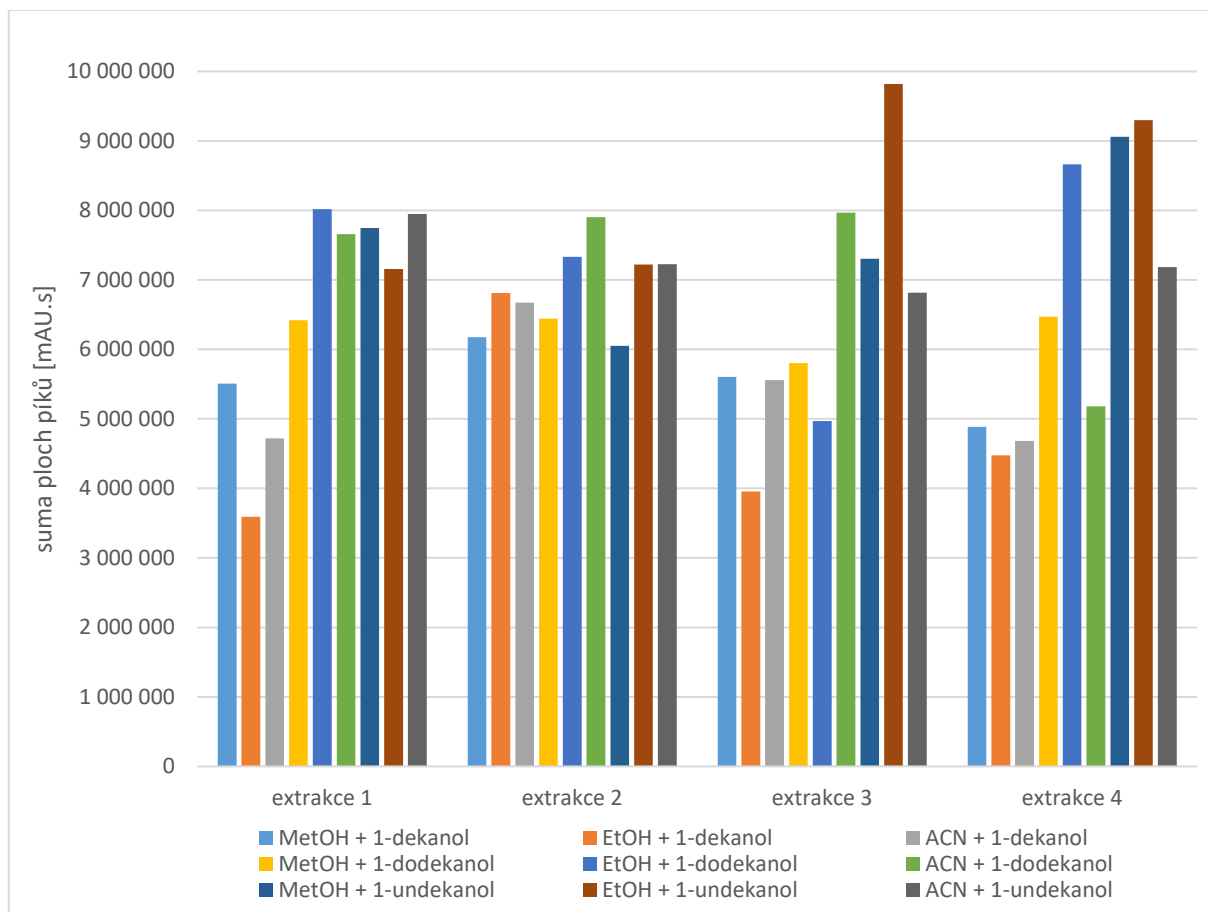
### 3.2.1 Výběr disperzního a extrakčního rozpouštědla

Po výběr extrakčního a disperzního rozpouštědla byla použita disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí plovoucí organickou kapkou dle postupu popsaného v kapitole 2.5.2.1. K extrakci byl brán roztok o koncentraci 0,05 mg/ml a bylo přidáváno 50  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla a 400  $\mu$ l disperzního rozpouštědla. Jako extrakční rozpouštědlo byl zkoumán 1-dekanol, 1-undekanol, 1-dodekanol a jako disperzní rozpouštědla methanol, ethanol a acetonitril. Po prudkém vstříknutí směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla do roztoku standardu byla směs odstředěna při 3000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Po odstředění byla zkumavka vložena do mrazničky na 25 minut, což je dostačující teplota pro ztuhnutí extrakčního rozpouštědla, ale ještě nedochází ke ztuhnutí vodného roztoku standardu. Ztuhnutí vodného roztoku komplikuje odebrání ztuhlého extrakčního rozpouštědla a dochází i společně k odběru vodného roztoku s extrakčním rozpouštědlem. To způsobuje naředění extraktu a po rozehrátí vznikají v chromatografické nádobce dvě nemísitelné vrstvy komplikující následnou analýzu. Získané extrakty byly po odebrání naředěny methanolem v poměru 1:1 z důvodu snížení viskozity extraktu. Tím bylo dosaženo snadnějšího a homogenního nadávkování do přístroje pomocí automatického dávkovače. Pro homogenní nadávkování byl program automatického dávkování upraven tak, aby před nadávkováním ještě docházelo k promíchání směsi extraktu a methanolu. Z důvodu nízké teploty tuhnutí extraktu bylo nastaveno vyhřívání automatického dávkování na teplotu 25 °C, aby nedocházelo při měření více vzorků k tuhnutí extraktů. Všechny extrakty byly proměřeny na kapalinovém chromatografu metodou pro hořké kyseliny a každý byl proměřen 2x.

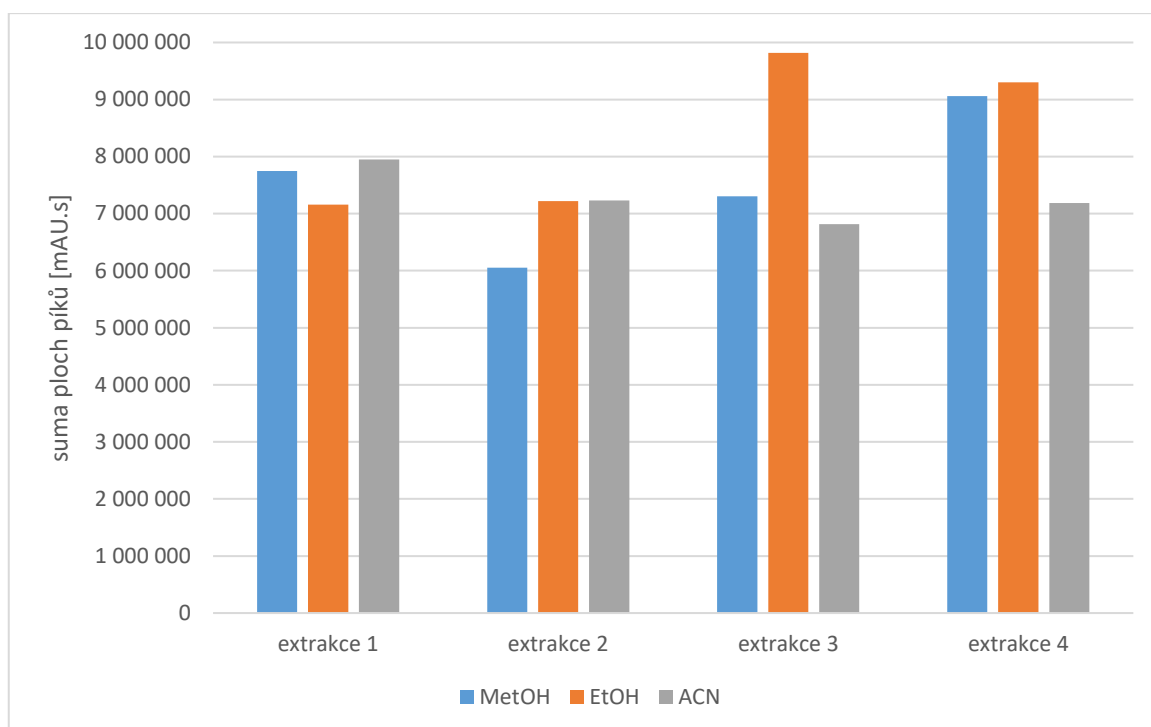
Odečtené plochy byly zprůměrovány pro každou extrakci a vyhodnoceny. Výsledný graf je znázorněn na obrázku 39. Z tohoto grafu vyplývá, že 1-dekanol je nejhorší pro extrakci hořkých kyselin. Z důvodu chvostování píku směsi adhumulonu a humulonu při použití

1-dodekanolu došlo k ovlivnění celkové plochy píků a i k horšímu odečítání ploch píků. Toto rozpouštědlo bylo tedy vyhodnoceno jako nevhodné pro použití pro následné extrakce. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že nejvýhodnější pro extrakci je 1-undekanol.

Pro výběr disperzního rozpouštědla byl vytvořen graf na obrázku 40, pomocí kterého bylo vybráno spojení 1-undekanolu s ethanolem. Při výběru byla hodnocena nejen nejlepší celková plocha píku, ale ethanol byl zvolen i z pohledu jeho obsahu v pivu.



Obrázek 39: Porovnání kombinací směsí disperzních a extrakčních rozpouštědel pro 4 provedené extrakce

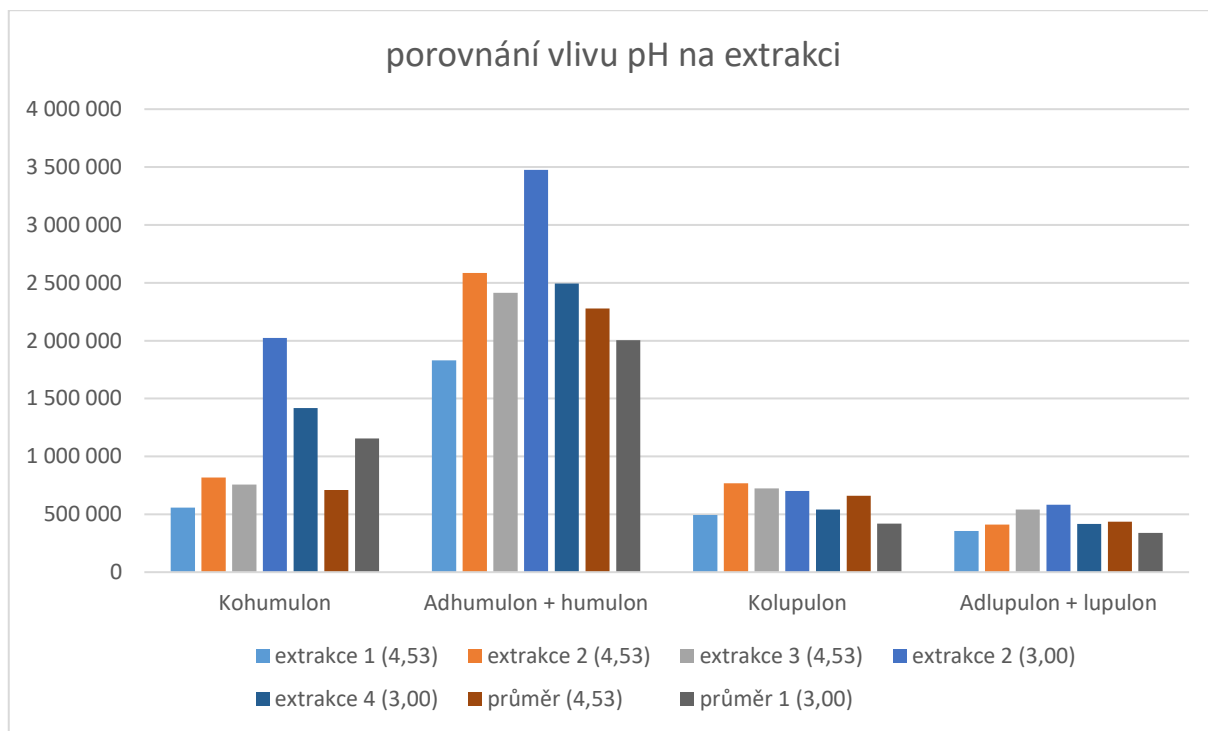


Obrázek 40: Porovnání disperzních rozpouštědel pro spojení s 1-undekanolem

### 3.2.2 Disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou

Pro tuto extrakci byl vygenerován experiment obsahující 27 pokusů pro optimalizaci objemu disperzního a extrakčního rozpouštědla, pH roztoku a doby extrakce mezi vstříknutím směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla a odstředěním. Pro disperzní rozpouštědlo bylo zvoleno rozmezí 100–900 ml, pro extrakční rozpouštědlo 30–90 ml, pH v rozmezí 2–6 a doba extrakce 0–10 minut. Před vygenerováním tohoto experimentu byl sledován vliv pH na extrakci hořkých kyselin. Získaný graf je znázorněn na obrázku 41, ze kterého vyplývá že pro extrakci je nutné optimalizovat i pH roztoku. Podmínky jednotlivých prováděných pokusů jsou uvedeny v příloze IV. Jednotlivé extrakce byly provedeny podle postupu popsáném v kapitole 2.5.2.1. a každá extrakce byla prováděna 2x. Výsledný experiment byl vyhodnocován z průměrných hodnot. Optimální podmínky byly vyhodnoceny pomocí statistického programu metodou vyhodnocení odezvové plochy (Response Surface Methodology) a výsledné odezvové profily jsou znázorněny v příloze III společně s 3D vhodnostními profily. Z těch vyplývá že pro tuto extrakci je nejvhodnější použít 30  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla, protože pro všechny látky platí že se zvyšujícím se objemem extrakčního rozpouštědla dochází ke snižování vhodnosti použití. Menší objem extrakčního rozpouštědla z hlediska nedostatečného objemu extraktu nebyl zkoumán. U disperzního rozpouštědla dochází nejprve k nárůstu vhodnosti u všech látek, ale

poté dochází k výraznějšímu klesání pouze u  $\alpha$ -hořkých kyselin. Z tohoto pohledu bylo použito 600  $\mu$ l disperzního rozpouštědla. Jako optimální doba extrakce bylo zvoleno 7 minut a pH 5. Obě tyto podmínky se chovají stejně jako disperzní rozpouštědlo, kdy dochází nejprve k nárůstu a poté opět k výraznějšímu poklesu zejména pro pH u  $\alpha$ -hořkých kyselin.



Obrázek 41: Porovnání extrakcí při dvou různých hodnotách pH 4,53 (bez úpravy pH) a 3,0 (s úpravou pomocí kyseliny fosforečné)

### 3.2.3 Vzduchem asistovaná kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky

U této extrakce byl optimalizován objem extrakčního rozpouštědla v rozmezí 27–93  $\mu$ l, pH roztoku v rozmezí 2,3–5,7 a počet kroků 2-16 pro natažení směsi extrakčního a disperzního rozpouštědla do stříkačky a jejímu vstříknutí zpět do zkumavky. Pro optimalizaci těchto parametrů byl navržen experiment obsahující 17 pokusů pomocí statistického programu. Podmínky jednotlivých extrakcí jsou uvedeny v příloze IV. Všechny extrakce byly provedeny podle postupu popsáném v kapitole 2.5.2.2. a každá extrakce byla provedena 2x. Výsledný experiment byl vyhodnocován z průměrných hodnot a získané odezvové profily jsou uvedeny v příloze III společně s 3D vhodnostními profily. Z těch vyplývá, že pro tuto extrakci je nejvhodnější kombinací 30  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla, pH 4,5 a 16 kroků. Při zvyšujícím se množství extrakčního rozpouštědla dochází ke snižování odezvy. U pH dochází nejprve

k nárůstu a poté k poklesu hlavně u  $\alpha$ -hořkých kyselin. Pro počet kroků dochází pouze k nárůstu plochy, ale při provedení extrakcí nedocházelo k viditelnému zvětšování zakalení roztoku vlivem disperze a z tohoto důvodu nebylo více kroků zkoušeno.

#### 3.2.4 Ultrazvukem asistovaná kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou

Při této extrakci je využito pro tvorbu disperze ultrazvuku, ale není tvořena pomocí disperzního rozpouštědla. Pro optimalizaci bylo zvoleno ortogonálního centrálního kompozitního plánu obsahujícího 17 experimentů. Jejich přesné podmínky jsou uvedeny v příloze IV. Pomocí těchto podmínek byla každá extrakce provedena 2x a výsledné hodnoty ploch jednotlivých píků byly zprůměrovány. Byl optimalizován objem extrakčního rozpouštědla v rozmezí 27–93  $\mu$ l, pH roztoku v rozmezí 2,3–5,7 a doba v ultrazvuku v rozmezí 2–16 minut. Pomocí statistického programu bylo provedeno vyhodnocení pomocí vhodnostních profilů, které jsou znázorněny v příloze III. Z těchto výsledků vyplývá, že nejlepší podmínky pro tuto extrakci jsou 30  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla, pH 2 a 2 minuty v ultrazvuku.

#### 3.2.5 Ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky

Při optimalizaci této extrakce bylo zjištěno nedostatečné množství extraktu získaného po ztuhnutí. Jedním z možných důvodů je nedostatečné oddělení extrakční fáze od vzorku. Z tohoto důvodu byla nejprve optimalizována rychlost a doba odstředění. Výsledky z optimalizace odstředění jsou znázorněny na obrázku 42 a na obrázku 43 v kapitole 3.2.6.

