

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Adriana Burešová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza linaloolu v pivu s využitím headspace mikroextrakčních postupů

Bc. Adriana Burešová

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adriana Burešová**
Osobní číslo: **C17480**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Analýza linaloolu v pivu s využitím headspace mikroextrakčních postupů**
Zadávající 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 se zaměřením na možnosti využití mikroextrakčních postupů pro stanovení těkavých složek potravin. Zaměřte se na metody mikroextrakce tuhou fází (SPME) a mikroextrakce jednou kapkou (SDME), a to především v headspace uspořádání. Provéřte možnosti kvantifikace složek potravin při použití uvedených mikroextrakčních technik. Zvláštní pozornost věnujte možnostem stanovení těkavých složek kapalných potravin, kam patří i piva vyrobená jak klasických chmelením, tak i tzv. chmelením za studena.
2. V experimentální části proveďte možnosti stanovení linaloolu v pivech s využitím headspace vzorkování. Pro tento účel vyzkoušejte metody SDME a SPME s následnou analýzou extraktů pomocí plynové chromatografie. Jednotlivé metody optimalizujte a aplikujte na reálné vzorky piv včetně piv vyrobených postupem studeného chmelení. Provéřte, zda je možné pomocí analýzy linaloolu ověřit, zda při výrobě piva byl použit postup tzv. studeného chmelení. Obě optimalizované metody porovnejte a pokuste se zhodnotit jejich použitelnost pro daný účel.

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

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2019

.....
Bc. Adriana Burešová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce panu doc. Ing. Martinovi Adamovi, Ph.D. za odborné rady a konzultace. Také děkuji své rodině a přátelům za podporu a motivaci po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá stanovením linaloolu v pivu. Využívá se zde mikroextrakčních technik v headspace uspořádání s následnou analýzou na plynovém chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem. Teoretická část je zaměřená na výrobu piva a mikroextrakční techniky, zejména SDME a SPME. V praktické části byly tyto dvě metody optimalizovány a následně aplikovány na reálné vzorky pív. Na závěr byl porovnán obsah linaloolu v klasicky chmelených a za studena chmelených pivech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pivo, linalool, plynová chromatografie, mikroextrakce, SPME, SDME, studené chmelení

TITLE

Analysis of linalool in beer using headspace microextraction approaches

ANNOTATION

This thesis deals with the determination of linalool in beer. Headspace microextraction methods were used in combination with gas chromatography and flame ionization detector. The theoretical part is focused on beer production and microextraction techniques, especially SDME and SPME. In the experimental part these two methods were optimised and then applied to the analysis of real beer samples. Finally, contents of linalool were compared for classically hopped and dry-hopped beers.

KEYWORDS

Beer; Linalool; Gas Chromatography; Microextraction; SPME; SDME; Dry hopping

Obsah

Úvod.....	13
1 Teoretická část	14
1.1 Vstupní suroviny pro výrobu piva.....	15
1.1.1 Voda	15
1.1.2 Pivovarské kvasinky.....	16
1.1.3 Slad.....	16
1.1.3.1 Sladařství.....	18
1.1.4 Chmel	20
1.1.4.1 Pivovarnictví	22
1.1.4.2 Chmelení piva	25
1.1.4.3 Těkavé látky piva	26
1.2 Mikroextrakční techniky	28
1.2.1 Mikroextrakce tuhou fází	28
1.2.2 Zařízení pro mikroextrakci tuhou fází.....	28
1.2.2.1 Stacionární fáze pro mikroextrakci tuhou fází.....	30
1.2.3 Mikroextrakce jednou kapkou.....	31
1.2.4 Možnosti kvantifikace	32
1.2.5 Příklady stanovení těkavých složek kapalných potravin.....	33
1.2.5.1 Identifikace těkavých látek v sójových produktech.....	33
1.2.5.2 Stanovení těkavých látek produkovaných bakteriemi rodu <i>Salmonella</i> ve vzorcích kravského mléka	34
1.2.5.3 Stanovení profilu těkavých látek bílých likérových vín	34
1.2.5.4 Stanovení reziduí pesticidů v kokosové vodě.....	35
1.3 Plynová chromatografie	36
1.3.1 Typy kolon v plynové chromatografii.....	37
1.3.2 Plamenový ionizační detektor	38

2	Experimentální část	39
2.1	Použité vzorky piva	39
2.2	Použité chemikálie	40
2.3	Použitá instrumentace a software	41
2.4	Podmínky separace na plynovém chromatografu	41
2.5	Zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti nástřiku.....	42
2.6	Optimalizace metody headspace mikroextrakce jednou kapkou	42
2.7	Kalibrace pro metodu headspace mikroextrakce jednou kapkou	43
2.8	Optimalizace metody headspace mikroextrakce tuhou fází	44
2.9	Kalibrace pro metodu headspace mikroextrakce tuhou fází	45
2.10	Analýza reálných vzorků pív.....	46
3	Výsledky a diskuze	48
3.1	Zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti nástřiku.....	48
3.2	Výběr extrakčního rozpouštědla pro headspace mikroextrakci jednou kapkou.....	49
3.3	Zjištění doby inkubace headspace mikroextrakce jednou kapkou	50
3.4	Optimalizace metody headspace mikroextrakce jednou kapkou	51
3.5	Kalibrace metody headspace mikroextrakce jednou kapkou	52
3.6	Optimalizace metody headspace mikroextrakce tuhou fází	53
3.7	Kalibrace metody headspace mikroextrakce tuhou fází.....	56
3.8	Analýza reálných vzorků pív.....	59
3.9	Porovnání HS-SDME a HS-SPME v headspace uspořádání	62
	Závěr	63
	Seznam použité literatury	64
	Přílohy.....	69

Seznam obrázků

Obrázek 1: Řez obilkou ječmene	17
Obrázek 2: Schéma sladařství.....	18
Obrázek 3: Chmelová hlávka.....	21
Obrázek 4: Schéma pivovarnictví.....	24
Obrázek 5: Stereoizomery linaloolu	26
Obrázek 6: Zařízení pro SPME.....	28
Obrázek 7: Zařízení pro DI-SPME (vlevo) a HS-SPME (vpravo)	29
Obrázek 8: Zařízení pro DI-SDME (vlevo) a HS-SDME (vpravo).....	31
Obrázek 9: Schéma plynového chromatografu.....	36
Obrázek 10: Plamenový ionizační detektor	38
Obrázek 11: Analyzované vzorky piva.....	40
Obrázek 12: Vlákna a držák jehly pro metodu HS-SPME	44
Obrázek 13: Aparatura metody HS-SPME	47
Obrázek 14: Závislost průměrné plochy píku (A) na koncentraci linaloolu (c)	48
Obrázek 15: Závislost průměrné výšky píku (h) na koncentraci linaloolu (c)	49
Obrázek 16: Závislost výšky píku na době inkubace (n = 3).....	50
Obrázek 17: Vyhodnocení podmínek pro HS-SDME	51
Obrázek 18: Odezvové vhodnostní profily podmínek HS-SDME	52
Obrázek 19: Kalibrační závislost plochy píku (A) na koncentraci linaloolu (c) – HS-SDME.....	52
Obrázek 20: Kalibrační závislost výšky píky (h) na koncentraci linaloolu (c) – HS-SDME.....	53
Obrázek 21: Porovnání vláken PDMS a PDMS/DVB.....	54
Obrázek 22: Porovnání vláken DVB/CAR/PDMS a CAR/PDMS	55
Obrázek 23: Vyhodnocení podmínek pro HS-SPME	56
Obrázek 24: Odezvové vhodnostní profily podmínek HS-SPME	56
Obrázek 25: Kalibrační závislost plochy píku (A) na koncentraci linaloolu (c) – HS-SPME ..	57
Obrázek 26: Kalibrační závislost výšky píku (h) na koncentraci linaloolu (c) – HS-SPME.....	57
Obrázek 27: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci linaloolu HS-SPME pro kalibraci s maticí	58
Obrázek 28: Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci linaloolu HS-SPME pro kalibraci s maticí	58
Obrázek 29: Porovnání koncentrací linaloolu u piv za studena chmelených	61
Obrázek 30: Porovnání koncentrací linaloolu u klasicky chmelených piv.....	61