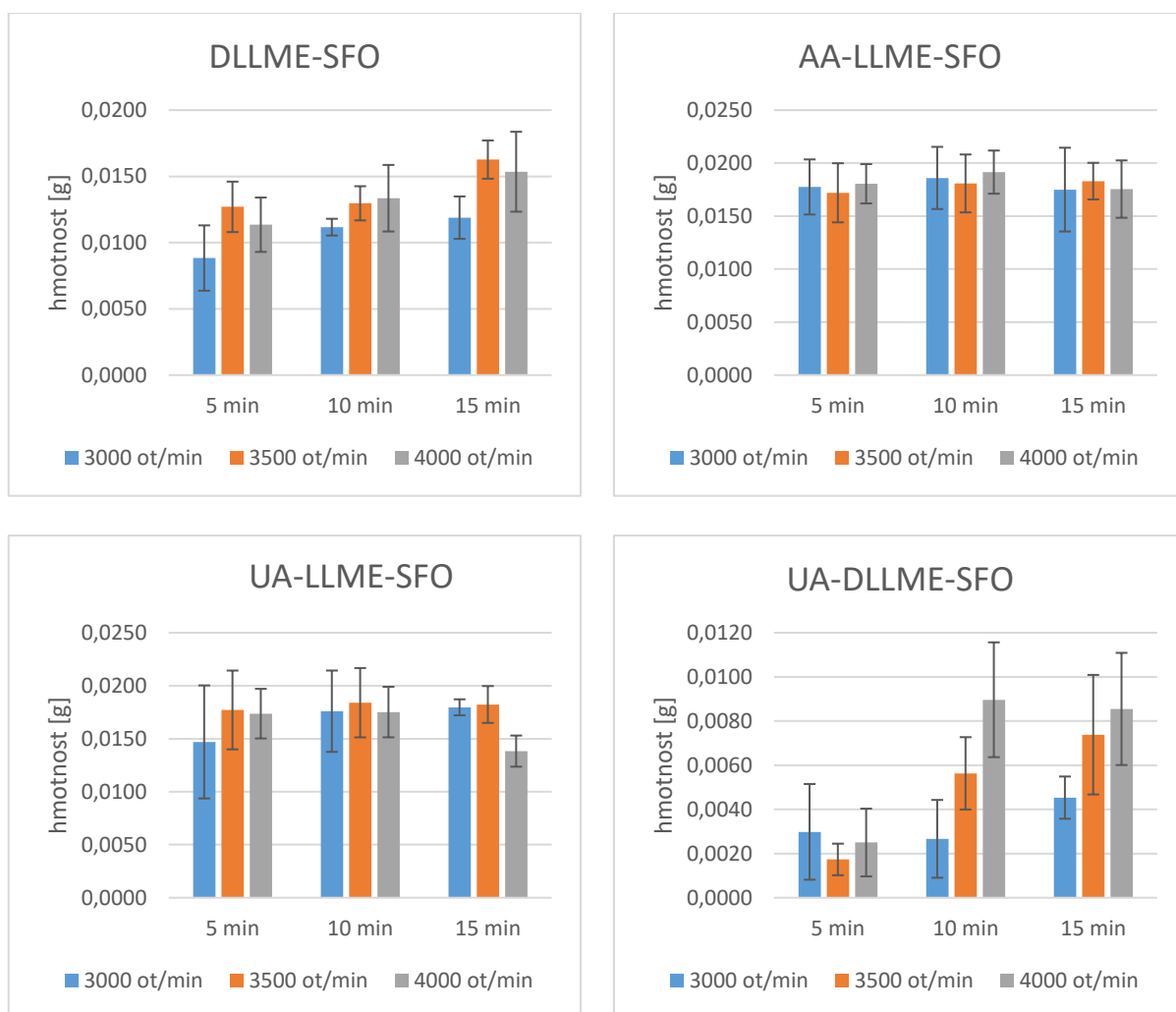
Po zjištění optimálních podmínek odstředění byla provedena optimalizace extrakce, kdy byl vygenerován experiment pomocí statistického programu s 27 experimenty. V příloze IV jsou uvedeny podmínky jednotlivých experimentů. Součástí experimentu byla optimalizace množství extrakčního a disperzního rozpouštědla, pH roztoku a doba roztoku v ultrazvuku. Rozmezí podmínek bylo vybráno 30–90  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla, 100–900  $\mu$ l disperzního rozpouštědla, pH 2–6 a doba v ultrazvuku 0–10 minut. Všechny extrakce byly provedeny 2x a získané plochy, pomocí kterých bylo provedeno vyhodnocení experimentu, byly vypočteny jako průměr hodnot z obou extrakcí. Získané odezvové profily jsou znázorněny v příloze III společně s 3D vhodnostními profily. Jako optimální podmínky bylo vybráno 30  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla, 100  $\mu$ l disperzního rozpouštědla, 10 minut v ultrazvuku a pH 6.

### 3.2.6 Optimalizace doby a rychlosti odstředění

Pro zvýšení množství extraktu byly optimalizovány i otáčky a rychlost odstředění u jednotlivých extrakcí. Množství extraktu bylo sledováno pro jednotlivé extrakční metody při jejich optimalizovaných podmínkách získaných pro koncentraci 0,05 mg/ml. Získané grafy pro optimalizaci množství extraktu v jsou znázorněny na obrázcích 42 pro různé časy a na obrázcích 43 pro různé rychlosti odstředění. Pro DLLME-SFO byly jako optimální podmínky odstředění vyhodnoceny 3500 otáček za minutu po dobu 15 minut, pro AA-DLLME-SFO 4000 otáček za minutu po dobu 10 minut, pro UA-LLME-SFO 3500 otáček za minutu po dobu 10 minut a pro UA-DLLME-SFO 4000 otáček za minutu po dobu 10 minut.



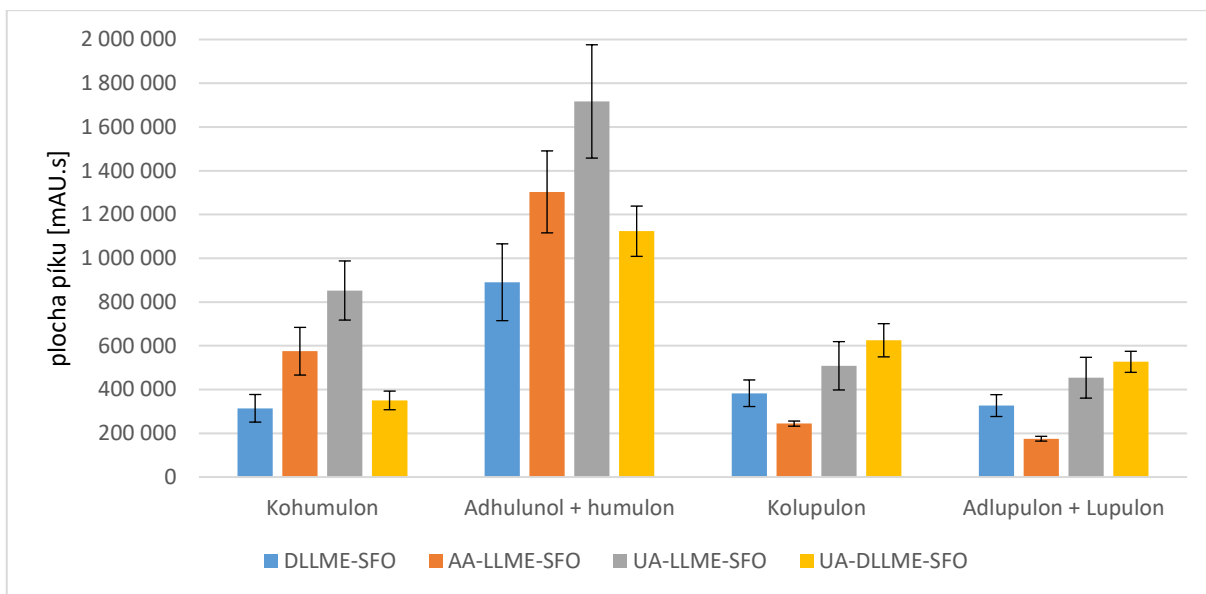
Obrázek 42: Grafy pro optimalizaci rychlosti a doby odstředění u všech extrakcí pro různé časy (n = 6) (DLLME-SFO – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztunutí organické kapky, AA-LLME-SFO – vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztunutí organické kapky, UA-LLME-SFO – ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztunutí organické kapky, UA-DLLME-SFO – ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztunutí organické kapky s disperzním rozpouštědlem)



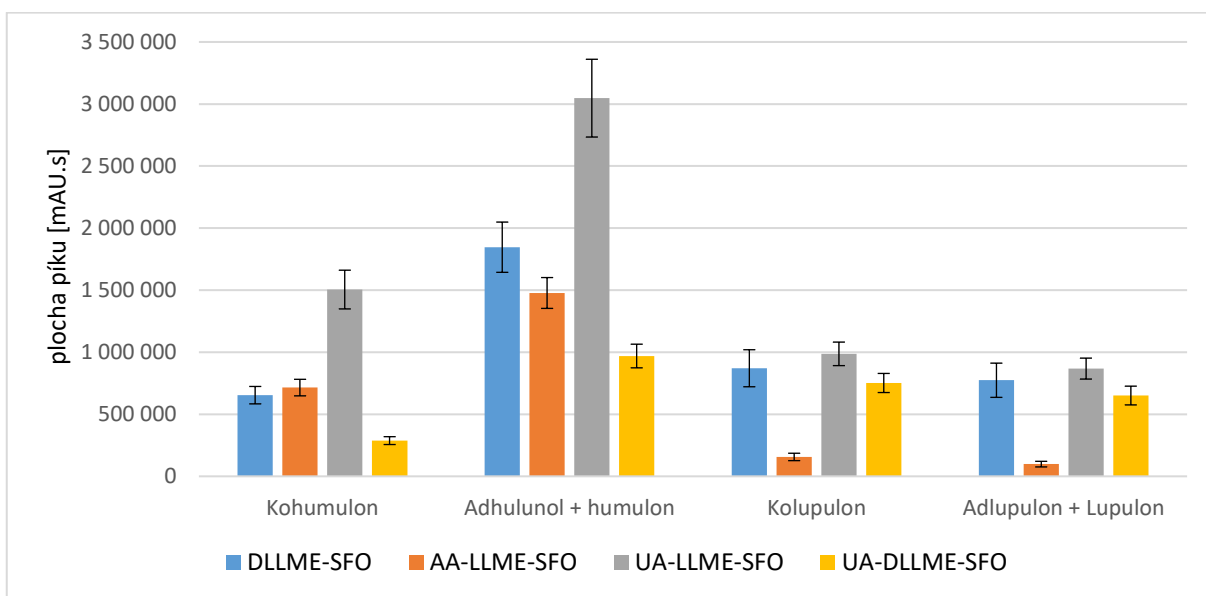
Obrázek 43: Grafy pro optimalizaci rychlosti a doby odstředění u všech extrakcí pro různé rychlosti odstředění ( $n = 6$ ) (DLLME-SFO – disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky, AA-LLME-SFO – vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky, UA-LLME-SFO – ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky, UA-DLLME-SFO – ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce využívající ztuhnutí organické kapky s disperzním rozpouštědlem)

### 3.2.7 Výběr extrakční metody pro analýzu vzorků piva

Pro výběr metody extrakce bylo provedeno 6 extrakcí od každého typu extrakce, tedy DLLME-SFO, AA-LLME-SFO, UA-LLME-SFO a UA-DLLME-SFO, při nalezených optimálních podmínkách. Výsledky byly porovnány v grafu na obrázku 44, pro koncentraci 0,05 mg/ml a na obrázku 45 pro koncentraci 0,1 mg/ml. Jako další parametr pro porovnání byl sledován i výtěžek extrakce (množství získaného extraktu), který je znázorněn na obrázku 46. Porovnání bylo provedeno pro dvě koncentrace pro sledování vlivu koncentrace na účinnost extrakce.

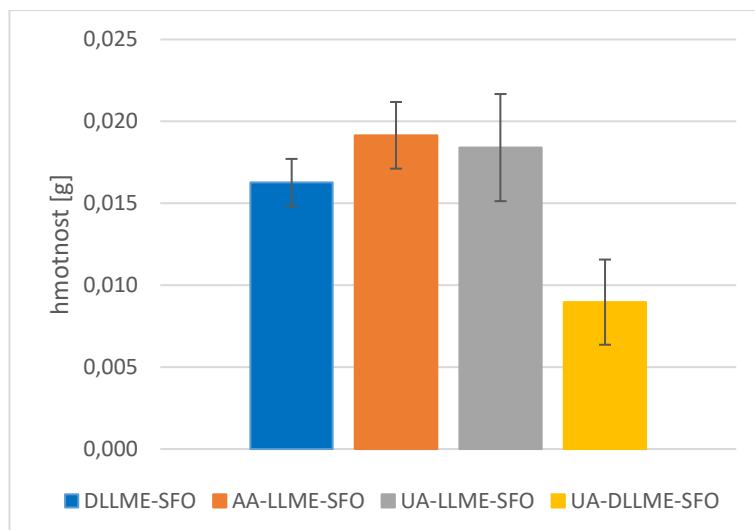


Obrázek 44: Porovnání extrakcí pro koncentraci 0,05 mg/ml (n = 6)



Obrázek 45: Porovnání extrakcí pro koncentraci 0,1 mg/ml (n = 6)





Obrázek 46: Porovnání extrakcí z pohledu množství extraktu ( $n = 6$ )

Z grafu pro množství extraktu nelze jednoznačně určit, která extrakce je z tohoto pohledu nejvýhodnější, proto byly pro rozhodování vypracovány i grafy zohledňující účinnost extrakce z hlediska plochy píků. Z těchto grafů vyplývá, že koncentrace roztoku má vliv na porovnání extrakcí, kdy například při extrakci AA-LLME-SFO dochází při vyšší koncentraci (0,1 mg/ml) ke snížení plochy extrakce v porovnání s DLLME-SFO. Z obou grafů vyplývá, že pro obě koncentrace je nejvhodnější extrakce UA-LLME-SFO pro stanovení hořkých kyselin v reálných vzorcích piva. Výběr vhodné extrakce byl proveden pro  $\alpha$ -hořké kyseliny, tedy kohumulon, adhumulon a humulon, z důvodu jejich vyššího výskytu ve vzorcích piva chmelených za studena. V případě piv vyrobených klasickým způsobem chmelení dochází k izomerační reakci a obsah  $\alpha$ -hořké kyselin je tak významně snížen. Z tohoto důvodu jsou pro výběr extrakce především zohledňovány  $\alpha$ -hořké kyseliny.

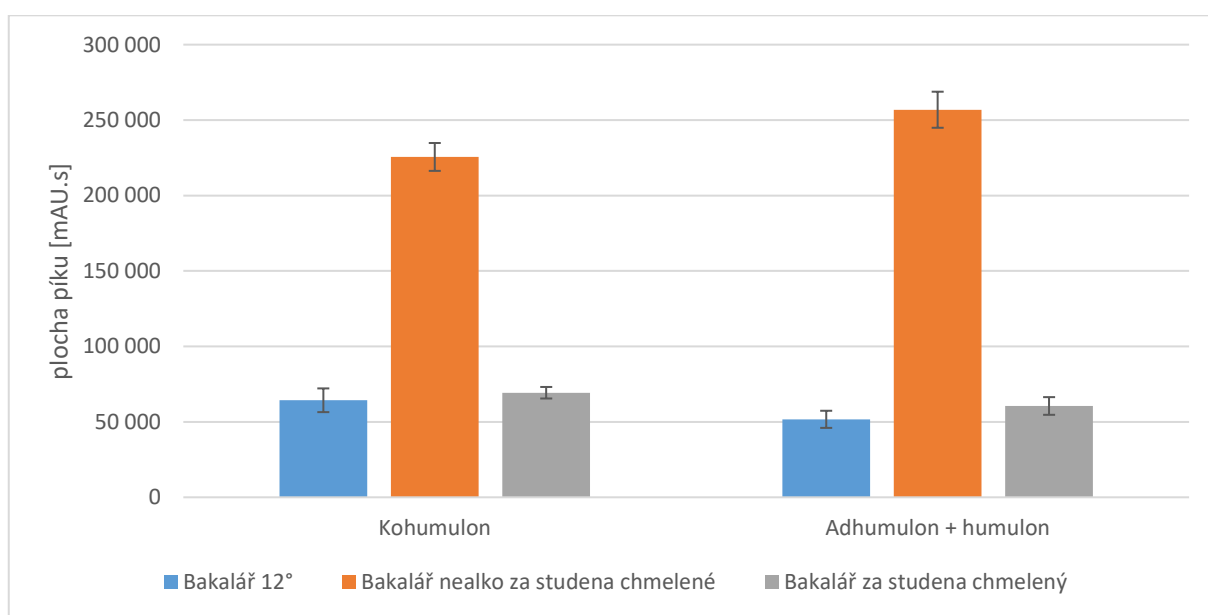
### 3.3 Obsah hořkých kyselin ve vzorcích piva

Vzorky piva byly vytřepány při 1000 otáčkách za minutu po dobu 40 minut pro odstranění oxidu uhličitého přítomného ve vzorku, který by ovlivňoval účinnost extrakce z důvodu účasti na tvorbě disperze. Poté byly všechny vzorky okyseleny na pH 2 pomocí kyseliny fosforečné z důvodu optimální hodnoty pH vycházející z optimalizace extrakce UA-LLME-SFO, která byla vybrána jako nejvhodnější pro extrakci hořkých kyselin z reálných vzorků. Do takto upravených 10 ml piva bylo prudce vstříknuto 30  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla 1-undekanolu a směs byla vložena na 2 minuty do ultrazvuku. Poté byla odstředěna v odstředivce a vložena do mrazničky na 25 minut pro ztuhnutí extraktu. Každý vzorek byl extrahován 6x. Získané extrakty po provedení extrakce byly naředěny methanolem v poměru 1:1 a poté proměřeny pomocí kapalinové chromatografie zvolenou metodou pro hořké kyseliny. Každý extrakt byl 2x proměřen. Získané hodnoty byly zprůměrovány a vyhodnoceny.

Pro analýzu hořkých kyselin bylo vybráno 13 piv snadno dostupných v obchodních řetězcích a 1 speciální pivo. Piva byla vybírána tak, aby od stejné značky bylo vybráno pivo chmelené za studena a pivo klasické s podobnou stupňovitostí a obsahem alkoholu. U většiny piv bylo chmelení za studena dohledáváno na webových stránkách pivovarů z důvodu neuvedení způsobu chmelení na etiketě. Identifikace hořkých kyselin v reálných vzorcích byla provedena pomocí kalibrační přímky, která byla připravena ze standardních roztoků podrobených extrakci. Druhým způsobem identifikace byl zvolen standardní přídavek, kdy do 10 ml upraveného piva k extrakci bylo přidáno malé množství standardu ICE-3. Standardní přídavek byl zvolen z důvodu očekávaných přesnějších výsledků a z důvodu zohlednění vlivu matrice v průběhu extrakce s přidaným standardem.

Ve vzorcích klasických piv byl očekáván nižší obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin, které jsou při varu izomerovány na rozdíl od piva chmeleného za studena, ve kterém jsou  $\alpha$ -hořké kyseliny zastoupeny ve vyšším množství z důvodu přímého přechodu  $\alpha$ -hořkých kyselin z chmele do piva bez možnosti izomerace při vyšší teplotě. U  $\beta$ -hořkých kyselin nelze pozorovat takový rozdíl, protože u nich nedochází k izomeraci a tím k výraznějšímu rozdílu. Pomocí zvolené extrakční metody byly v extraktu stanoveny pouze  $\alpha$ -hořké kyseliny a  $\beta$ -hořké kyseliny byly detekovány pouze ve speciálním pivu Raven IPA. Vzorové chromatogramy z měření všech reálných vzorků piv jsou uvedeny v příloze I.

Piva značky bakalář byla zakoupena 3 – Bakalář světlý ležák (klasicky chmelený), bakalář nealko za studena chmelený a bakalář za studena chmelený. Porovnání těchto tří piv z hlediska obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin jsou znázorněny na obrázku 47. Z tohoto obrázku vyplývá, že nejvíce za studena chmelené bylo nealkoholické pivo, které obsahuje nejvíce  $\alpha$ -hořkých kyselin. Rozdíl mezi pivem s obsahem alkoholu chmeleným za studena a klasicky chmeleným nebyl nijak výrazně prokázán a lze tedy říci, že chmelení za studena nebylo provedeno nebo nebylo dostatečné pro přechod  $\alpha$ -hořkých kyselin z chmele do piva. Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Bakalář stanovené pomocí kalibrační přímky a pomocí standardního přídatku jsou uvedeny v tabulce 10.