Seznam tabulek

Tabulka 1: Historický vývoj pivovarství v ČR.....	14
Tabulka 2: Rozdělení vod dle tvrdosti.....	15
Tabulka 3: Chemické složení chmele.....	20
Tabulka 4: Stádia hlavního kvašení.....	23
Tabulka 5: Skupiny chmelových výrobků.....	25
Tabulka 6: Těkavé látky piva.....	26
Tabulka 7: Příklady stacionárních fází pro SPME.....	30
Tabulka 8: Přehled využití SDME.....	32
Tabulka 9: Typy stacionárních fází pro GC.....	37
Tabulka 10: Vzorky piva pro analýzu.....	39
Tabulka 11: Podmínky separace pro GC.....	41
Tabulka 12: LOD a LOQ nástřiku (n = 3).....	42
Tabulka 13: Podmínky pro extrakce HS-SDME.....	43
Tabulka 14: Kalibrace metody HS-SDME (n = 3).....	43
Tabulka 15: Použitá vlákna pro metodu HS-SPME.....	44
Tabulka 16: Podmínky pro extrakce HS-SPME.....	45
Tabulka 17: Kalibrace metody HS-SPME (n = 3).....	46
Tabulka 18: Kalibrace s maticí metody HS-SPME (n = 3).....	46
Tabulka 19: Zjištění LOD a LOQ nástřiku.....	48
Tabulka 20: Retenční časy zkoušených extrakčních rozpouštědel.....	50
Tabulka 21: Zjištění LOD a LOQ metody HS-SDME.....	53
Tabulka 22: Optimální podmínky měření HS-SPME.....	54
Tabulka 23: Porovnání 4 vláken.....	54
Tabulka 24: Vyhodnocení LOD a LOQ metody HS-SPME.....	57
Tabulka 25: Vyhodnocení LOD a LOQ metody HS-SPME pro kalibraci s maticí.....	59
Tabulka 26: Hodnoty koncentrací linaloolu reálných vzorků piv.....	60
Tabulka 27: Porovnání HS-SDME a HS-SPME.....	62

Seznam příloh

Příloha I: Chromatogramy pro výběr extrakčních rozpouštědel.....	69
Příloha II: Vhodnostní profily zkoušených vláken.....	71
Příloha III: Porovnání výšek píků piv jedné značky.....	73
Příloha IV: Záznamy chromatogramů jednotlivých vzorků piv.....	76

Seznam použitých zkratek

ADI	Akceptovatelný denní příjem
BTEX	Benzen, toluen, ethylbenzen, xylen
CAR	Carboxen
CE	Kapilární elektroforéza
CW	Carbowax
DI-SDME	Přímá mikroextrakce jednou kapkou
DI-SPME	Přímá mikroextrakce tuhou fází
DVB	Divinylbenzen
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FID	Plamenový ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HS-SDME	Headspace mikroextrakce jednou kapkou
HS-SPME	Headspace mikroextrakce tuhou fází
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ID	Vnitřní průměr
IPA	India Pale Ale
LC	Kapalinová chromatografie
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
PA	Polyakrylát
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	Polychlorované bifenyly
PDMS	Polydimethylsiloxan
PLOT	Vrstva tuhého sorbentu na vnitřní stěně kapiláry
SCOT	Vrstva nosiče se zakotvenou kapalinou uvnitř kapiláry
SDME	Mikroextrakce jednou kapkou
SF	Stacionární fáze
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
TPR	Pryskyřice
VOC	Těkavá organická látka
WCOT	Tenký film kapalné fáze na stěnách kapiláry
WHO	Světová zdravotnická organizace

Úvod

Historie piva sahá až do mladší doby kamenné, kde se pěstovaly obiloviny k výrobě chleba, ale i kvašených nápojů. Chuť a aroma předchůdce dnešního piva nemělo s dnešním pivem moc společného, jelikož se chmel začal prokazatelně pěstovat až v 11. století našeho letopočtu. Od té doby pivo prošlo velkými změnami a dnes je přesně definováno jeho složení, označování a požadavky na jakost ve 3. oddíle vyhlášky č. 335/1997 Sb. V dnešní době je pivo nejprodávanější alkoholický nápoj na světě. Česká republika vyprodukuje přibližně 20 miliónů hektolitřů piva za rok. Ze statistik také vyplívá, že je Česká republika držitelem prvního místa v celosvětovém měřítku v množství vypitého piva na osobu.

Konečný aromaprofil tohoto alkoholického nápoje je závislý na několika faktorech. Nejdůležitějšími činiteli jsou pryskyřice a silice, které extrakcí chmele obohacují mladinu o typickou hořkost a aroma. Jedna z nových technologií, jak obohatit mladinu o tyto nepostradatelné látky, se nazývá studené chmelení neboli dry-hopping, které spočívá v tom, že je chmel do piva přidán v průběhu kvašení nebo až těsně před balením či konzumací samotného piva.

Tato diplomová práce je zaměřená na linalool, jakožto významnou chmelovou silici a jejím výskytem v klasicky chmelených a pozdně chmelených pivech. Ke stanovení linaloolu jsou použity mikroextrakční techniky s následnou analýzou na plynovém chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem.

1 Teoretická část

Výroba předchůdce dnešního piva sahá do hluboké historie. Již před 7000 lety před naším letopočtem se pěstovaly v Mezopotámii různé obiloviny k výrobě chleba, ale i kvašených nápojů. Ve středověku bylo právo vařit pivo udělováno panovníky zejména klášterům. Toto právo bylo spojováno také se zakládáním měst. Vaření piva bylo považováno za nejdůležitější městskou živnost, proto bylo právo vařit pivo často doplňováno o právo mílové (v okruhu 1 míle od městských bran se nesmělo sladovat ani vařit pivo), které chránilo trh před konkurencí. Od konce 18. století přešlo vaření piva na průmyslovou výrobu díky velkému pokroku poznání složitých chemických, fyzikálních a biochemických procesů [1, 2]. Historický vývoj pivovarství na území České republiky shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1: Historický vývoj pivovarství v ČR [3]

rok 993	rok 1118	rok 1353	rok 1842	rok 2008
první zmínka o vaření piva v Břevnovském klášteře	založen první pivovar v Cerhenicích	založen první sladovnický cech v Brně	v Plzni uvařena první várka spodně kvašeného piva	české pivo získalo Chráněné zeměpisné označení EU

V dnešní době se nachází na území České republiky přes 400 pivovarů, avšak 98 % z celkové produkce piva náleží velkým pivovarům, kterých je 46. V České republice se ročně vyrobí přibližně 20 miliónů hektolitrů piva za rok. Spotřeba piva zde činí 144,3 litrů na osobu za rok, což je první místo ve světě [3, 4].

Pivo je v zákoně o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb., v oddílu 3 prováděcí vyhlášky č. 335/1997 Sb. definováno jako „pěnový nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových produktů, který vedle kvasným procesem vzniklého alkoholu (ethylalkoholu) a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu“. V této vyhlášce jsou dále definovány požadavky členění na druhy, skupiny a podskupiny, označování, uvádění do oběhu a požadavky na jakost piva [5].

1.1 Vstupní suroviny pro výrobu piva

Pivo je velice komplexní alkoholický nápoj, ve kterém bylo doposud identifikováno několik stovek složek. Výroba piva je složitý proces, který zahrnuje míchání čtyř základních surovin; vody, sladovaného ječmene a chmele za účasti mikroorganismů – kulturních pivovarských kvasinek [6].

1.1.1 Voda

Vaření piva je spojeno s vysokou spotřebou vody, mnohokrát vyšší než je objem vyrobeného piva. Průměrná spotřeba na výrobu jednoho litru piva je sedm až dvanáct litrů. Voda, která se využívá v pivovarství, se dělí do tří skupin na vodu varní, vodu provozní a mycí a vodu sterilizační. Varní voda musí splňovat požadavky na pitnou vodu dle současné legislativy.

Důležitým kritériem je také tvrdost vody. Stálá tvrdost vody je tvořena vápenatými a hořečnatými solemi, které jsou stálé (sírany, chloridy nebo křemičitany). Naopak přechodná tvrdost vody je tvořena hydrogenuhličitanem, které se varem úplně nebo částečně rozkládají. Celková tvrdost je dána součtem stálé a přechodné tvrdosti vody a udává se v minimolech na litr, dříve v německých stupních (°D). Voda, která se využívá k výrobě plzeňského piva je velmi měkká, její celková tvrdost je 0,23 mmol/l. V následující tabulce 2 je zobrazeno rozdělení vod dle její tvrdosti [1, 7, 8].

Tabulka 2: Rozdělení vod dle tvrdosti [1]

	mmol/l	°D
voda měkká	do 1,3	do 7
voda středně tvrdá	1,3-2,5	7-14
voda tvrdá	2,5-3,8	14-21,3
voda velmi tvrdá	nad 3,8	nad 21,3

V minulosti pivovary pokrývaly spotřebu vody z vlastních zdrojů – pivovarských studní, nyní se stoupající spotřebou se využívají i jiné zdroje upravovaných vod, např. vody povrchové, pramenité a z městských vodovodních řádů. Zvýšené nároky na chemické složení varních vod vyžadují často úpravy i pitné vody vyhovující legislativě. V praxi se nejčastěji voda dekarbonizuje vysrážením Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů vápennou vodou a odsoluje reverzní

osmózou. Mezi další používané úpravy varní vody patří čiření, filtrace, okyselování, odželezování a odmanganování, denitrifikace a dezinfekce [8-10].

1.1.2 Pivovarské kvasinky

Použití kvasinek v pivovarství je nedílnou součástí technologického postupu, bez použití těchto mikroorganismů by nevznikl kvašený nápoj. Pro zaručení optimálního průběhu a požadované kvality je také důležitý výběr druhu kvasinek.

Taxonomicky kvasinky náleží k jednobuněčným houbám. Pivovarské kvasinky mají nejčastěji oválný tvar, který se spolu s velikostí mění na kultivačních podmínkách. Tyto buňky jsou obklopeny buněčnou stěnou, která je složena z polysacharidů glukanu a mananu, proteinů a chitinu. V dnešní době se v pivovarství používají dva základní druhy kvasinek. Prvním druhem jsou spodní pivovarské kvasinky, které se využívají pro piva plzeňského typu kvašených při teplotě 8-14 °C, po dokončení kvasného procesu se shlukují ve vločky a sedimentují na dno kvasných nádob. Druhým typem jsou svrchní pivovarské kvasinky, které se využívají při výrobě piv typu Ale, Porter a Stout kvašených při teplotě 20-24 °C, po ukončení kvasného procesu jsou vznikajícím oxidem uhličitým vynášeny na povrch, kde tvoří hustou pěnu tzv. deku.

Název pivovarské kvasinky pochází z roku 1837, kdy je německý vědec T. Schwann pozoroval pod mikroskopem a nazval je Zuckerpilz neboli cukerná houba. Tento název o rok později přeložil berlínský botanik J. F. Meyen do latiny jako *Saccharomyces cerevisiae*. V roce 1895 vydal Emil Christian Hansen taxonomickou studii kvasinek, od té doby se v pivovarnictví používaly čisté kmeny pivovarských kvasinek. Do roku 1952 se pro spodní pivovarské kvasinky používal název *Saccharomyces carlsbergensis*, pro svrchní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ostatní rody se v této době považovaly za cizí. V roce 1970 se *Saccharomyces carlsbergensis* zařadil pod společný druh *S. uvarum* a v roce 1984 i tento druh splynul pod společný název *Saccharomyces cerevisiae*. Toto sjednocení neuznávalo mnoho technologů, protože se tyto druhy technologicky liší. Mezi základní rozdíly patří složení genetického materiálu, rozdílné složení buněčných stěn, stupeň zkvašování rafinózy, růst na specifických půdách a vyšší tepelná odolnost svrchních kvasinek [1, 7, 11].

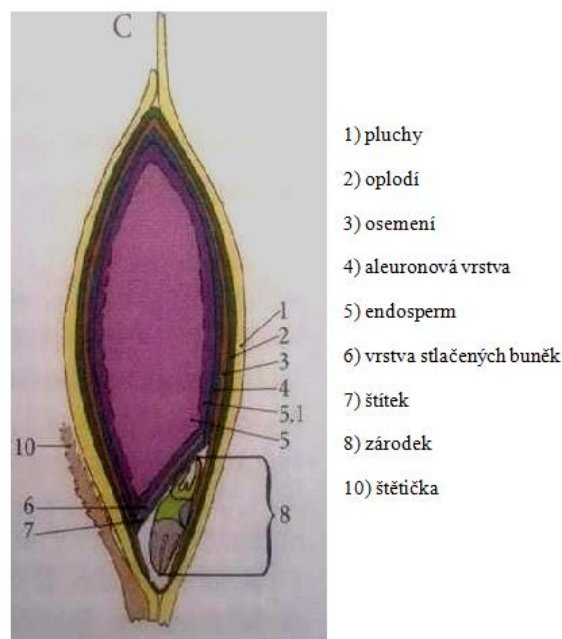
1.1.3 Slad

Slad se získává technologickými postupy máčení, klíčení a hvozdění ječmene nebo jiných obilovin (kukuřice, rýže, pšenice, čirok, oves nebo proso). Cílem je regulovat

biosyntézu a aktivitu sladových enzymů, dále tvorbu barevných a aromatických sloučenin. Nejrozšířenější výrobou jsou světlé slady plzeňského typu. Mezistupeň mezi světlými a tmavými slady je slad vídeňského typu. K výrobě tmavých piv se využívají tmavé slady bavorského (mnichovského) typu. Dalšími typy jsou speciální slady, mezi které se řadí karamelový, barvicí nebo nakuřovaný slad.