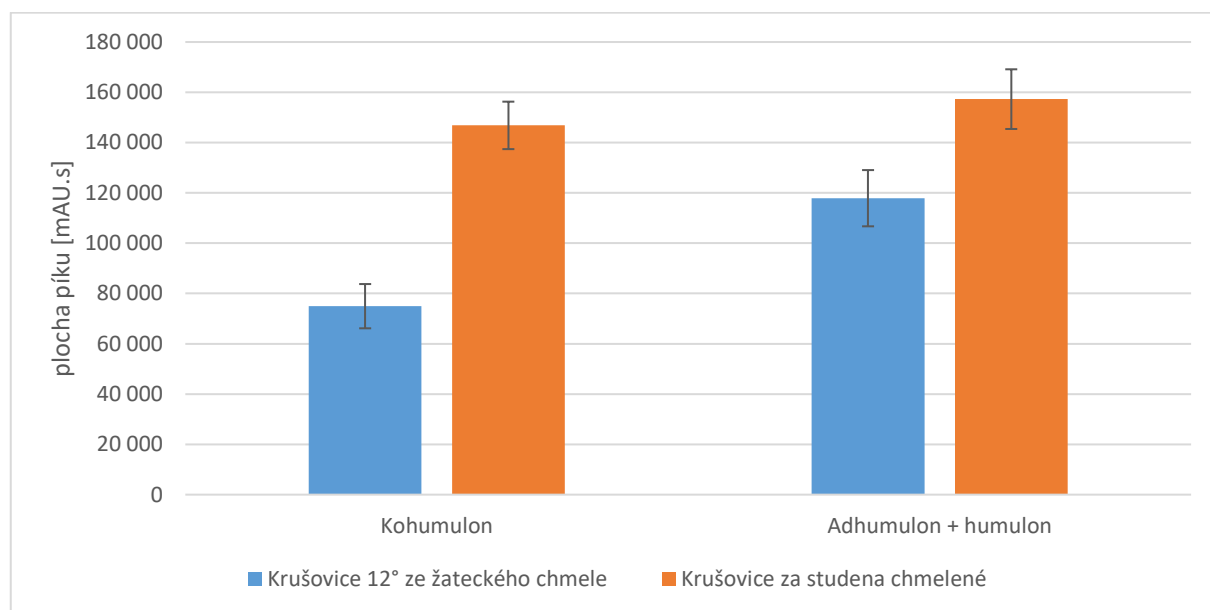


Obrázek 47: Porovnání ploch píků  $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Bakalář (n=6)

Tabulka 10: Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Bakalář (n=6)

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídatek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Bakalář 12°	2,83 ± 0,16	3,06 ± 0,06	6,30 ± 0,50	3,17 ± 0,08
Bakalář nealko za studena chmelený	6,07 ± 0,17	5,51 ± 0,22	6,91 ± 0,23	6,34 ± 0,95
Bakalář za studena chmelený	2,93 ± 0,08	3,15 ± 0,06	5,32 ± 0,47	3,23 ± 0,47

Piva značky Krušovice byla zakoupena 2 – Krušovice 12° ze žateckého chmele a Krušovice za studena chmelené. Porovnání ploch píků pro  $\alpha$ -hořké kyseliny je znázorněno na obrázku 48 a v tabulce 11 jsou uvedeny koncentrace stanovených  $\alpha$ -hořkých kyselin. Z obrázku vyplývá, že rozdíl v obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin je vyšší u obsahu kohumulonu než u adhumulonů s humulonem a lze tedy pozorovat rozdíl mezi pivem klasicky chmeleným a pivem chmeleným za studena.

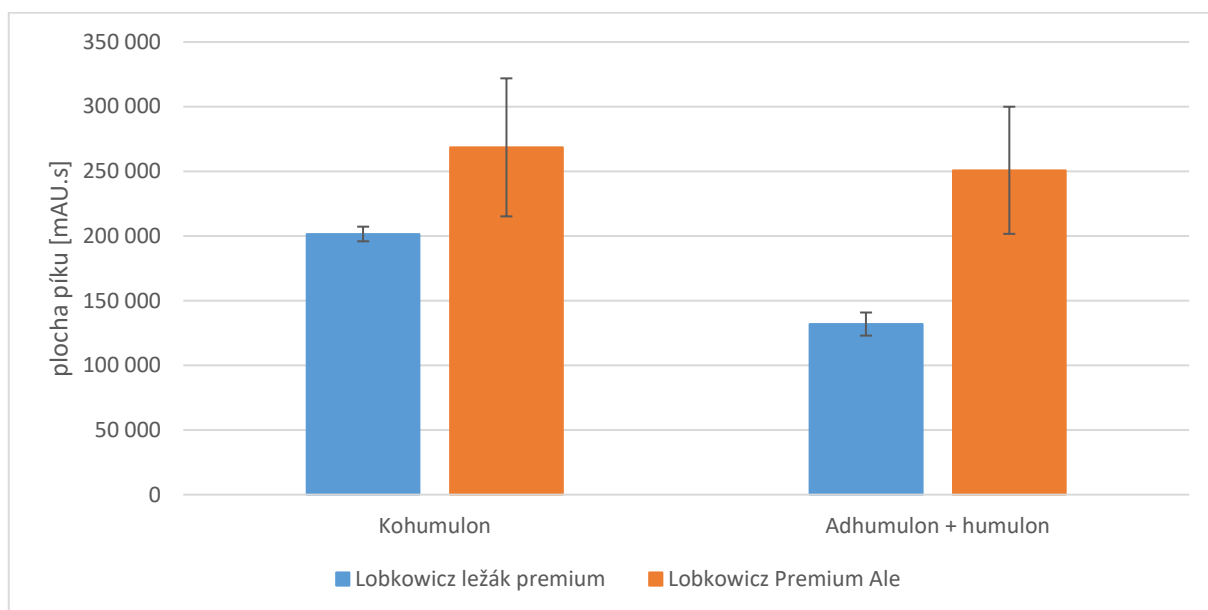


Obrázek 48: Porovnání ploch píků  $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Krušovice ( $n = 6$ )

Tabulka 11: Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Krušovice ( $n=6$ )

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Krušovice 12° ze žateckého chmele	$3,04 \pm 0,76$	$3,79 \pm 0,12$	$6,47 \pm 0,18$	$7,47 \pm 0,16$
Krušovice za studena chmelené	$4,48 \pm 0,19$	$4,23 \pm 0,13$	$3,97 \pm 0,72$	$4,47 \pm 0,20$

Piva značky Lobkowicz byla zakoupena 2 – Lobkowicz premium ležák a Lobkowicz premium ALE (za studena chmelené). Porovnání ploch píků pro  $\alpha$ -hořké kyseliny je znázorněno na obrázku 49 a v tabulce 12 jsou uvedeny koncentrace stanovených  $\alpha$ -hořkých kyselin. Z obrázku vyplývá, že rozdíl v obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin je vyšší u obsahu adhumulonů s humulonem než u kohumulonů a lze tedy pozorovat rozdíl mezi pivem klasicky chmeleným a pivem chmeleným za studena.

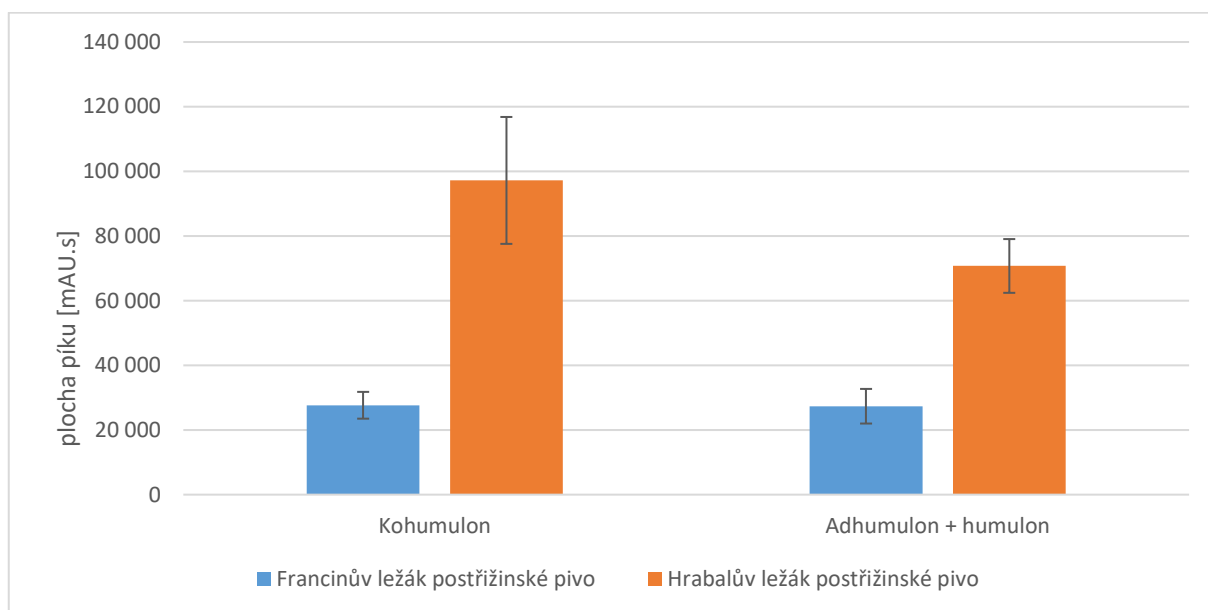


Obrázek 49: Porovnání ploch píků  $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Lobkowicz ( $n = 6$ )

Tabulka 12: Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Lobkowicz ( $n=6$ )

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Lobkowicz ležák premium	$5,57 \pm 0,11$	$3,95 \pm 0,10$	$5,39 \pm 0,98$	$4,69 \pm 0,74$
Lobkowicz premium ALE	$6,91 \pm 0,11$	$5,27 \pm 0,54$	$6,29 \pm 0,81$	$6,12 \pm 0,23$

Piva značky Postřižinské byla zakoupena 2 – Francinův ležák a Jubilejní Hrabalův ležák (za studena chmelené). Porovnání ploch píků pro  $\alpha$ -hořké kyseliny je znázorněno na obrázku 50 a v tabulce 13 jsou uvedeny koncentrace stanovených  $\alpha$ -hořkých kyselin. Z obrázku vyplývá, že rozdíl v obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin je vyšší u obsahu všech  $\alpha$ -hořkých kyselin - kohumulonu i adhumulonů s humulonem a lze pozorovat rozdíl mezi pivem klasicky chmeleným a pivem chmeleným za studena.

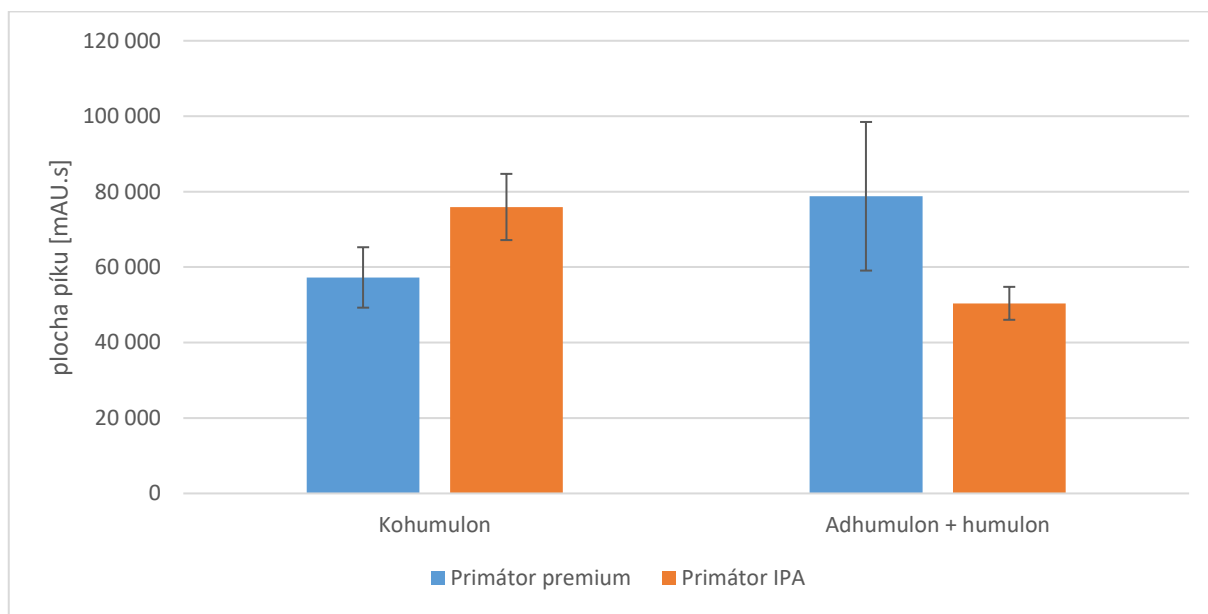


Obrázek 50: Porovnání ploch píků  $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Postřižinské ( $n=6$ )

Tabulka 13: Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Postřižinské ( $n=6$ )

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Francinův ležák	2,10 ± 0,08	2,79 ± 0,06	2,85 ± 0,42	1,66 ± 0,36
Jubilejní Hrabalův ležák	3,49 ± 0,39	3,27 ± 0,09	4,48 ± 0,13	5,61 ± 0,72

Piva značky Primátor byla zakoupena 2 – Primátor premium a Primátor India Pale Ale (za studena chmelené). Porovnání ploch píků pro  $\alpha$ -hořké kyseliny je znázorněno na obrázku 51 a v tabulce 14 jsou uvedeny koncentrace stanovených  $\alpha$ -hořkých kyselin. Z obrázku vyplývá, že rozdíl v obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin lze pozorovat pouze u kohumulonu, ale obsah adhumulonů s humulonem je nižší.

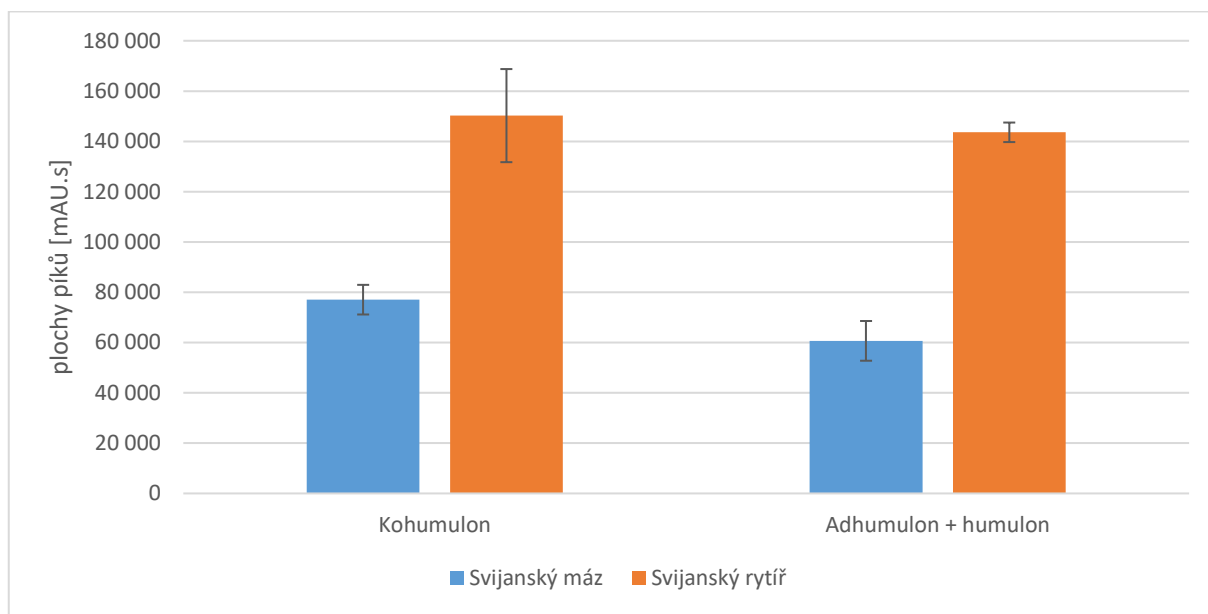


Obrázek 51: Porovnání ploch píků  $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Primátor (n=6)

Tabulka 14: Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Primátor (n=6)

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Primátor premium	2,69 ± 0,16	3,36 ± 0,22	6,22 ± 0,27	5,02 ± 0,13
Primátor IPA	3,03 ± 0,19	3,04 ± 0,06	7,35 ± 0,16	4,08 ± 0,79

Piva značky Svijany byla zakoupena 2 – Svijanský máz a Svijanský rytíř (za studena chmelené). Porovnání ploch píků pro  $\alpha$ -hořké kyseliny je znázorněno na obrázku 52 a v tabulce 15 jsou uvedeny koncentrace stanovených  $\alpha$ -hořkých kyselin. Na obrázku lze pozorovat velký rozdíl mezi klasicky chmeleným pivem a pivem chmeleným za studena v obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin.