Hlavní sladařskou surovinou je ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) patřící do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Mezi nejvýznamnější sladovnické kultivary patří ječmen setý dvouřadý nicí (*H. vulgare* convar. *vulgare* var. *nutans*). V České republice je nejvíce pěstován v oblasti Hané, dále se mu daří v povodí velkých řek, jako je Labe, Dyje a Morava.

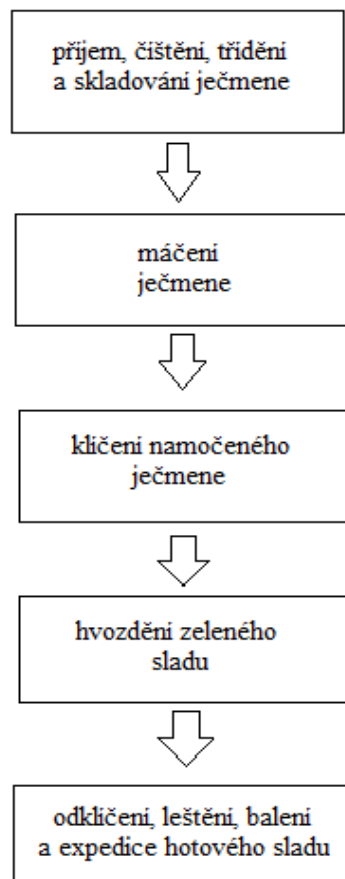
Nejvýznamnější složky ječného zrna jsou sacharidy, dusíkaté látky, polyfenoly a enzymy. Hlavní podíl sacharidických složek tvoří škrobová zrna, která jsou uložena v endospermu, který je zobrazen na obrázku 1. Ze sladařského hlediska je požadavek na vysoké procento škrobu, protože tvoří hlavní součást extraktu složky sladu. Škrob je zásobní polysacharid složený z amylozy a amylopektinu. V průběhu sladování je stěna škrobového zrna degradována a tím se stává přístupnější pro působení amylolytických enzymů. Požadavek na obsah bílkovin se pohybuje kolem 8-11 %, hlavní úlohou bílkovin je tvorba buněčného substrátu nebo plní funkci biologických katalyzátorů enzymů. Polyfenolové látky jsou obsaženy především v obalových částech zrna. Jsou nevhodnou součástí extraktu sladu, protože vytvářejí nepříjemně trpkou chuť. Enzymy zajišťují nejen metabolické procesy během vegetace ječmene, ale také zajišťují život zrna i za sníženého dýchání při posklizňovém uskladnění, výživu a vývin zárodku [1, 7, 12, 13].



Obrázek 1: Řez obilkou ječmene [13]

1.1.3.1 Sladařství

Sladování je řízený proces, při kterém dochází k vytvoření optimálních podmínek pro klíčení ječmene. Cílem tohoto procesu je aktivovat technologicky důležité enzymy, aromatické a barevné látky [9]. Technologii výroby sladu lze rozdělit na několik úseků, které jsou zobrazeny na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma sladařství [9]

Ječmen je dodáván do sladoven ihned po sklizni. Dodáván je železničními vagóny nebo nákladními automobily, které jsou vyprazdňovány na přijímací rampě s váhou. Po zbravení ječmene prachu, nečistot a různých cizích látek je ječmen rozdělen podle velikosti a kvantitativních znaků. Ječmen je živý organismus, energii potřebnou pro život získává zrno odbouráváním rezervních polysacharidů aerobním dýcháním za přítomnosti kyslíku nebo anaerobním kvašením za nepřítomnosti kyslíku. Produkty kvašení narušují klíčivost, proto je vytříděný ječmen skladován v silech, která jsou vybavená provzdušňovacím zařízením.

Máčením se zvýší obsah vody z 12 % na více jak 40 %, zrna ječmene zvýší svůj objem až 1,5krát. Tato voda je důležitá pro klíčení a průběh enzymových reakcí. Máčení probíhá v náduvnících (válnové kónické nádrže). Do náduvníků předem napuštěných vodou se tenkým proudem napustí ječmen. Z hladiny se odstraňují splavky a spodem se napouští nová voda. Po vyprání se voda vypustí a napustí se čerstvá voda, aby její hladina byla 30 cm nad povrchem ječmene. Tato voda se 1-3krát za den vyměňuje, kdy se mezi každým napuštěním dělá vzdušná přestávka po dobu 4-6 hodin. Celková doba máčení je nejčastěji 72 hodin.

Klíčení je proces, při kterém se v zárodečné části zrna vyvíjejí zárodky kořínků a listů. Zárodek listu se tlačí pod pluchami ke špičce, kde vyrůstá tzv. střelka, která se musí vyvinout jen do určité délky. Podle vývinu střelky se rozeznávají krátké slady (střelka do 1/2 délky zrna) a dlouhé slady (střelka do 3/4 délky zrna), vhodné pro výrobu tmavých sladů. Zelený slad je konečný produkt klíčení ječmene. Nejstarší postup klíčení je tzv. na humnách, což jsou hladké podlahy v prostorných místnostech s účinným větráním. V těchto místnostech musí být konstantní teplota maximálně 15 °C. Namočený ječmen se zde rozloží do výšky 30 cm, tato vrstva ječmene se musí několikrát přehazovat ručně nebo maltomobily. Klíčení trvá 7 dní k výrobě světlých sladů a 9 dní pro výrobu tmavých sladů. Klasické sladování na humnách bylo vystřídáno pneumatickými postupy sladování, které disponují sníženou potřebou lidské činnosti, nízkou spotřebou zastavěné plochy, vysokým stupněm automatizace a jejich činnost není závislá na ročním období. Tyto typy sladoven jsou vybaveny systémem nuceného větrání klimatizovaným vzduchem.

Zelený slad se nemůže skladovat, protože má vysoký obsah vody, a proto se suší. Při sušení se musí postupovat tak, aby škrob nezmažovatěl. Hvozďením se obsah vody sníží na 4 % u světlých sladů a 2 % u sladů tmavých, zastaví se vegetační procesy, a redukuje se část enzymové aktivity a začínají se tvořit chuťové, barevné a redoxní látky. Při hvozďení jsou nejdůležitější 3 fáze. Růstová fáze, při které ještě probíhají všechny vegetační pochody, probíhá do 40 °C, při vlhkosti nad 20 %. Enzymová fáze, kdy jsou v zrna zastaveny všechny vegetační pochody, ale enzymové reakce pokračují, probíhá nad 60 °C a vlhkosti pod 20 %. Chemická fáze probíhá při teplotách nad 60 °C a při vlhkosti pod 10 %, v této fázi dochází k tvorbě barevných a aromatických látek.

Z hvozdu se usušený slad dostává do zásobníků a dopravuje se do odkličovačky, kde je zbaveno kořínků a střelky tzv. sladového květu. Sladový květ se dále využívá jako hodnotné bílkovinné krmivo.

Slad se před expedicí čistí a leští, aby byl dokonale zbaven zbytků sladového květu, prachu, rozdrčených zrn a jeho vzhled byl lesklý [8, 9, 13, 14].

1.1.4 Chmel

Nejdůležitější a doposud nezastupitelná složka při výrobě piva, která udává typickou hořkost a aroma, je chmel. Chmel je známý již od středověku jako planě rostoucí rostlina, která se využívala k léčení malomocenství nebo při ledvinových a jaterních nemocech. V současnosti je využíván ve farmacii k výrobě léků proti revmatizmu nebo špatnému trávení. Nejdůležitější složky chmele, které utvářejí organoleptické vlastnosti piva, jsou chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly. Významnou složkou chmelových pryskyřic jsou α -hořké (humulon, adhumulon a kohumulon) a β -hořké (lupulon, adlupulon a kolupulon) kyseliny, které mají konzervační a baktericidní účinky, ovlivňují pěnivost piva, působí jako srážecí činidlo při vylučování vysokomolekulárních dusíkatých látek a přispívají k charakteristickému aroma piva [1, 7, 12]. Následující tabulka 3 popisuje chemické složení chmele.

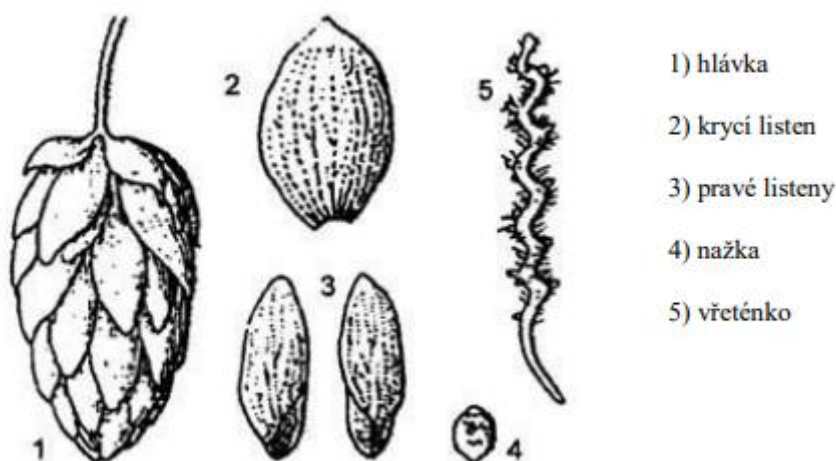
Tabulka 3: Chemické složení chmele [1]

Složka	Obsah složky (hmotnostní %)
sacharidy (celulóza)	40-50
celkové pryskyřice	15-18
dusíkaté látky	12-18
voda	10-11
minerální látky	7-9
polyfenoly	2-5
vosky a lipidy	2-4
chmelové silice	0,5-2

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) patří do čeledě rostlin konopovitých (*Cannabinaceae*), do této čeledě je též řazeno konopí. Tyto dva rody (*Humulus* a *Cannabis*) mají mezi sebou sice určité chemické podobnosti, avšak obsažené pryskyřice mají odlišné využití. U konopí se jedná o drogu tetrahydrokannabinol.

Je to vytrvalá, dvoudomá rostlina, která každé jaro vyrůstá z oddenků podzemního podnoží. V pivovarství se využívají pouze samičí neoplozené rostliny. Samčí rostliny se využívají ke šlechtění nových odrůd chmele pomocí řízené hybridizace. Oplozené samičí rostliny poskytují sice vyšší výnosy, ale obsahují nižší obsah pryskyřičné látky lupulinu, proto není vhodný blízký výskyt samčích rostlin v okolí chmelnic. Jedná se o révu, která se stačí

kolem své podpěry ve směru hodinových ručiček. Mezi hlavní části této rostliny patří kořenová soustava, réva s pazochy, listy a květenství, které se vyvíjí v chmelové hlávky. Listy jsou řapíkaté, tmavě zelené s 3-5 laloky a mají velmi drsný povrch. Chmelové hlávky se skládají ze stopky, vřeténka, pravých a krycích listenů. Na vnitřní straně listenů se při zrání vylučují zrnka lupulinu, který obsahuje nejcennější pryskyřice a silice [1, 7, 15]. Stavba chmelové hlávky je zobrazena na obrázku 3.



Obrázek 3: Chmelová hlávka [1]

Od 12. století se v našich zemích začal chmel pěstovat systematicky, předtím se využíval chmel česaný na planě rostoucích rostlinách. Původně si chmel pěstovali všichni pivovarníci zvláště, teprve od 16. století se pěstování chmele centralizovalo a chmelnice byly vysazovány na místech s optimálním složením půdy a klimatem. Z hlediska podmínek pro pěstování je chmel vlhkomilná rostlina, rostoucí na mírně kyselých až neutrálních půdách, náročná na světlo, vláhu a teplotu. Nejvýznamnější chmelnice v České republice se vyskytují na Žatecku a Ústěcku v Čechách a Tršicku na Moravě.

Odrůdy chmele se dělí dle zbarvení na červeňáky (pěstované především v ČR, Německu, Polsku a Slovinsku) a zeleňáky (pěstované v USA a Austrálii). Dalším dělením je dle délky doby zrání na rané, polorané a pozdní. Z hlediska chmelových pryskyřic a aroma se dělí na jemné aromatické chmele (3-7 % α -hořkých kyselin) a vysokoobsažené hořké chmele (až 15 % α -hořkých kyselin).

V současné době se přírodní hlávkový chmel používá jen zřídka, v posledních desetiletích se chmel zpracovává na různé chmelové výrobky, jako jsou mleté a granulované chmely, tzv. pelety, nebo pastovité extrakty. Důvodem nahrazení přírodního hlávkového chmele je snazší skladování a vyšší stabilita [1, 7, 15].

1.1.4.1 Pivovarnictví

Prvním krokem pivovarnictví je výroba mladiny ze sladu, vody a chmele nebo chmelových výrobků. Výroba mladiny je velice komplexní proces skládající se z po sobě navazujících kroků: šrotování, vystírání, rmutování, scezování, chmelovar a chlazení mladiny.

Cílem šrotování sladu je dokonale vymlet endosperm a zpřístupnit jej pro fyzikálně-chemické a enzymové reakce. Po rozemletí sladu nesmí šrot obsahovat žádná celá zrna. Slad se mele ve šrotovnicích se dvěma až šesti válci za sucha, vlhčený parou nebo za mokra.

Vystíráním se dokonale smíchá sladový šrot s vodou ve vystírací kádi. Použitá voda se nazývá nálev a množství sladu sypání. Této směsi se říká dílo nebo vystírka. Převážně se vystírá při teplotě 37 °C.

Účelem všech způsobů rmutování je rozštěpení a převedení optimálního podílu extraktu surovin do roztoku. Vystírka je postupně vyhřívána na jednotlivé rmutovací teploty (35-78 °C), které jsou optimální pro různé skupiny enzymů. Důležité procesy při rmutování jsou štěpení škrobu a bílkovin. Škrob se štěpí ve třech etapách: bobtnání a zmazovatění škrobu, ztekucení škrobu (působením α -amyláz) a zcukření škrobu (působením α - a β -amyláz).

Scezování se provádí za účelem oddělení roztoku extraktu (sladina) od tuhého zcukřeného podílu rmutu (mláto). Scezování probíhá na scezovacích kádích s dvojitým děrovaným dnem nebo na sladínových filtrech. Konečný zfiltrovaný roztok se nazývá předek. Mláto se vyslazuje horkou vodou o teplotě 75 °C, aby se vyluhovaly poslední zbytky rozpustného extraktu. Tento roztok se nazývá výstřelek. Předek a výstřelek se shromažďují v mladinové pánvi.