Obrázek 52: Porovnání ploch píků  $\alpha$ -hořkých kyselin obsažených v pivech značky Svijany ( $n=6$ )

Tabulka 15: Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin v pivech značky Svijany ( $n=6$ )

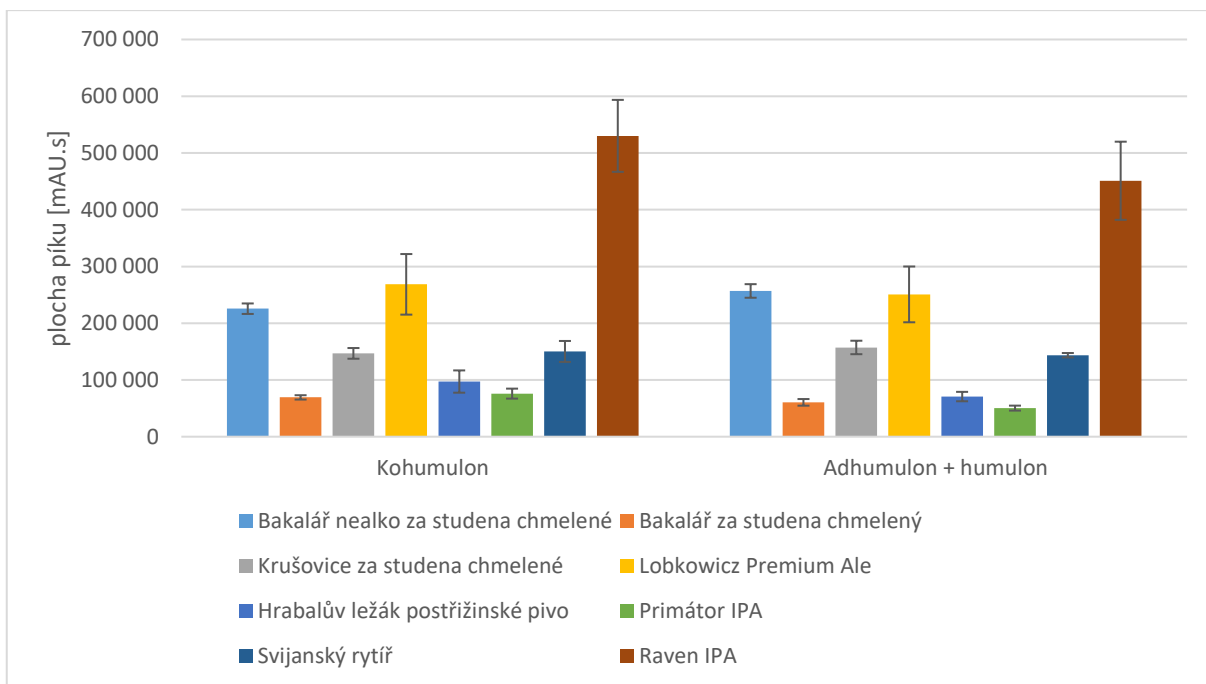
	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Svijanský máz	$3,08 \pm 0,12$	$3,16 \pm 0,09$	$5,75 \pm 0,11$	$2,41 \pm 0,27$
Svijanský rytíř	$4,55 \pm 0,37$	$4,08 \pm 0,04$	$4,61 \pm 0,16$	$3,38 \pm 0,64$



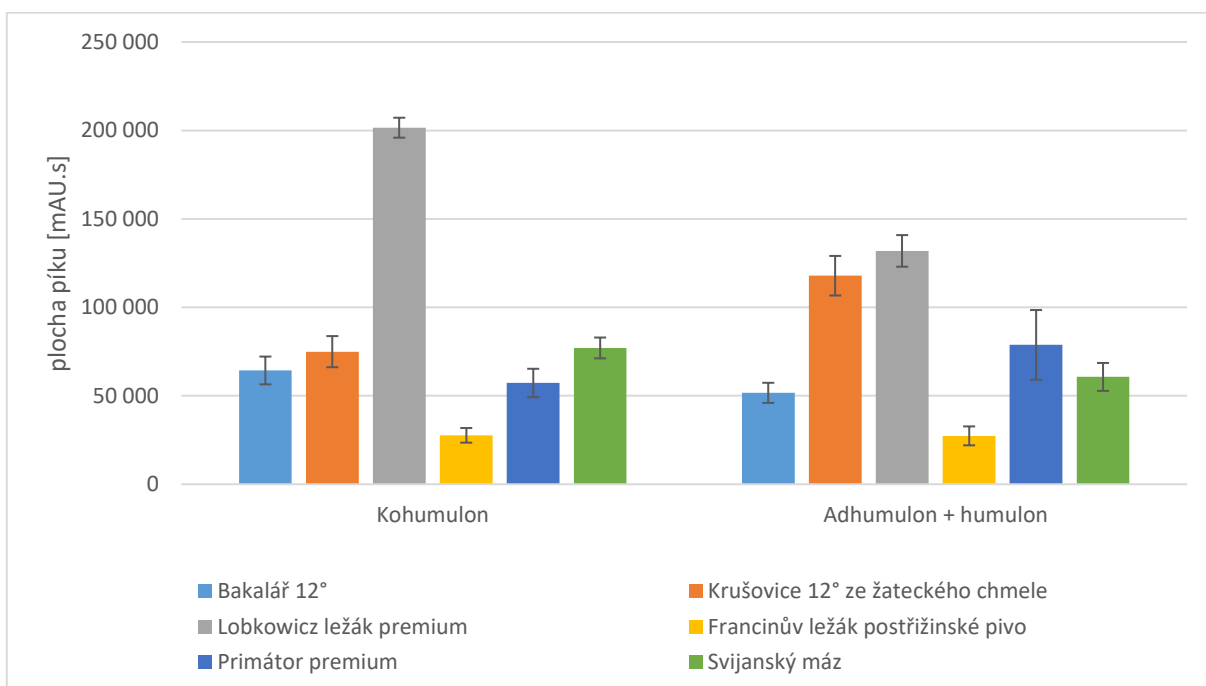
Pro porovnání všech piv mezi sebou jsou na obrázku 53 znázorněny všechna zastudena chmelená piva, na obrázku 54 všechna klasická piva a na obrázku 55 všechna piva dohromady. Nejvyšší zastoupení  $\alpha$ -hořkých kyselin z piv chmelených za studena je v pivu Raven IPA, ve kterém se jako v jediném vzorku povedlo stanovit i obsah  $\beta$ -hořkých kyselin. Obsah stanovených látek je uveden v tabulce 16. Vysoký podíl  $\alpha$ -hořkých kyselin lze pozorovat i u nealkoholického piva za studena chmeleného značky Bakalář a Lobkowicz premium ALE. Z dostupných piv prodávaných v běžné obchodní síti je nejvyšší rozdíl v obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin u alkoholických piv za studena chmelených a klasicky chmelených značky Svijany a Postřižinské pivo. Z porovnání klasicky chmelených piv lze říci, že nejnižší obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin je u Postřižinského piva (Francinův ležák), u kterého lze očekávat vyšší hořkost z důvodu izomerace nejvyššího množství  $\alpha$ -hořkých kyselin. Naopak u piva značky Lobkowicz lze pozorovat nejvyšší obsah hořkých kyselin a lze očekávat nejnižší hořkost z vybraných piv z pohledu obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin.

Tabulka 16: Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin v pivu značky Raven ( $n=6$ )

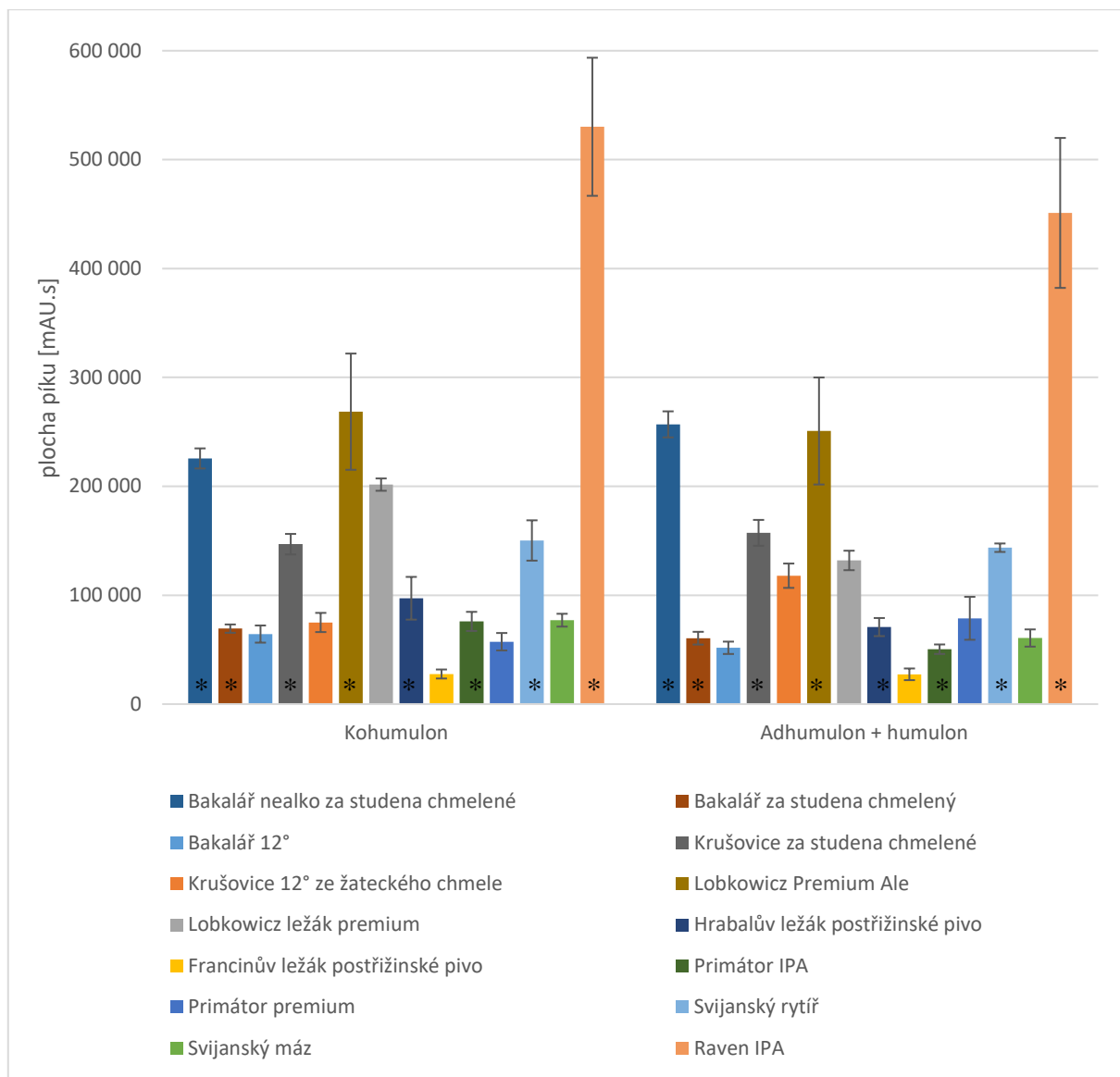
		IPA Raven [mg/l]
Kalibrační přímka	Kohumulon	12,1 ± 1,27
	Adhumulon + humulon	7,49 ± 0,76
	Kolupulon	7,53 ± 0,24
	Adlupulon + lupulon	6,50 ± 0,15
Standardní přídavek	Kohumulon	14,7 ± 3,20
	Adhumulon + humulon	7,67 ± 0,23
	Kolupulon	6,25 ± 0,74
	Adlupulon + lupulon	8,65 ± 0,43



Obrázek 53: Porovnání piv za studena chmelených všech značek (n=6)



Obrázek 54: Porovnání piv klasicky chmelených všech značek (n=6)



Obrázek 55: Porovnání obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin u všech analyzovaných piv ( $n=6$ )  
 (\* - označení piv chmelených za studena)

## 4 Závěr

V teoretické části byla vypracována literární rešerše, která je nejvíce zaměřena na popis disperzní kapalinové mikroextrakce, různých modifikací této techniky a možnosti spojení se separačními a spektrálními technikami. V menší míře je popsána kapalinová chromatografie, výroba piva, různé způsoby chmelení piva, mikrobiologie piva a analýza složek piva.

Úkolem této diplomové práce bylo v experimentální části optimalizovat různé podmínky disperzní kapalinové mikroextrakce a stanovení rozdílu v obsahu  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin v pivech chmelených klasicky a v pivech chmelených za studena. Celkem bylo porovnáno 6 značek piv a jedno speciální za studena chmelené.

Při optimalizaci různých podmínek disperzní kapalinové mikroextrakce byly nejprve zkoumány různé kombinace extrakčních (1-dekanol, 1-undekanol a 1-dodekanol) a disperzních rozpouštědel (methanol, ethanol a acetonitril) pro extrakci DLLME-SFO. Jako nejvhodnější byla zvolena směs 1-undekanolu a ethanolu. Dále byl zkoumán vliv pH na extrakci  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin, u kterého bylo prokázáno, že je nutné tento parametr zařadit do optimalizace.

Byly zkoumány různé způsoby tvorby disperze – prudkým vstříknutím disperzního rozpouštědla, disperze tvořená pomocí vzduchu, disperze tvořená pomocí ultrazvuku a spojení disperze tvořené ultrazvukem s prudkým vstříknutím disperzního rozpouštědla. Všechny tyto modifikace disperzní kapalinové mikroextrakce byly optimalizovány pomocí ortogonálního centrálního kompozitního plánování, kdy byly zvoleny jako parametry pro jednotlivé pokusy objem extrakčního rozpouštědla, pH roztoku, doba extrakce a způsob tvorby disperze. Při optimalizovaných podmínkách byly všechny extrakce porovnány. Jako nejvhodnější byla zvolena extrakce s využitím ultrazvuku pro tvorbu disperze.

V extraktech reálných vzorků piv byly pomocí kapalinové chromatografie s detektorem s diodovým polem stanoveny ve všech vzorcích z obchodní sítě jen  $\alpha$ -hořké kyseliny, pouze u vzorku reprezentujícího piva chmelená za studena (Raven IPA) byly stanoveny i  $\beta$ -hořké kyseliny.

Touto prací byla prokázána možnost stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin v reálných vzorcích piv pomocí disperzní kapalinové mikroextrakce s tuhnoucí plovoucí organickou kapkou a možnost analýzy extraktu pomocí HPLC-DAD. Bylo také prokázáno, že lze pozorovat rozdíl v  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselinách mezi pivem klasicky chmeleným a pivem chmeleným za studena.

## 5 Použitá literatura

- [1] ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. a T. GRZEŚKOWIAK. Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011, **30**(9), 1382-1399. DOI: 10.1016/j.trac.2011.04.014. ISSN 0165-9936.
- [2] RYKOWSKA, I., J. ZIEMBLIŃSKA a I. NOWAK. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. *Journal of Molecular Liquids*. 2018, **259**, 319-339. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.03.043.
- [3] PŁOTKA-WASYLKA, J., K. OWCZAREK a J. NAMIEŚNIK. Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016, **85**, 46-64. DOI: 10.1016/j.trac.2016.08.010.
- [4] PRIMEL, E., S. CALDAS, L. MARUBE a A. ESCARRONE. An overview of advances in dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2017, **14**, 1-18. DOI: 10.1016/j.teac.2017.03.001.
- [5] REZAAEE, M., Y. ASSADI, M.-R. MILANI HOSSEINI, E. AGHAEI, F. AHMADI a S. BERIJANI. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1116**(1-2), 1-9. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.007.
- [6] GHAMBARIAN, M., Y. YAMINI a A. ESRAFILI. Liquid-phase microextraction based on solidified floating drops of organic solvents. *Microchim Acta*. 2013, **180**(7-8), 519-535. DOI: 10.1007/s00604-013-0969-8.
- [7] VIÑAS, P., N. CAMPILLO a V. ANDRUCH. Recent achievements in solidified floating organic drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **68**, 48-77. DOI: 10.1016/j.trac.2015.02.005.
- [8] ASGHARI, A., E. FAHIMI, M. BAZREGAR, M. RAJABI a L. BOUTORABI. Rapid determination of some psychotropic drugs in complex matrices by tandem dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2017, **1052**, 51-59. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.03.012.
- [9] BERIJANI, S., Y. ASSADI, M. ANBIA, M.-R. MILANI HOSSEINI a E. AGHAEI. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame

- photometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1123**(1), 1-9. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.05.010.
- [10] AHMAD, W., A. A. AL-SIBAAI, A. S. BASHAMMAKH, H. ALWAEEL a M. S. EL-SHAHAWI. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **72**, 181-192. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.022.
- [11] MANSOUR, F. a N. DANIELSON. Solvent-terminated dispersive liquid-liquid microextraction: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 2018, **1016**, 1-11. DOI: 10.1016/j.aca.2018.02.005.
- [12] MARTÍNEZ, D., G GRINDLAY, L. GRAS a J. MORA. Determination of cadmium and lead in wine samples by means of dispersive liquid-liquid microextraction coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018, **67**, 178-183. DOI: 10.1016/j.jfca.2018.01.013.
- [13] MANSOUR, F. a M. KHAIRY. *Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid-liquid microextraction*. 2017, **1061-1062**, 382-391. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.07.055.
- [14] ŠANDREJOVÁ, J., N. CAMPILLO, P. VIÑAS a V. ANDRUCH. Classification and terminology in dispersive liquid-liquid microextraction. *Microchemical Journal*. 2016, **127**, 184-186. DOI: 10.1016/j.microc.2016.03.007.
- [15] MANSOUR, F. a N. DANIELSON. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. *Talanta*. 2017, **170**, 22-35. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.03.084.
- [16] KHALILI ZANJANI, M., Y. YAMINI, S. SHARIATI a J. JÖNSSON. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Analytica Chimica Acta*. 2007, **585**(2), 286-293. DOI: 10.1016/j.aca.2006.12.049.
- [17] PELIT, F. a Ç. YENGIN. Application of solidified floating organic drop microextraction method for biomonitoring of chlorpyrifos and its oxon metabolite in urine samples. *Journal of Chromatography B*. 2014, **949-950**, 109-114. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.01.004.
- [18] LEONG, M.-I., M.-R. FUH a S.-D. HUANG. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1335**, 2-14. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.021.