Chmelovar neboli vaření sladiny s chmelem má za cíl převedení hořkých látek chmele do mladiny, sterilizaci mladiny, inaktivaci enzymů a koagulaci bílkovin s polyfenolovými látkami sladu a chmele. V této fázi se chmelové α -hořké kyseliny izomerací přeměňují na intenzivně hořké izo- α -hořké kyseliny, probíhají zde Maillardovy reakce za tvorby barevných a aromatických látek a denaturace sladových bílkovin. Chmel nebo chmelové výrobky se přidávají nejčastěji na dvakrát. Chmelovar trvá 90-120 minut a jeho produktem je mladina.

Chlazením se z mladiny odstraňují hrubé a jemné kaly, ochlazuje se na zákvasnou teplotu (4-7 °C) a provzdušňuje se za sterilních podmínek vzduchem v uzavřených vířivých kádích. Hrubé (horké) kaly jsou způsobeny bílkoviny, hořkými látkami a polyfenoly, jemné (chladové) kaly jsou pozůstatkem polysacharidů [1, 8-10].

Druhým krokem v pivovarství je hlavní kvašení mladiny a dokvašování mladého piva pivovarskými kvasinkami.

Hlavní kvašení je prováděno spodními pivovarskými kvasinkami v kádích, které jsou umístěny ve spilkách, kde jsou zkvasitelné sacharidy (glukóza, matlóza a maltotrióza) přeměněny na ethanol a oxid uhličitý anaerobním kvašením. V menším měřítku jsou zde tvořeny i vedlejší produkty, jako jsou alifatické alkoholy, aldehydy, diketony, mastné kyseliny a estery. Hlavní kvašení má 5 stádií, které jsou zobrazeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Stádia hlavního kvašení [8, 10]

Zprašování	tvorba první bílé pěny cca po 12 hodinách
Odrážení	pěna houstne, je odrážena do středu kádě
Nízké bílé kroužky	smetanová pěna s kučeravým povrchem, nejintenzivnější vývin CO ₂
Vysoké hnědé kroužky	pokles pH, vysrážené kaly v pěně, trvají 3 dny
Propadání	tvorba husté deky, sedimentace kvasinek

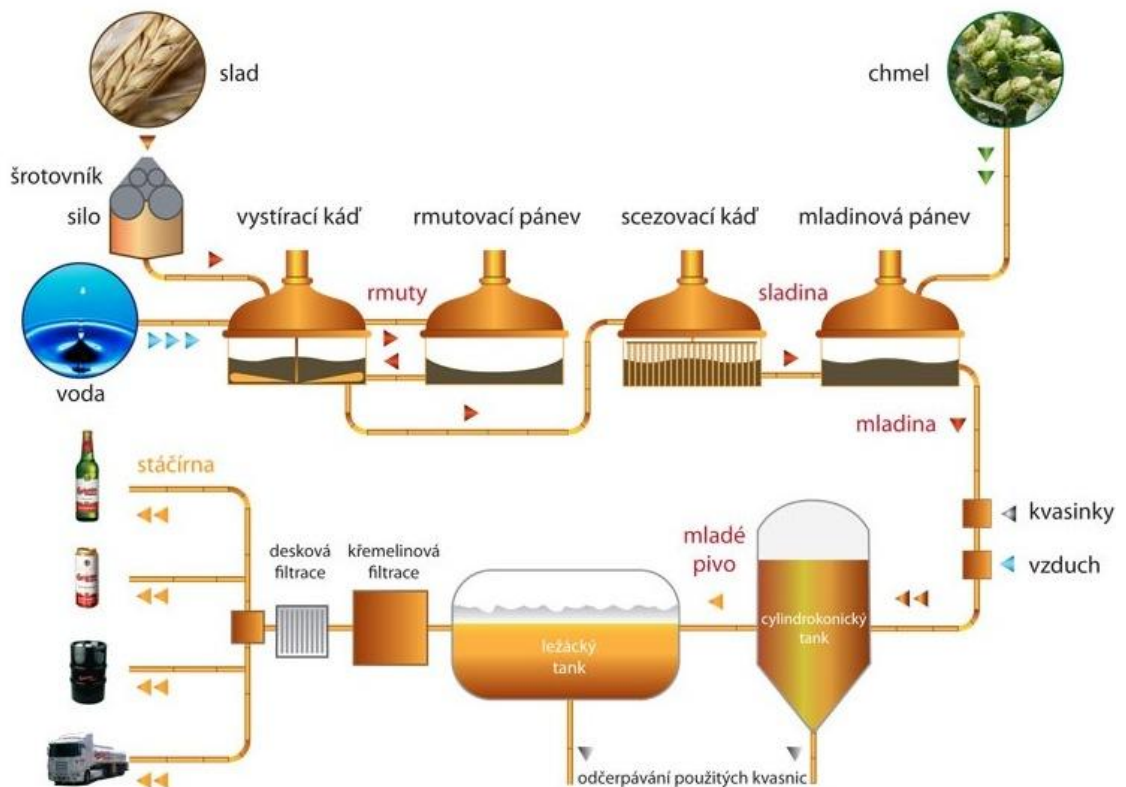
Toto kvašení trvá 6-8 dní podle druhu vyráběného piva. Pivovarské kvasinky se po stáhnutí piva odčerpávají, propírají se studenou vodou a znovu se nasazují do provozu.

Dokvašení a zrání mladého piva se provádí v ležáckém sklepě při teplotě 1-3 °C. Dokvašení trvá 3 týdny až 3 měsíce v závislosti na stupňovitosti piva. Ležácké tanky jsou ocelové a pivo v nich dokváší při tlaku 0,05 MPa. Tento tlak se konstantně udržuje a nadbytečný CO₂ je vypouštěn z tanků. Kvašení a dokvašení lze realizovat v jedné nádobě, tento postup se nazývá jednofázové kvašení. Obvykle se provádí v cylindrokónických velkoobjemových tancích.

Finálním krokem pivovarství jsou závěrečné úpravy a stáčení zralého piva do transportních nádob či obalů. Mezi závěrečné úpravy se řadí filtrace, pasterace a stabilizace. Filtrací piva se odstraní kalové látky a dosahuje se tak požadované čisti. Filtrační materiály se dělí na tři základní skupiny; vláknité, zrnité a práškovité a pórovité. Nejstarší a dnes již málo využívaný vláknitý materiál je pivovarská hmota vyrobená z bavlněného lintersu. V současnosti je nejrozšířenějším filtračním materiálem křemelina, která se řadí do práškových typů. Další používané materiály jsou perlit, aktivní uhlí, silikagel a membrány z plastu, kovu nebo křemeliny. Pro odstranění mikrobiálních zárodků se používají odzárodkovací desky neboli EK-filtry. Cílem pasterace a aseptického plnění piva je zabezpečit dlouhodobou mikrobiální trvanlivost piva. Pasterace se provádí v lahvích

nebo plechovkách v ponorných a tunelových pastérech při teplotě 62 °C na několik minut, výjimečně se provádí mžitková pasterace při vyšší teplotě. Cílem stabilizace je zaručení mnohaměsíční trvanlivosti u exportních piv, odstranění prekurzorů zákalů piva za použití stabilizátorů, které se do piva přidávají nejčastěji před koncem dokvašování, aby bylo možné vyloučené látky zfiltrovat. Nejvíce využívané jsou stabilizátory adsorpční (silikagel) a antioxidační (kyselina askorbová) pro eliminaci kyslíku.

Stáčení piva je založeno na izobarickém principu, aby se zamezilo ztrátám oxidu uhličitého. V moderních linkách se stáčí pivo pod tlakem oxidu uhličitého do obalů, které jsou předem předplněné oxidem uhličitým nebo směsí tohoto oxidu a dusíku. Dalším důležitým požadavkem na stáčení piva je dokonalá sanitace zařízení, která přijdou do styku s pivem. Transportní obaly pro vnitřní obchodní síť a pro export jsou sudy, lahve, plechovky a nevratné plastové lahve a cisterny pro dislokované stáčírny [1, 8-10]. Celý proces pivovarnictví jde znázorněn na obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma pivovarnictví [16]

1.1.4.2 Chmelení piva

Obohacení mladiny o hořké látky chmelových hlávek dávkováním lisovaného chmele je v dnešní době značně omezeno. Koncem minulého století přesáhl rozsah zpracování chmelových výrobků nad zpracováním hlávkového chmele [1]. Chmelové výrobky lze rozdělit do čtyř základních kategorií dle způsobu výroby a konzistence, viz tabulka 5.

Tabulka 5: Skupiny chmelových výrobků [1]

Mechanická úprava hlávkového chmele	granulovaný chmel, obohacené chmelové pelety
Extrakce hlávkového chmele	ethanolový chmelový extrakt, extrakt chmele CO ₂
Chemické úpravy hlávkového chmele	chmelové izoextrakty, izopelety, huluponové extrakty
Syntetické chmelové preparáty	v praxi se neuplatnily – sensorické vady, legislativa

Během chmelovaru (vaření mladiny) jsou těkavé složky chmele vypařovány nebo oxidovány. Složky, které jsou původně obsažené v chmelu, se do značné míry liší od složek v hotovém pivu. Mnoho pivovarů čelí tomuto problému tak, že přidávají chmel těsně před skončením chmelovaru, tento způsob se nazývá pozdní chmelení, tzv. late-hopping. Další způsob chmelení se nazývá chmelení za studena, tzv. dry-hopping, které spočívá v tom, že je chmel přidáván (extrakce za studena) do piva během kvašení nebo těsně před balením nebo konzumováním. Některé minipivovary nebo pivovarské restaurace používají patrony s chmelem, kdy dochází k extrakci chmele přímo před načepováním do sklenice nebo stáčením do lahve. Studené chmelení je součástí výrobní technologie a hojně je využíváno ve Velké Británii, USA, Kanadě, Austrálii a Skandinávii. Některé složky chmele jsou takto přenášeny do alkoholové matrice, čímž způsobují příjemné chmelové aroma a chuť bez zbytečně vysoké hořkosti, která vzniká při vaření chmele s mladinou. Dle studií vyplývá, že za studena chmelená piva obsahují značně nižší obsah izo- α -hořkých kyselin a vyšší obsah nehořkých α -hořkých kyselin. Z průzkumu vyplývá, že v posledních 25 letech mají spotřebitelé zájem spíše o méně hořká piva. Dříve byl průměrný rozsah hořkosti mezi 20-60 hořkosti (IBU), v dnešní době je tento rozsah mezi 6-30 IBU (1 IBU odpovídá 1 mg/l nebo 1 ppm izo- α -hořkých kyselin v roztoku) [6, 17-20].

1.1.4.3 Těkavé látky piva

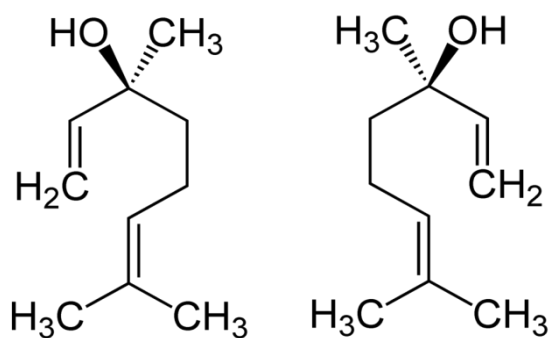
Chmelové pryskyřice a silice patří k nejdůležitějším složkám chmele. Jsou zodpovědné za intenzitu hořkosti a konečné aroma piva. Přehled nejvýznamnějších chmelových pryskyřic a silic je znázorněn v tabulce 6.

Tabulka 6: Těkavé látky piva [1, 21]

CHMELOVÉ PRYSKYŘICE		CHMELOVÉ SILICE	
α -hořké kyseliny	β -hořké kyseliny	uhlovodíkové frakce	kyslíkaté frakce
humulon	lupulon	myrcen	linalool
kohumulon	kolupulon	α -pinen	geraniol
adhumulon	adlupulon	limonen	humulenol
posthumulon	postlupulon	β -farnesen	karyofylenepoxid
prehumulon	prelupulon	α -humulen	nerol

Nejvýznamnější chmelové pryskyřice jsou α -hořké kyseliny, které jsou chemicky velmi nestálé, snadno podléhají izomeraci, oxidaci a transformaci. Produkty těchto reakcí jsou izo- α -hořké kyseliny, které vznikají při varu mladiny s chmelem. Při izomeraci vznikají *cis*- a *trans*- stereoizomery izo- α -hořkých kyselin, které mají odlišné fyzikální a pivovarské vlastnosti [1].

Linalool patří mezi nejvýznamnější chmelové silice, patřící do skupiny terpenových alkoholů. Jeho systematický název je 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol, pro který existují dva stereoizomery. První z nich je (R)-(-)-linalool neboli likareol, který je nejvíce obsažen v levanduli, bazalce nebo vavřínu. Druhým stereoizomerem je (S)-(+)-linalool neboli koriandrol, který je nejvíce obsažen v koriandru [22]. Koriandrol je zobrazen na obrázku 5 vpravo a likareol vlevo.



Obrázek 5: Stereoizomery linaloolu [23]

Koriandrol má výraznou květinovou, bylinnou až citrusovou vůni, zatímco likareol má dřevitou, levandulovou vůni. Linalool je těkavý a na vzduchu podléhá autooxidaci. Tyto oxidační produkty mohou způsobovat mírnou alergickou reakci.

Tato látka je hojně využívána v kosmetickém průmyslu, přidává se do šamponů, sprchových gelů, mýdel, antiperspirantů a především do parfémů. Své využití dále nachází v čisticích prostředcích pro domácnost. Přidává se do potravin a nápojů jako aditivní látka, dle FAO/WHO (Organizace pro výživu a zemědělství/Světová zdravotnická organizace) je ADI (akceptovatelný denní příjem) 0-0,5 mg/kg tělesné hmotnosti/den. Dále se využívá pro syntézu vitamínu E a při výrobě vitamínu A. Linalool je využívám také v medicíně pro jeho protizánětlivé, analgetické a sedativní účinky. Kromě toho se linalool používá jako insekticid pro likvidaci ektoparazitů u zvířat [22, 24, 25].