- [19] WANG, H., L. HU, W. LI X. Yang, R. Lu, S. Zhang, W. Zhou, H. Gao, J. Li. In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of ionic liquids for the determination of benzoylurea insecticides in water and tea beverage samples. *Talanta*. 2017, **162**, 625-633. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.10.035.
- [20] LIN, Z., J. LI, X. ZHANG, M QIU, Z HUANG a Y. RAO. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of seven recreational drugs in human whole blood using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2017, **1046**, 177-184. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.01.024.
- [21] ALBERO, B., C. SÁNCHEZ-BRUNETE, A. GARCÍA-VALCÁRCEL, R. PÉREZ a J. TADEO. Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **71**, 110-118. DOI: 10.1016/j.trac.2015.03.015.
- [22] RUTKOWSKA, M., K. OWCZAREK, M. GUARDIA, J. PIOTKA-WASYLKA a J. NAMIEŚNIK. Application of additional factors supporting the microextraction process. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017, **97**, 104-119. DOI: 10.1016/j.trac.2017.09.005.
- [23] WANG, H., L. HU, X. LIU, S. YIN, R. LU, S. ZHANG, W. ZHOU a H. GAO. *Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in water samples*. 2017, **1516**, 1-8. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.07.073.
- [24] YANG, S., X. FANG, L. DUAN, S. YANG, Z. LEI a X. WEN. Comparison of ultrasound-assisted cloud point extraction and ultrasound-assisted dispersive liquid liquid microextraction for copper coupled with spectrophotometric determination. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, **148**, 72-77. DOI: 10.1016/j.saa.2015.03.129.
- [25] HERRERA-HERRERA, A., J. HERNÁNDEZ-BORGES, T. BORGES-MIQUEL a M. RODRÍGUEZ-DELGADO. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, **75**, 130-137. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.11.026.
- [26] ALTUNAY, N., . YILDIRIM a R. GÜRKAN. Extraction and preconcentration of trace Al and Cr from vegetable samples by vortex-assisted ionic liquid-based dispersive

- liquid–liquid microextraction prior to atomic absorption spectrometric determination. *Food Chemistry*. 2018, **245**, 586-594. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.134.
- [27] SRICHAROEN, P., N. LIMCHOOWONG, S. TECHAWONGSTIEN a S. CHANTHAI. A novel extraction method for  $\beta$ -carotene and other carotenoids in fruit juices using air-assisted, low-density solvent-based liquid–liquid microextraction and solidified floating organic droplets. *Food Chemistry*. 2016, **203**, 386-393. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.093.
- [28] EZODDIN, M, K. ABDI a N. ESMAEILI. Ultrasound enhanced air-assisted surfactant liquid–liquid microextraction based on the solidification of an organic droplet for the determination of chromium in water, air and biological samples. *Microchemical Journal*. 2016, **129**, 200-204. DOI: 10.1016/j.microc.2016.07.005.
- [29] FARAJZADEH, M. a M. MOGADDAM. Air-assisted liquid–liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*. 2012, **728**, 31-38. DOI: 10.1016/j.aca.2012.03.031.
- [30] FERRONE, V., R. COTELLESE, M. CARLUCCI, L. DI MARCO a G. CARLUCCI. Air assisted dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of the floating organic droplets (AA-DLLME-SFO) and UHPLC-PDA method: Application to antibiotics analysis in human plasma of hospital acquired pneumonia patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, **151**, 266-273. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.039.
- [31] CHEN, H., R. CHEN a S. LI. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**, 1244-1248. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.062.
- [32] JIANG, W., X. CHEN, F. LIU, X. YOU a J. XUE. Effervescence-assisted dispersive liquid-liquid microextraction using a solid effervescent agent as a novel dispersion technique for the analysis of fungicides in apple juice. *Journal of Separation Science*. 2014, **37**(21), 3157-3163. DOI: 10.1002/jssc.201400695.
- [33] LIU, X., C. LIU, P. WANG, G. YAO, D. LIU a Z. ZHOU. Effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on cohesive floating organic drop for the



- determination of herbicides and fungicides in water and grape juice. *Food Chemistry*. 2018, **245**, 653-658. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.08.100.
- [34] MIRALLES, P., A. CHISVERT, M. ALONSO, S. HERNANDORENA a A. SALVADOR. Determination of free formaldehyde in cosmetics containing formaldehyde-releasing preservatives by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal of Chromatography A*. 2018, **1543**, 34-39. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.02.031.
- [35] HASHEMI, P., F. NAZARI SERENJEH a A. GHIASVAND. Reversed-Phase Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Multivariate Optimization for Sensitive HPLC Determination of Tyrosol and Hydroxytyrosol in Olive Oil. *Analytical sciences*. 2011, **27**(9), 943-947. DOI: 10.2116/analsci.27.943.
- [36] CHISVERT, A., J. BENEDÉ, M. PEIRÓ, I. PEDRÓN a A. SALVADOR. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography. *Talanta*. 2017, **166**, 81-86. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.01.037.
- [37] BAZREGAR, M., M. RAJABI, Y. YAMINI, Z. SAFFARZADEH a A. ASGHARI. Tandem dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient method for determination of basic drugs in complicated matrices. *Journal of Chromatography A*. 2016, **1429**, 13-21. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.087.
- [38] MARCH, J. G. a V. CERDÀ. A novel procedure for phase separation in dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of the aqueous phase. *Talanta*. 2016, **156-157**, 204-208. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.05.027.
- [39] LI, S., L. HU, K. CHEN a H. GAO. Extensible automated dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **872**, 46-54. DOI: 10.1016/j.aca.2015.02.061.
- [40] LIU, Y.-M., F.-P. ZHANG, B.-Y. JIAO, J.-Y. RAO a G. LENG. Automated dispersive liquid-liquid microextraction coupled to high performance liquid chromatography - cold vapour atomic fluorescence spectroscopy for the determination of mercury species in natural water samples. *Journal of Chromatography A*. 2017, **1493**, 1-9. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.03.002.
- [41] ALEXOVIČ, M., B. HORSTKOTTE, I. ŠRÁMKOVÁ, P. SOLICH a J. SABO. *Automation of dispersive liquid-liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes*. 2017, **86**, 39-55. DOI: 10.1016/j.trac.2016.10.003.

- [42] GUO, L. a H. LEE. Automated Dispersive Liquid–Liquid Microextraction–Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2014, **86**(8), 37433749. DOI: 10.1021/ac404088c.
- [43] ANTHEMIDIS, A. a K.-I. IOANNOU. On-line sequential injection dispersive liquid–liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples. *Talanta*. 2009, **79**(1), 86-91. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.03.005.
- [44] BERTON, P., E. MARTINIS a R. WUILLOUD. Development of an on-line temperature-assisted ionic liquid dispersive microextraction system for sensitive determination of vanadium in environmental and biological samples. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, **176**(1-3), 721-728. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.11.094.
- [45] MAYA, F., J. ESTELA a V. CERDÀ. Completely automated in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction using solvents lighter than water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, **402**(3), 1383–1388. DOI: 10.1007/s00216-011-5572-4.
- [46] HORSTKOTTE, B., R. SUÁREZ, P. SOLICH a V. CERDÀ. In-syringe-stirring: A novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2013, **788**, 52-60. DOI: 10.1016/j.aca.2013.05.049.
- [47] BAZREGAR, M., M. RAJABI, Y. YAMINI, S. ARGHAVANI-BEYDOKHTI a A. ASGHARI. Centrifugeless dispersive liquid-liquid microextraction based on salting-out phenomenon followed by high performance liquid chromatography for determination of Sudan dyes in different species. *Food Chemistry*. 2018, **244**, 1-6. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.006.
- [48] LIMA, D., C. SILVA a M. OTERO. Dispersive liquid-liquid microextraction for the quantification of venlafaxine in environmental waters. *Journal of Environmental Management*. 2018, **217**, 71-77. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.03.060.
- [49] LU, S., D. WU, G. LI, Z. Lv, P. Gong, L. Xia, Z. Sun, G. Chen, X. Chen, J. You, Y. Wu. Facile and sensitive determination of N-nitrosamines in food samples by high-performance liquid chromatography via combining fluorescent labeling with dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chemistry*. 2017, **234**, 408-415. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.05.032.
- [50] FRIZZARIN, R., F. MAYA, J. ESTELA a V. CERDÀ. Fully-automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of caffeine in coffee

- beverages. *Food Chemistry*. 2016, **212**, 759-767. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.032.
- [51] TIMOFEEVA, I., S. TIMOFEEV, L. MOSKVIN a A. BULATOV. A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat. *Analytica Chimica Acta*. 2017, **949**, 35-42. DOI: 10.1016/j.aca.2016.11.018.
- [52] PANG, L., H. YANG, P. YANG, H. ZHANG a J. ZHAO. Trace determination of organophosphate esters in white wine, red wine, and beer samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2017, **229**, 445-451. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.103.
- [53] RAHMANI, M., E. GHASEMI a M. SASANI. Application of response surface methodology for air assisted-dispersive liquid- liquid microextraction of deoxynivalenol in rice samples prior to HPLC-DAD analysis and comparison with solid phase extraction cleanup. *Talanta*. 2017, **165**, 27-32. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.12.031.
- [54] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, . *Food Chemicals Codex (10th Edition)*. The United States Pharmacopeial Convention, Maryland 2016. ISBN 978-1-936424-51-1.
- [55] KANDIYOTI, R., Alan HEROD, K. BARTLE a T. MORGAN. *Solid Fuels and Heavy Hydrocarbon Liquids - Thermal Characterization and Analysis (2nd Edition)*. Elsevier, Amsterdam, 2017. ISBN 978-0-08-100784-6.
- [56] FANALI, S., P. HADDAD, C. POOLE a M.-L. RIEKKOLA. *Liquid Chromatography - Fundamentals and Instrumentation, Volume 1 (2nd Edition)*. Elsevier, Amsterdam, 2017. ISBN 978-0-12-805393-5.
- [57] KUTZ, M.. *Handbook of Measurement in Science and Engineering, Volume 3*. John Wiley & Sons, Hoboken, 2016. ISBN 978-1-118-64724-0.
- [58] HOLLENHORST, Jim. Agilent 101: An Introduction to Bio-Analytical Measurement. In: *Agilent* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z [https://www.agilent.com/labs/features/2011\\_101\\_bio.html](https://www.agilent.com/labs/features/2011_101_bio.html)
- [59] CROMPTON, T. *Chromatography Mass Spectroscopy in Polymer Analysis*. Smithers Rapra Technology, Shawbury 2010. ISBN 978-1-84735-482-2.
- [60] TEUTENBERG, T.. *High-Temperature Liquid Chromatography - A User's Guide for Method Development*. Royal Society of Chemistry Cambridge, 2010. ISBN 978-1-84973-013-6.

- [61] TEUTENBERG, Thorsten. *High-Temperature Liquid Chromatography - A User's Guide for Method Development*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010. ISBN 978-1-84973-013-6.
- [62] CROMPTON, T. The Determination of Monomers. In: CROMPTON, T. *Chromatography Mass Spectroscopy in Polymer Analysis*. Smithers Rapra Technology, Shawbury 2010. ISBN 978-1-84735-482-2.
- [63] LINGEMAN, H.. How to select a technique. In: *Chromedia Analytical Science* [online]. Netherlands: Free University, [cit. 2018-05-01]. Dostupné z <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=yooovpDsHiemBpdmBIIecCI&subNav=yarwnEsHiemBpdmBIIecCIbB>
- [64] Ministerstvo zemědělství, Vyhláška č. 335/1997 Sb. ze dne 12. prosince 1997, kterou se provádí §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí. Praha: Sbírka zákonů České republiky, 1997, částka 111.
- [65] *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Hoboken 2015. ISBN 10.1002/0471238961.0205051814091919.a01.pub3.
- [66] PREEDY, V.. *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press, London, 2008. ISBN 978-0-12-373891-2.
- [67] BAMFORTH, C., I. RUSSELL a G. STEWART. *Beer: A Quality Perspective*. 1st Edition. Academic Press, London, 2008. ISBN 9780126692013.
- [68] PROVOST, J., K. COLABROY, B. KELLY a M. WALLERT. *The Science of Cooking: Understanding the Biology and Chemistry Behind Food and Cooking*. John Wiley & Sons, Hoboken, 2016. ISBN 9781118674208.
- [69] POHLOVÁ, Markéta. *Hořké kyseliny chmele a možnosti jejich stanovení v pivovarské praxi*. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 2013.
- [70] BAILEY B., C. SCHÖNBERGER, G. DREXLER, A. GAHR, R. NEWMAN, M. PÖSCHL, a E. GEIGER. *The Influence of Hop Harvest Date on Hop Aroma in Dry-Hopped Beers*. Master Brewers Association of the Americas, 2009, **46**(2) DOI: 10.1094/TQ-46-2-0409-01.

- [71] SCHÖNBERGER, C. a T. KOSTELECKY. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the institute of brewing*. 2011, **117**(3), 259–267. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x.
- [72] LODOLO, E., J. KOCK, B. AXCELL a M. BROOKS. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* the main character in beer brewing. *Federation of European Microbiological Societies. Yeast Research*. 2008, **8**(7), 1018–1036. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x.
- [73] OLADOKUN, O., S. JAMES, T. COWLEY, F. DEHRMANN, K. SMART, J. HORT a D. COOK. Perceived bitterness character of beer in relation to hop variety and the impact of hop aroma. *Food Chemistry*. 2017, **230**(1), 215-224. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.031.
- [74] DOSTÁLEK, P., M. KARABÍN a L. JELÍNEK. Hop Phytochemicals and Their Potential Role in Metabolic Syndrome Prevention and Therapy. *Molecules*. 2017, **22**(10), 1761-1771. DOI: 10.3390/molecules22101761.
- [75] CABALLERO, I., C. BLANCO a M. PORRAS. Iso- $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science & Technology*. 2012, **26**(1), 21-30. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.01.001.
- [76] DE KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova.*, 2000, **23**(1), 108-112. DOI: 10.1590/S0100-40422000000100019
- [77] Schéma procesu výroby piva. *České pivo: České zlato* [online]. 2017 [cit. 2018-05-04]. Dostupné z: <http://ceskepivo-ceskezlato.cz/piva.php?pid=Prazdroj&on=opivu&pg=opivu18>
- [78] BRIGGS, D., C. BOULTON, P. BROOKES a R. STEVENS. *Brewing Science and Practice*. Woodhead Publishing, Cambridge, 2004. ISBN 978-1-85573-490-6.
- [79] SCHNAITTER, Martin, Adrian KELL, Hubert KOLLMANNNSBERGER, Florian SCHÜLL, Martina GASTL a Thomas BECKER. Scale-up of Dry Hopping Trials: Importance of Scale for Aroma and Taste Perceptions. *Chemie Ingenieur Technik*. 2016, **88**(12), 1955-1965. DOI: 10.1002/cite.201600040.
- [80] BUZRUL, Sencer. A suitable model of microbial survival curves for beer pasteurization. *LWT - Food Science and Technology*. 2007, **40**(8), 1330-1336. DOI: 10.1016/j.lwt.2006.10.005.
- [81] HOUGH, J., D. BRIGGS, R. STEVENS a T. YOUNG. *Malting and Brewing Science: Volume II Hopped Wort and Beer*. 2. Springer, Birmingham, 2012. ISBN 1461517990.

- [82] Extraktor chmele – zařízení pro chmelení piva za studena. In: *Czech Brewery system* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.ceskeminipivovary.cz/nabidka/vyroba/komponenty-pivovaru/studeny-blok/studene-suche-chmeleni-piva/>
- [83] Meet Randall: DRINK FEATURES, GRUB & GUZZLE. In: *Encore: You're alternative weekly voice* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.encorepub.com/meet-randall/>
- [84] Dry hopping a pint w/ centennial hops. Grabbed this at my local craft brew pub. A hopsicle from Wachusett. In: *Reddit* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: [https://www.reddit.com/r/Homebrewing/comments/2whooh/dry\\_hopping\\_a\\_pint\\_w\\_centennial\\_hops\\_grabbed\\_this/](https://www.reddit.com/r/Homebrewing/comments/2whooh/dry_hopping_a_pint_w_centennial_hops_grabbed_this/)
- [85] RUIZ, P., L. CELADA, S. SESEÑA a M. PALOP. Leuconostoc mesenteroides in the brewing process: A controversial role. *Food Control*. 2018, **90**, 415-421. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.03.019.
- [86] PASCARI, X., A. RAMOS, S. MARÍN a V. SANCHÍS. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Research International*. 2018, **103**, 121-129. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.038.
- [87] HWAN KIM, T. Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. *Food Chemistry*. 2003, **83**(1), 151-158. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00221-8.
- [88] BARRY, S., E. MUGGAH, M. MCSWEENEY a S. WALKER. A preliminary investigation into differences in hops' aroma attributes. *International Journal of Food Science and Technology*. 2018, **53**, 804–811.
- [89] PAZ, A., C. BLANCO, C. ANDRÉS-IGLESIAS, L. PALACIO, P. PRÁDANOS a A. HERNÁNDEZ. Aroma recovery of beer flavors by pervaporation through polydimethylsiloxane membranes. *Journal of Food Process Engineering*. 2017, **40**(6). DOI: 10.1111/jfpe.12556.
- [90] RICHTER, T., G. EYRES, P. SILCOCK a P. BREMER. Comparison of four extraction methods for analysis of volatile hop-derived aroma compounds in beer. *Journal of Separation Science*. 2017, **40**(22), 4366-4376. DOI: 10.1002/jssc.201700676.
- [91] STEFANUTO, P.-H., K. A. PERRAULT, L. M. DUBOIS, B. L'HOMME, C. ALLEN, C. LOUGHNANE, N. OCHIAI a J.-F. FOCANT. Advanced method optimization for volatile aroma profiling of beer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2017, **1507**(21), 45-52. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.05.064.

- [92] DONG, L., Y. HOU, F. LI, Y. PIAO, X. ZHANG, X. ZHANG, C. LI a C. ZHAO. Characterization of volatile aroma compounds in different brewing barley cultivars. *Journal of the science of food and agriculture*. 2015, **95**(5), 915-921. DOI: 10.1002/jsfa.6759.
- [93] HIRALAL, L., A. O. OLANIRAN a B. PILLAY. Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, **117**(1), 57-64. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.002.
- [94] SCHMIDT, C. a M. BIENDL. LC-MS/MS Analysis of Hop Flavonoids in Dry-Hopped Beers. *Brewing Science*. 2017, **70**, 197-202. DOI: 10.23763/BrSc17-20schmidt.

## Přílohy

Příloha I: Vzorové chromatogramy z měření

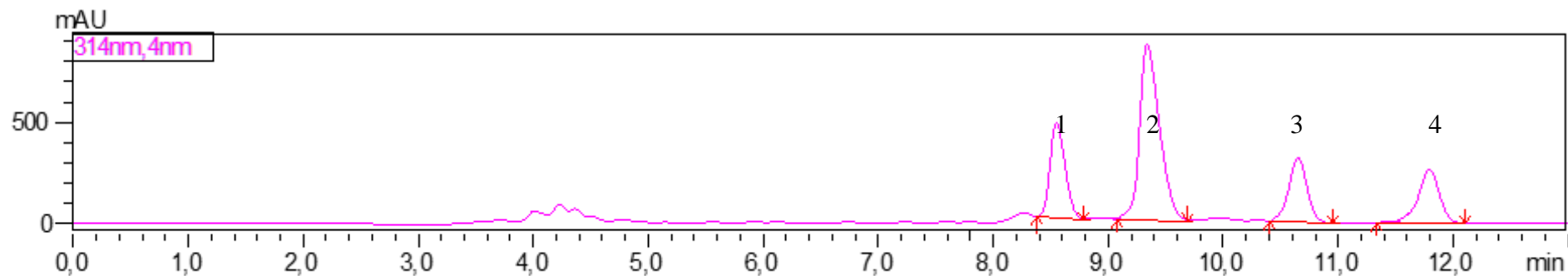
Příloha II: Kalibrační křivky extraktů UA-LLME-SFO v celém koncentračním rozsahu

Příloha III: Odezvové profily a 3D vhodnostní profily ze statistického vyhodnocení při optimalizaci extrakčních metod

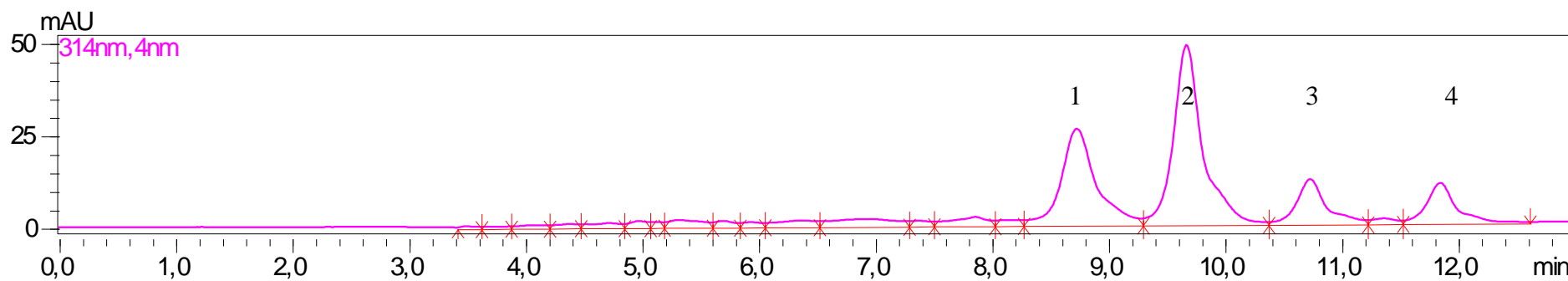
Příloha IV: Podmínky jednotlivých pokusů vygenerovaných pro optimalizaci extrakcí



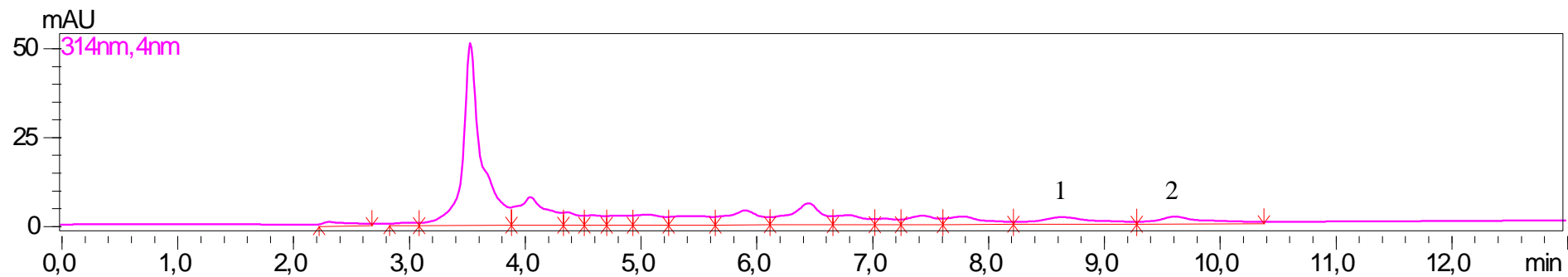
Příloha I: Vzorové chromatogramy z měření



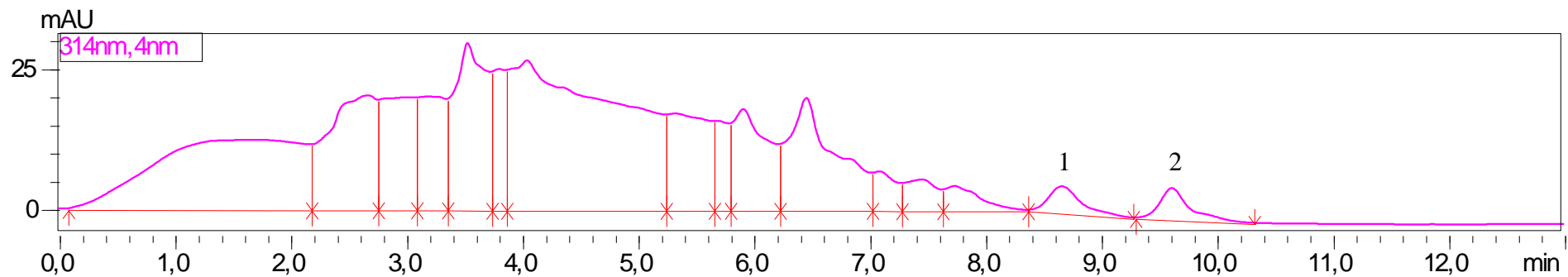
Obrázek I-1: Vzorový chromatogram z měření kalibrace  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon, 3 – kolupulon, 4 – adlupulon + lupulon)



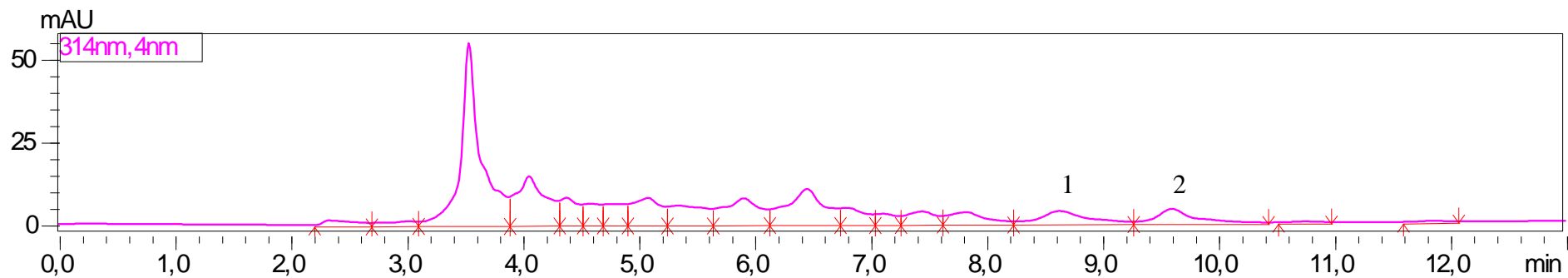
Obrázek I-2: Vzorový chromatogram z měření kalibrace extrakce  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon, 3 – kolupulon, 4 – adlupulon + lupulon)



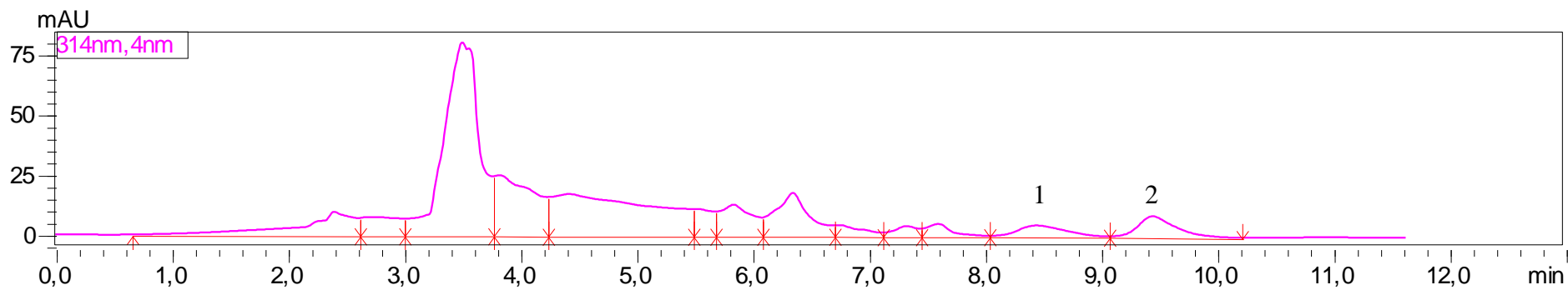
Obrázek I-356: Chromatogram z měření piva Bakalář ležák  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



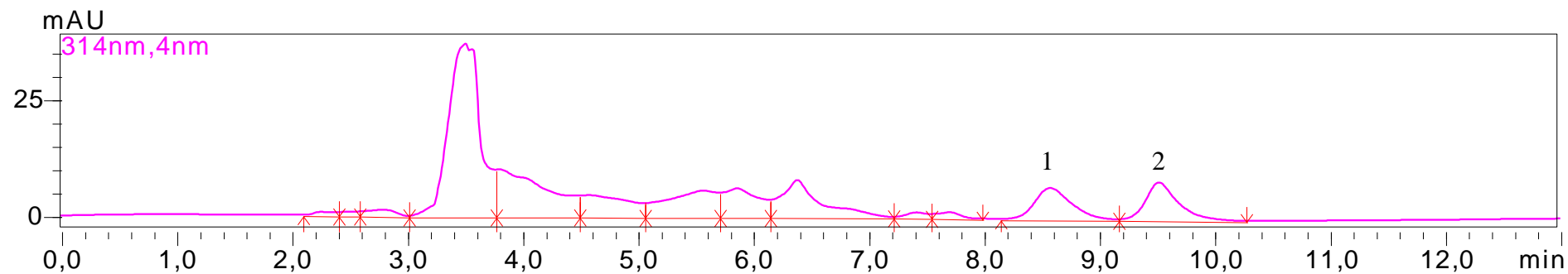
Obrázek I-4: Chromatogram z měření piva Bakalář nealko za studena chmelený  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



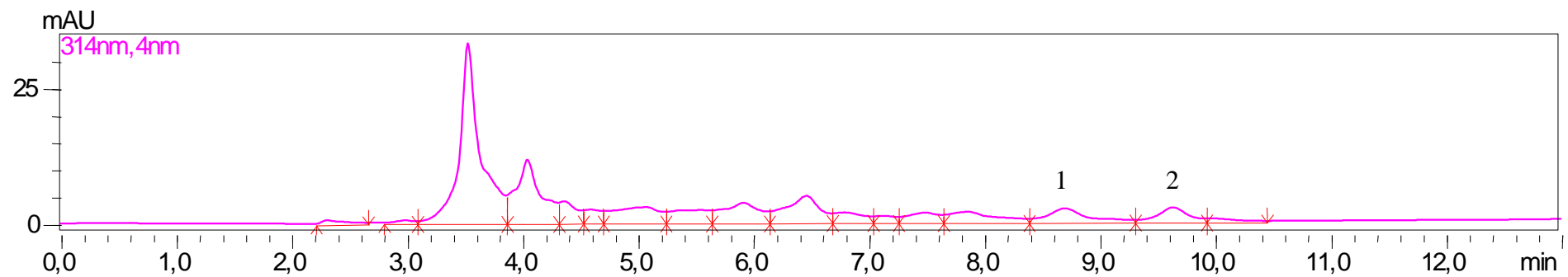
Obrázek I-5: Chromatogram z měření extrakce piva Bakalář za studena chmelený  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



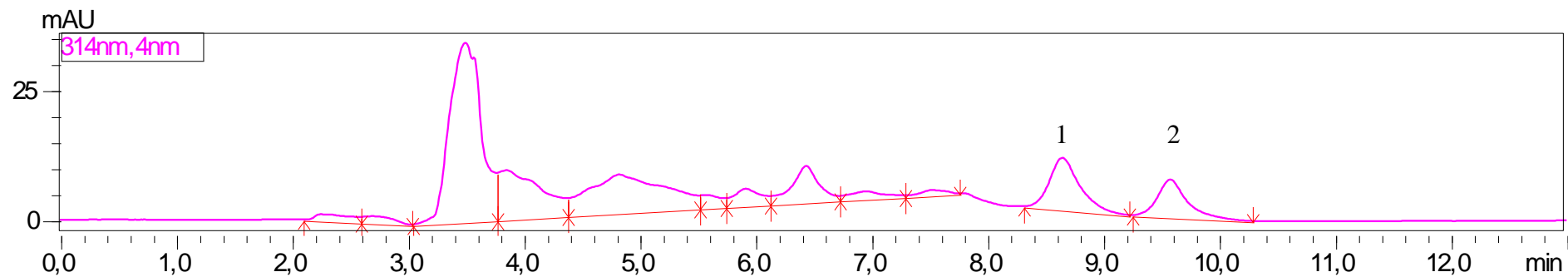
Obrázek I-657: Chromatogram z měření extrakce piva Krušovice 12° ze žateckého chmele  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



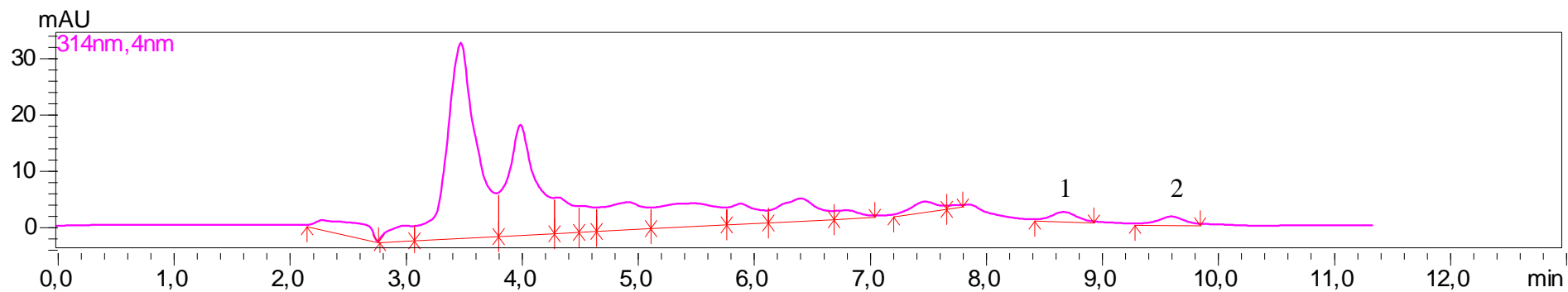
Obrázek I-7: Chromatogram měření piva Krušovice za studena chmelené  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



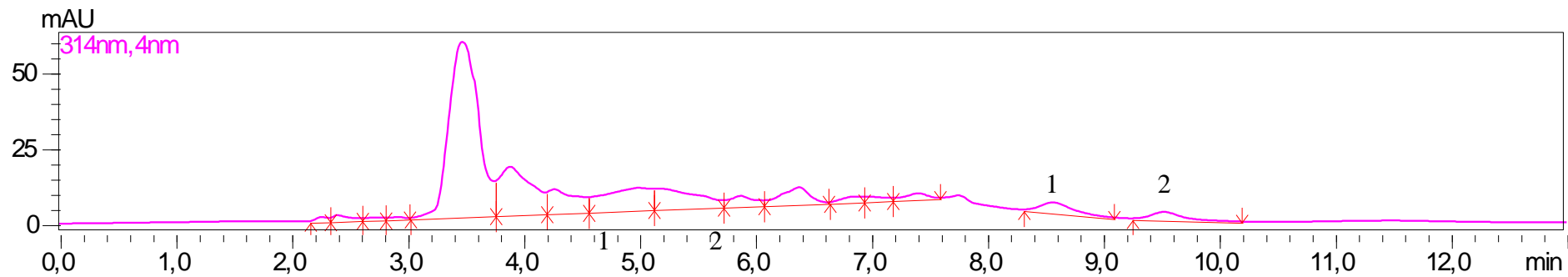
Obrázek I-8: Chromatogram měření piva Lobkowicz premium  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



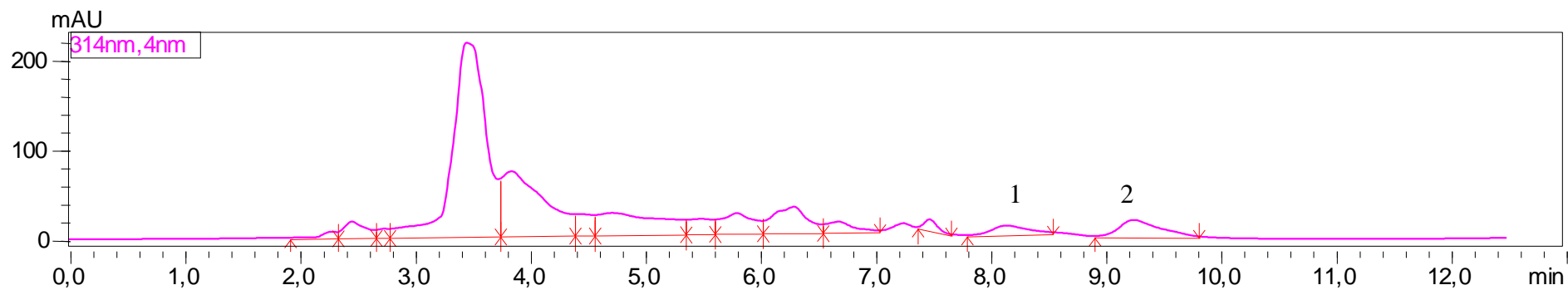
Obrázek I-9: Chromatogram měření piva Lobkowicz ALE  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



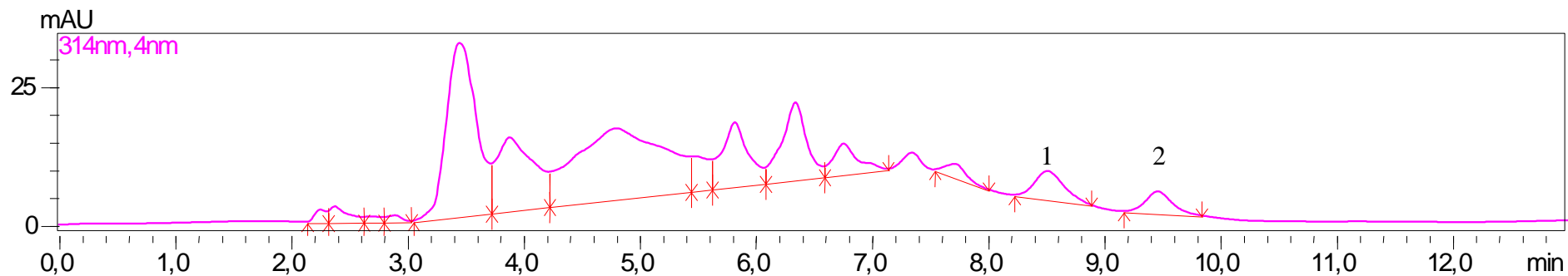
Obrázek I-10: Chromatogram měření piva Francinův ležák  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



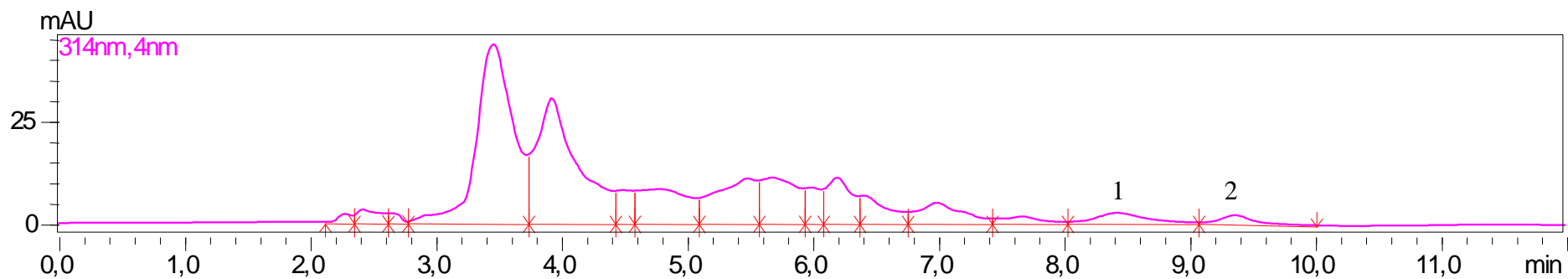
Obrázek I-11: Chromatogram měření piva Jubilejní Hrabalův ležák  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



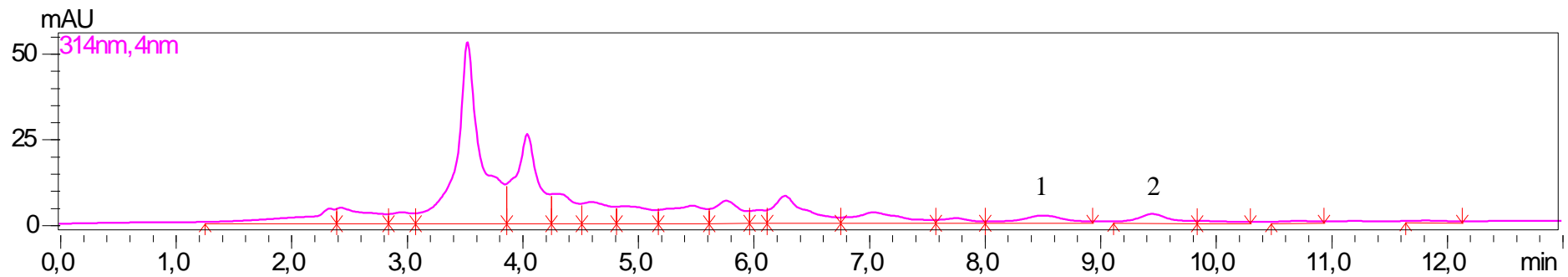
Obrázek I-1258: Chromatogram měření piva Primátor premium  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



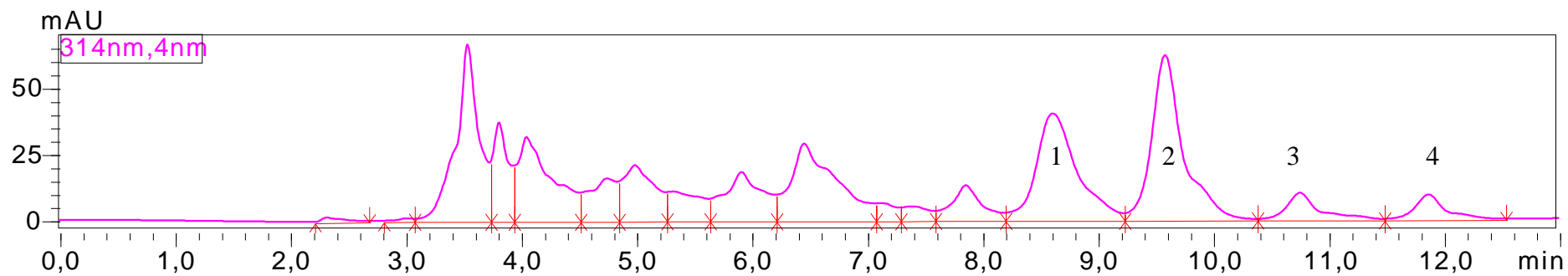
Obrázek I-13: Chromatogram měření piva Primátor IPA  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



Obrázek I-14: Chromatogram měření piva Svijanský máz  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



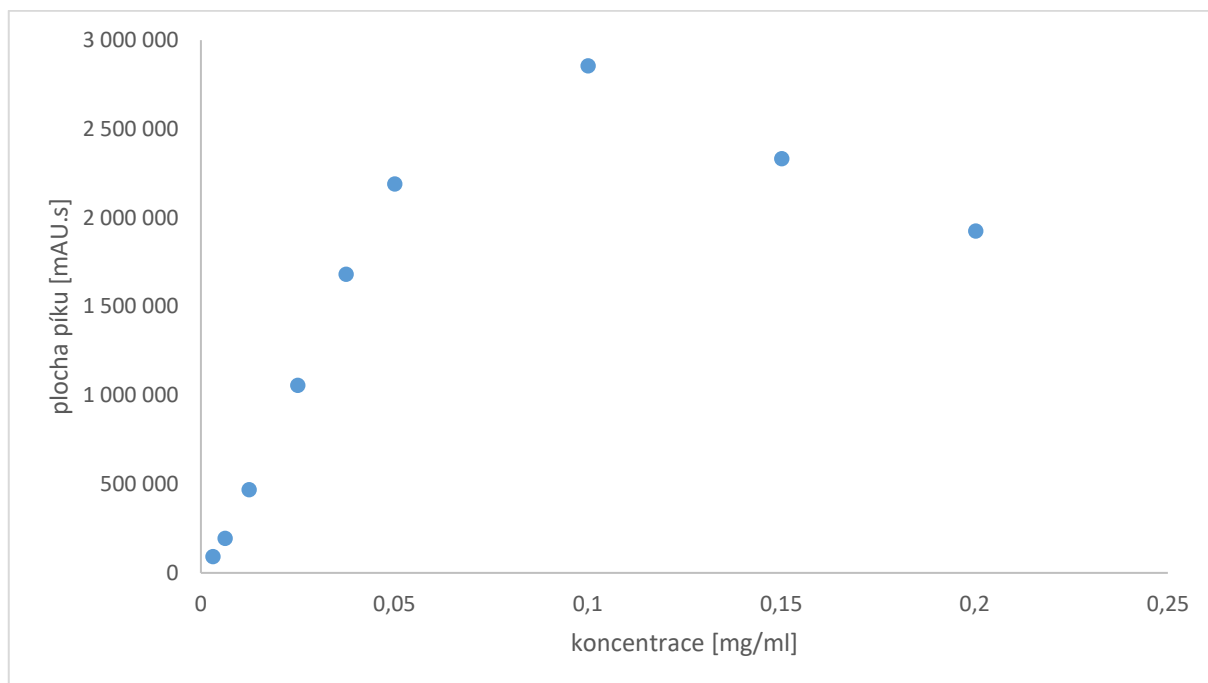
Obrázek I-1559: Chromatogram měření piva Svijanský rytíř  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon)



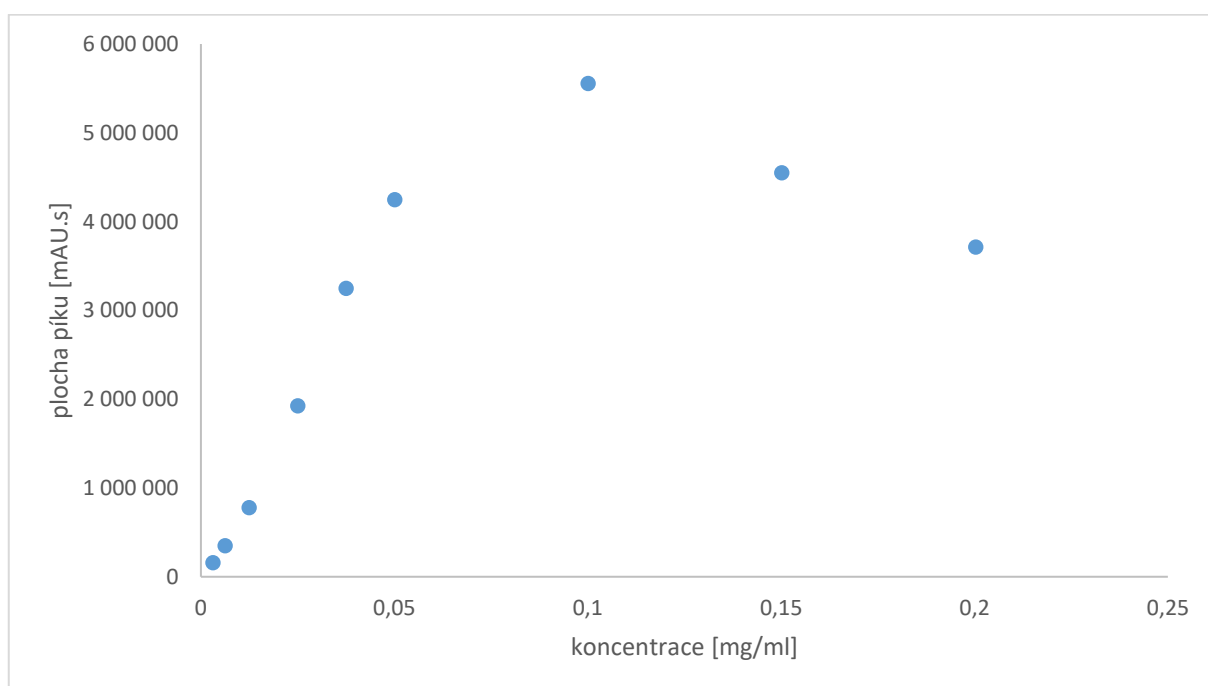
Obrázek I-16: Chromatogram měření piva Raven IPA  
(1-kohumulon, 2 – adhumulon + humulon, 3 – kolupulon, 4 – adlupulon + lupulon)



Příloha II: Kalibrační křivky extraktů UA-LLME-SFO v celém koncentračním rozsahu

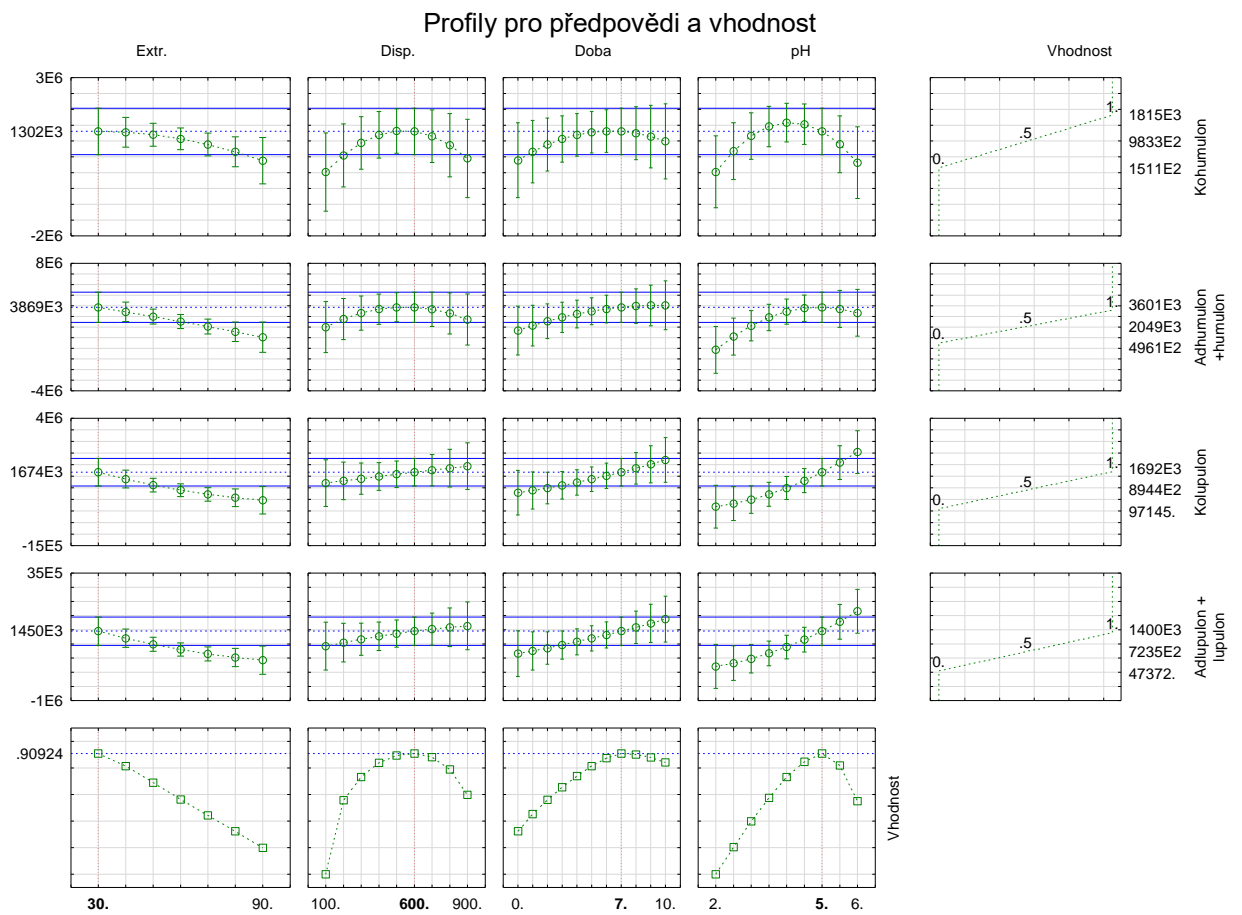


Obrázek II-1: Odezvy kalibračních roztoků extrakce v celém koncentračním rozsahu pro kohumulon



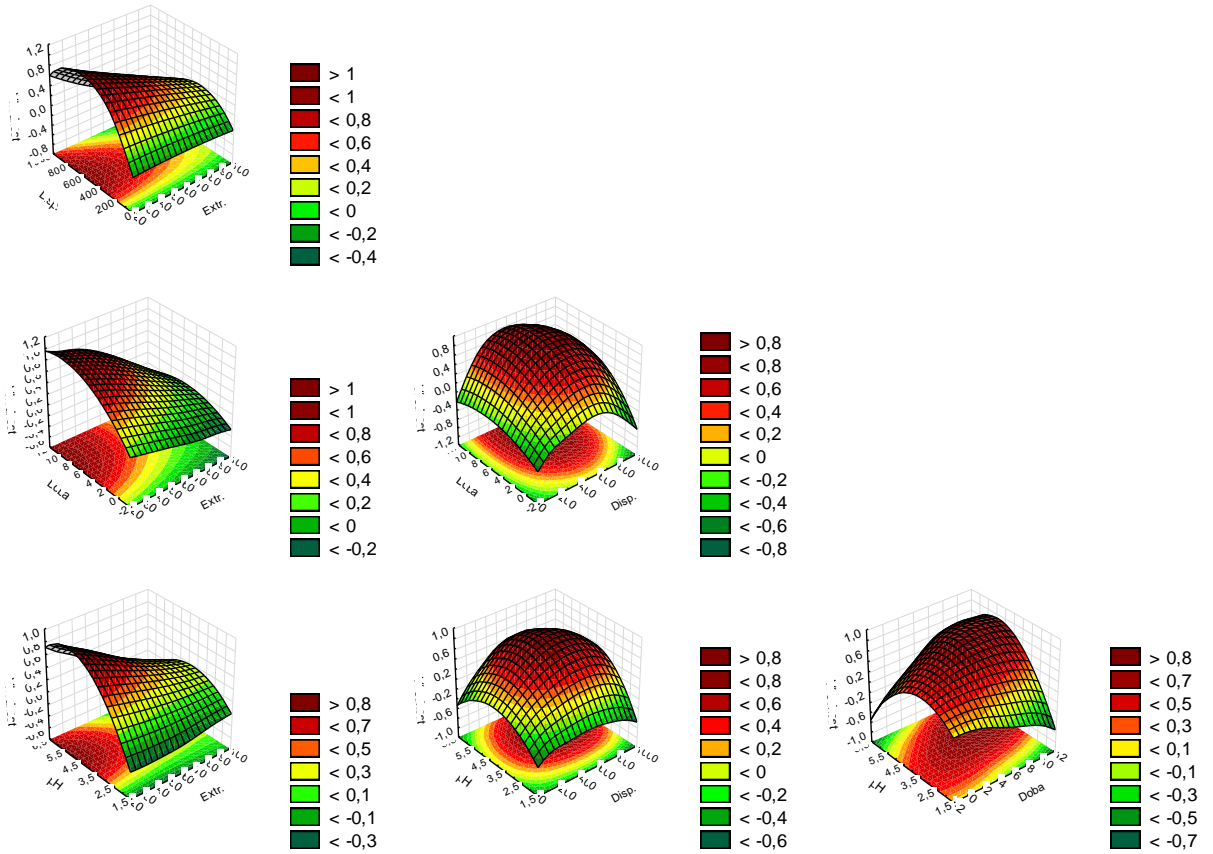
Obrázek II-2: Odezvy kalibračních roztoků extrakce v celém koncentračním rozsahu pro adhumulon + humulon

Příloha III: Odezvové profily a 3D vhodnostní profily ze statistického vyhodnocení při optimalizaci extrakčních metod



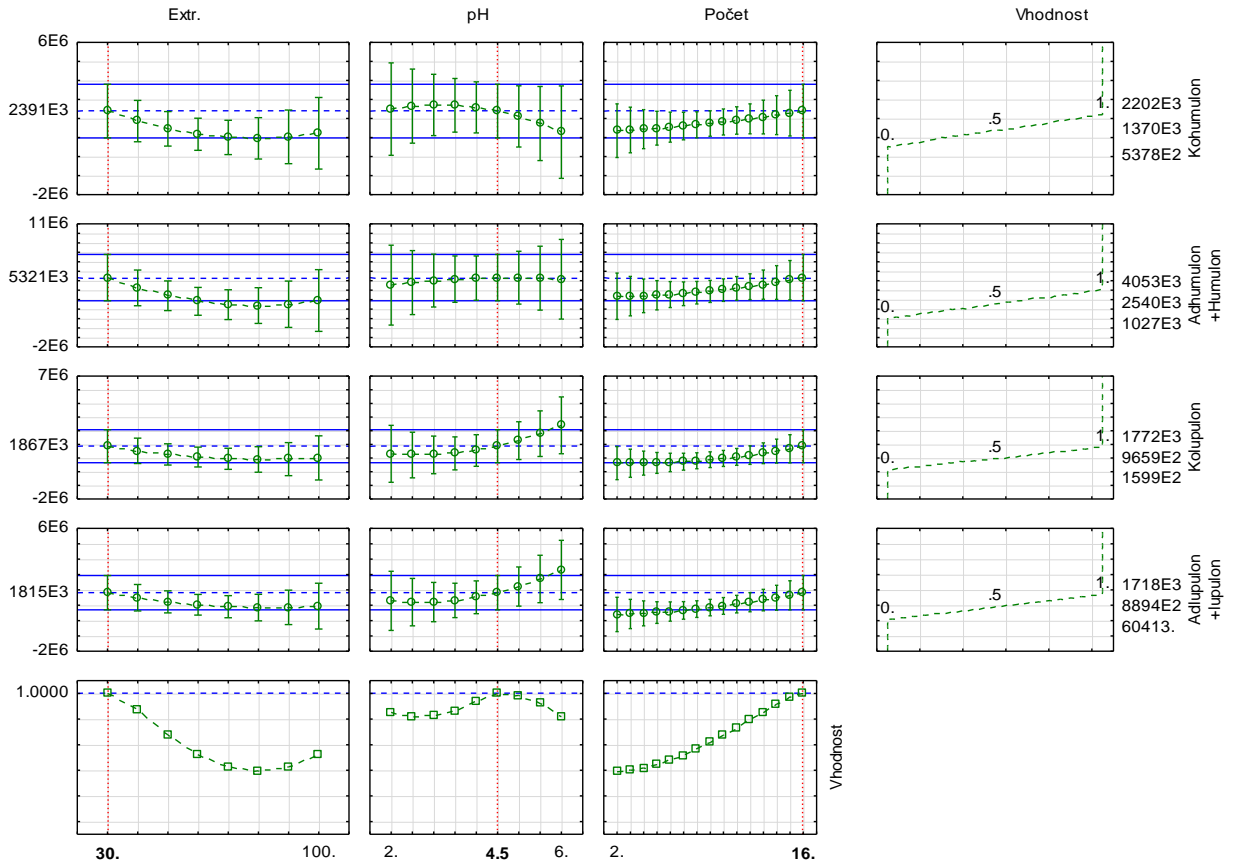
Obrázek III-1: Odezvový profil pro metodu extrakce DLLME-SFO (disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou; Extr. = objem extrakčního rozpouštědla, Disp. = objem disperzního rozpouštědla)

Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda:Spline



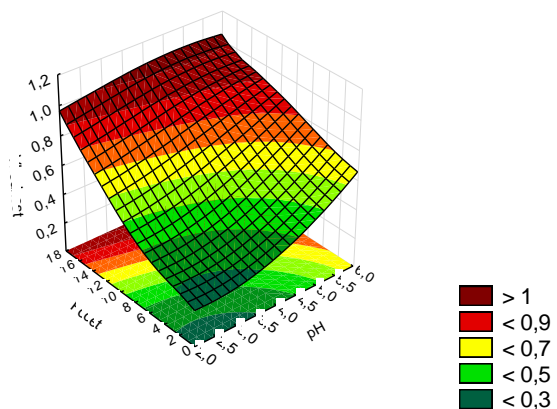
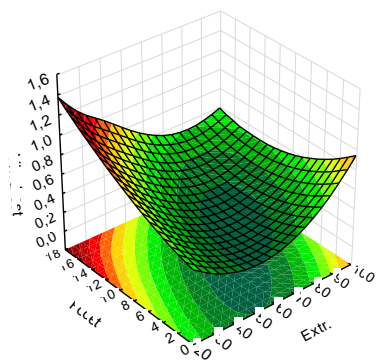
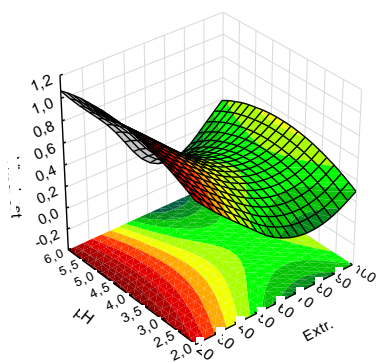
Obrázek III-260: 3D vhodnostní profil pro metodu extrakce DLLME-SFO (disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou; Extr. = objem extrakčního rozpouštědla, Disp. = objem disperzního rozpouštědla)

### Profily pro předpovědi a vhodnost



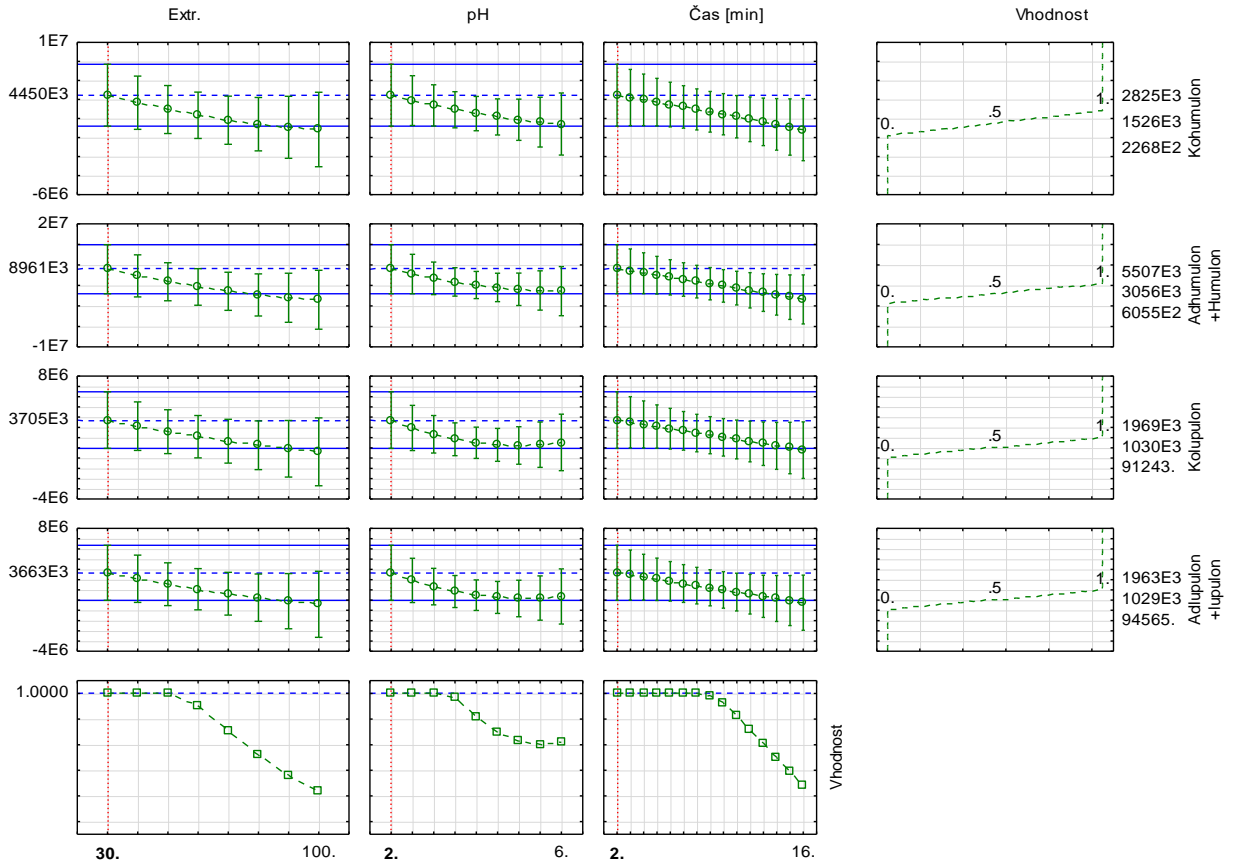
Obrázek III-361: Odezvový profil pro metodu extrakce AA-LLME-SFO (vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou bez využití disperzního rozpuštědla; Extr. = objem extrakčního rozpouštědla, Disp. = objem disperzního rozpouštědla)

Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda:Spline



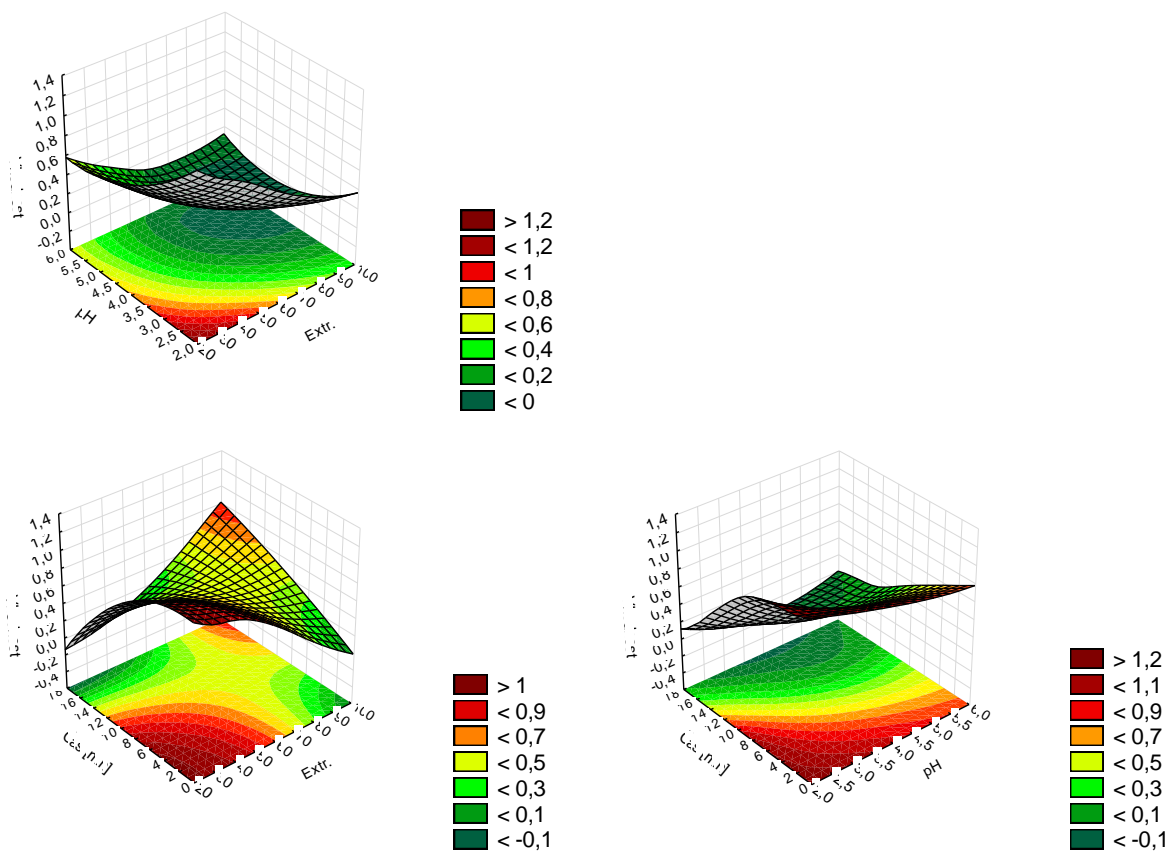
Obrázek III-4: 3D vhodnostní profil pro metodu extrakce AA-LLME-SFO (vzduchem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhající organickou kapkou bez disperzního rozpouštědla; Extr. = objem extrakčního rozpouštědla, Disp. = objem disperzního rozpouštědla)

### Profily pro předpovědi a vhodnost



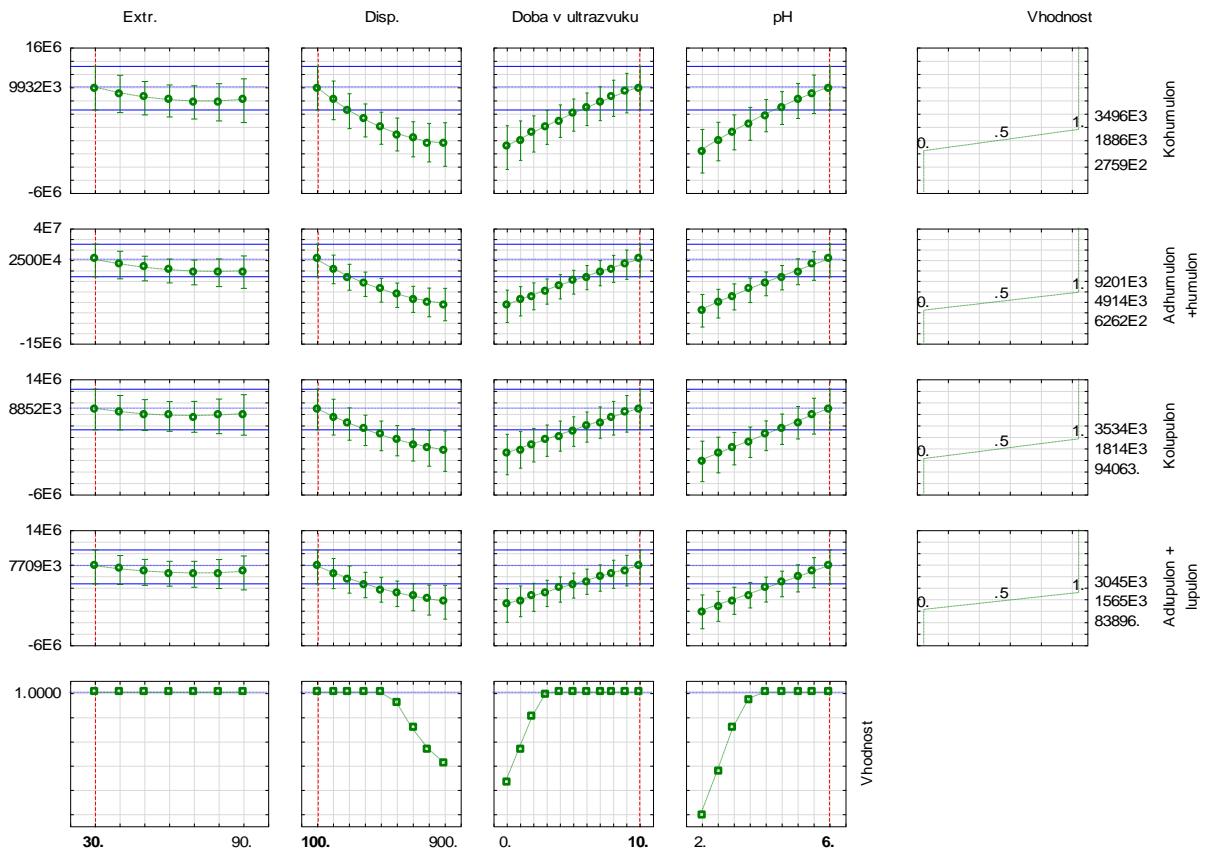
Obrázek III-5: Odezvový profil pro metodu extrakce UA-LLME-SFO (ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou bez využití disperzního rozpouštědla; Extr. = objem extrakčního rozpouštědla, Disp. = objem disperzního rozpouštědla)

Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda:Spline



Obrázek III-6: 3D vhodnostní profil pro metodu extrakce UA-LLME-SFO  
(ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou bez disperzního rozpouštědla;  
Extr. = objem extrakčního rozpouštědla, Disp. = objem disperzního rozpouštědla)

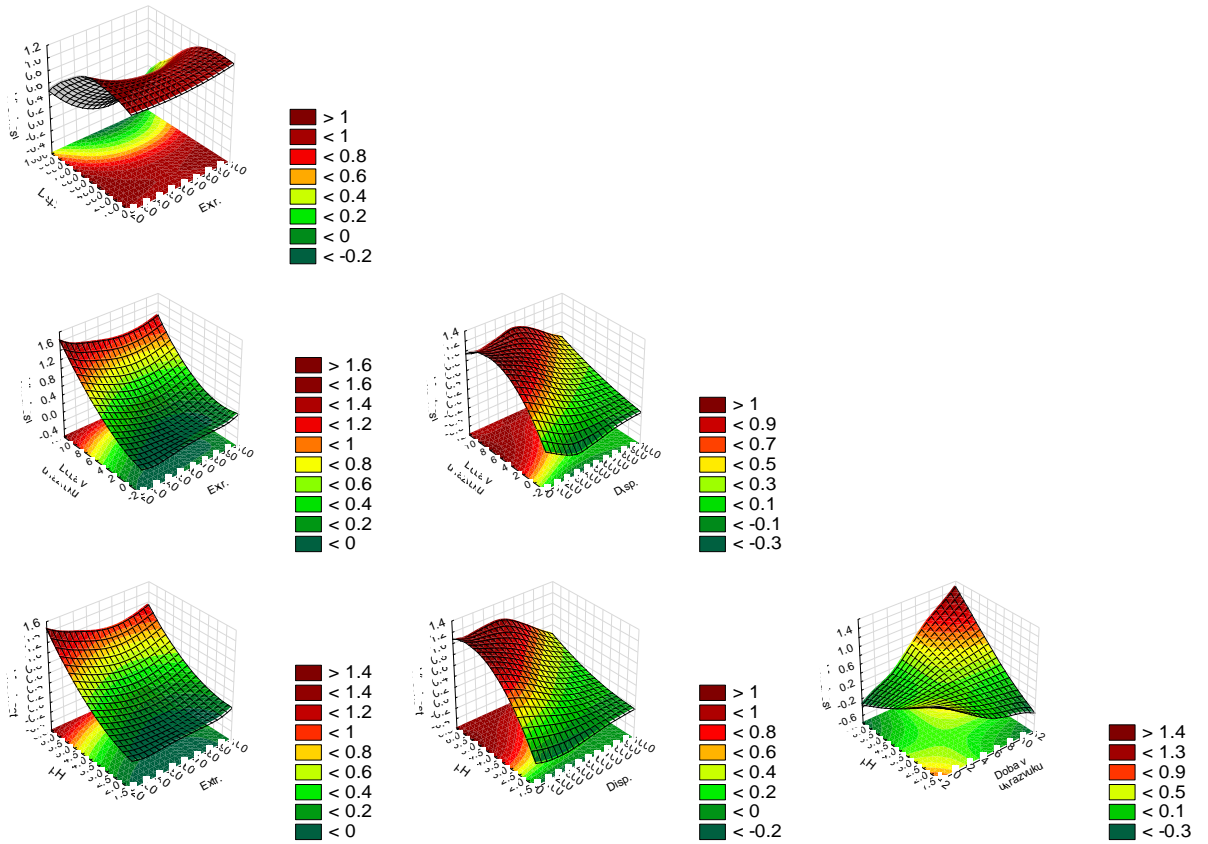
### Profily pro předpovědi a vhodnost



Obrázek III-7: Odezvový profil pro metodu extrakce UA-DLLME-SFO (ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou; Extr. = objem extrakčního rozpouštědla, Disp. = objem disperzního rozpouštědla)



Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda:Spline



Obrázek III-8: 3D vhodnostní profil pro metodu extrakce UA-DLLME-SFO (ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou; Extr. = objem extrakčního rozpouštědla, Disp. = objem disperzního rozpouštědla)

## Příloha IV: Podmínky jednotlivých pokusů vygenerovaných pro optimalizaci extrakcí

Tabulka IV-117: Podmínky pokusů pro optimalizaci extrakce DLLME-SFO a UA-DLLME-SFO

(C = centrální bod; Ext. = objem extrakčního rozpouštědla [ $\mu$ l], Disp. = objem disperzního rozpouštědla [ $\mu$ l]  
čas = doba v ultrazvuku pro UA-LLME-SFO a doba mezi nástřikem a centrifugací v DLLME-SFO)

pokus	Blok	Extr.	Disp.	Doba	pH
1	1	45.0	300.0	2,5	5.0
2	1	45.0	300.0	7,5	3.0
3	1	45.0	700.0	2,5	3.0
4	1	45.0	700.0	7,5	5.0
5	1	75.0	300.0	2,5	3.0
6	1	75.0	300.0	7,5	5.0
7	1	75.0	700.0	2,5	5.0
8	1	75.0	700.0	7,5	3.0
9 (C)	1	60.0	500.0	5,0	4.0
10	2	45.0	300.0	2,5	3.0
11	2	45.0	300.0	7,5	5.0
12	2	45.0	700.0	2,5	5.0
13	2	45.0	700.0	7,5	3.0
14	2	75.0	300.0	2,5	5.0
15	2	75.0	300.0	7,5	3.0
16	2	75.0	700.0	2,5	3.0
17	2	75.0	700.0	7,5	5.0
18 (C)	2	60.0	500.0	5,0	4.0
19	3	30.0	500.0	5,0	4.0
20	3	90.0	500.0	5,0	4.0
21	3	60.0	100.0	5,0	4.0
22	3	60.0	900.0	5,0	4.0
23	3	60.0	500.0	0,0	4.0
24	3	60.0	500.0	10,0	4.0
25	3	60.0	500.0	5,0	2.0
26	3	60.0	500.0	5,0	6.0
27 (C)	3	60.0	500.0	5,0	4.0

Tabulka IV-2: Podmínky pokusů pro optimalizaci extrakce AA-LLME-SFO a UA-LLME-SFO

(C = centrální bod; Ext. = objem extrakčního rozpouštědla [ $\mu$ l], počet = počet kroků pro AA-LLME-SFO, čas = doba v ultrazvuku pro UA-LLME-SFO)

pokus	Blok	Extr,	pH	Počet (čas)
1	1	40	3,0	5
2	1	40	5,0	13
3	1	80	3,0	13
4	1	80	5,0	5
5 (C)	1	60	4,0	9
6	2	40	3,0	13
7	2	40	5,0	5
8	2	80	3,0	5
9	2	80	5,0	13
10 (C)	2	60	4,0	9
11	3	27	4,0	9
12	3	93	4,0	9
13	3	60	2,3	9
14	3	60	5,7	9
15	3	60	4,0	2
16	3	60	4,0	16
17 (C)	3	60	4,0	9