1.2 Mikroextrakční techniky

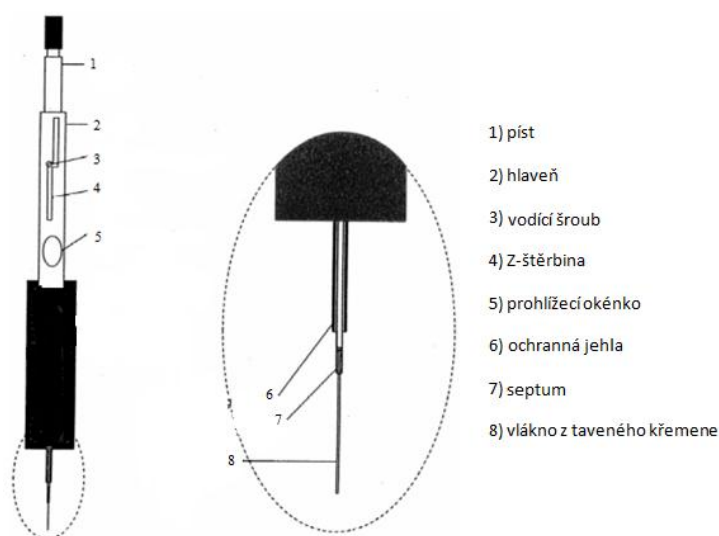
Současným trendem extrakčních technik je minimalizace použití organických rozpouštědel, nízké pořizovací náklady a náklady na provoz. Další důležitý požadavek je úspora času a snaha o zjednodušení celého procesu [26].

1.2.1 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází neboli SPME (Solid-Phase Microextraction) je kvalitativní a kvantitativní sorpčně/desorpční technika určená k izolaci a zakoncentrování analytu. Tato technika byla vyvinuta na Univerzitě Waterloo v Kanadě na přelomu 80. a 90. let 20. století v týmu pod vedením profesora Janusze Pawliszyna. Tato metoda zkracuje čas přípravy, omezuje použití rozpouštědel a může zlepšovat detekční limity. Rutinně se používá v kombinaci s plynovou chromatografií ke stanovení těkavých látek. Dále se využívá s kapalinovou chromatografií ke stanovení málo těkavých nebo termicky labilních látek. SPME má velice široké pole působnosti, dá se využít v oblasti environmentální, klinické, forenzní, farmaceutické a potravinářské analýzy [27-29].

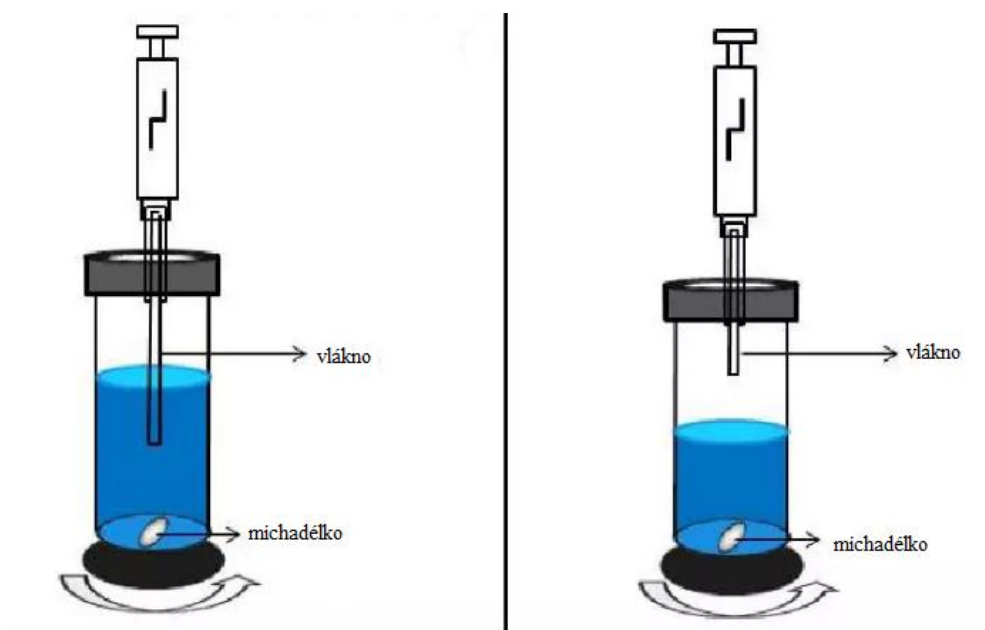
1.2.2 Zařízení pro mikroextrakci tuhou fází

Na vláknech dochází k extrakci analytů do stacionární fáze, kterou je vlákno potaženo. Zařízení SPME se skládá z držáku a duté jehly (ochranná funkce před mechanickým poškozením vlákna), ve které je uloženo vlákno z taveného křemene [26-30]. Konstrukce zařízení SPME je zobrazeno na obrázku 6.



Obrázek 6: Zařízení pro SPME [28]

Mikroextrakce tuhými fázemi je dělena na dva způsoby. První z nich je přímá sorpce z roztoku neboli DI-SPME (Direct Immersion SPME), kde je vlákno ponořeno do kapaliny. Jedná o dvoufázový systém tvořený komplexním vzorkem a stacionární fází na vlákně. Druhým způsobem je sorpce z plynné fáze nad vzorkem neboli HS-SPME (Headspace SPME), kde je od předchozího systému navíc plynná fáze nad vzorkem. Tato modifikace zkracuje dobu extrakce a usnadňuje aplikaci této metody při analýze tuhých vzorků. V HS-SPME je vlákno vystaveno plynné fázi nad kapalinou nebo tuhým vzorkem, výhodou této metody je ochrana vlákna před škodlivými látkami vzorku. V případě vodných matric se těkavé a nepolární látky extrahují rychleji než částečně těkavé a polární látky. Zvyšování teploty může taktéž urychlit dobu extrakce. Po extrakci se vlákno zatáhne do jehly pomocí manipulačního zařízení podobné injekční stříkačce, poté se celá jehla vloží do nástřikového prostoru analytického přístroje (GC, LC) a vlákno se opět vysune [26-34]. Na obrázku 7 vpravo je zobrazena konstrukce pro headspace mikroextrakci tuhými fázemi, zatímco vlevo je zobrazeno zařízení pro přímou mikroextrakci tuhými fázemi.



Obrázek 7: Zařízení pro DI-SPME (vlevo) a HS-SPME (vpravo) [32]

1.2.2.1 Stacionární fáze pro mikroextrakci tuhou fází

Podstatou je křemenné vlákno, které je pokryté polymerním sorbentem nebo imobilizovanou kapalinou o různých tloušťkách (5-100 μm). Tyto stacionární fáze (SF) se liší ve své polaritě, sorpčních schopnostech a tloušťce polymeru. Tloušťka vrstvy stacionární fáze je jedním z parametrů určující citlivost extrakce a extrakční čas. Čím silnější vrstva SF bude použita, tím vyšší bude citlivost metody, ale zároveň se prodlouží doba extrakce. Výběr povlaku vlákna závisí především na vlastnostech analytu. Před analýzou dalšího vzorku by mělo být vlákno vyčištěno a kondicionováno.

Nejčastěji používané komerčně dostupné stacionární fáze jsou polydimethylsiloxan, divinylbenzen, Carboxen (uhlíkové molekulové síto), Carbowax (polyetylenglykol) nebo jejich kombinace. Kombinace PDMS/DVB, PDMS/CAR a CW/DVB jsou více polární než ty, co obsahují PA, proto se častěji využívají k extrakci vysoce polárních látek. CAR dodává PDMS/CAR větší specifický povrch, a proto se často využívá k extrakci těkavých látek. Při výběru polaritě stacionární fáze by měla být zohledněna polarita stanovovaného analytu, měly by mít podobnou polaritu. Mezi nově se vyskytující trendy stacionárních fází patří polykrystalické grafity, molekulárně vtištěné polymery, imunosorbenty nebo sol-gelové povlaky [26-30, 33, 35]. Příklady používaných komerčně dostupných SF jsou vypsány v tabulce 7.

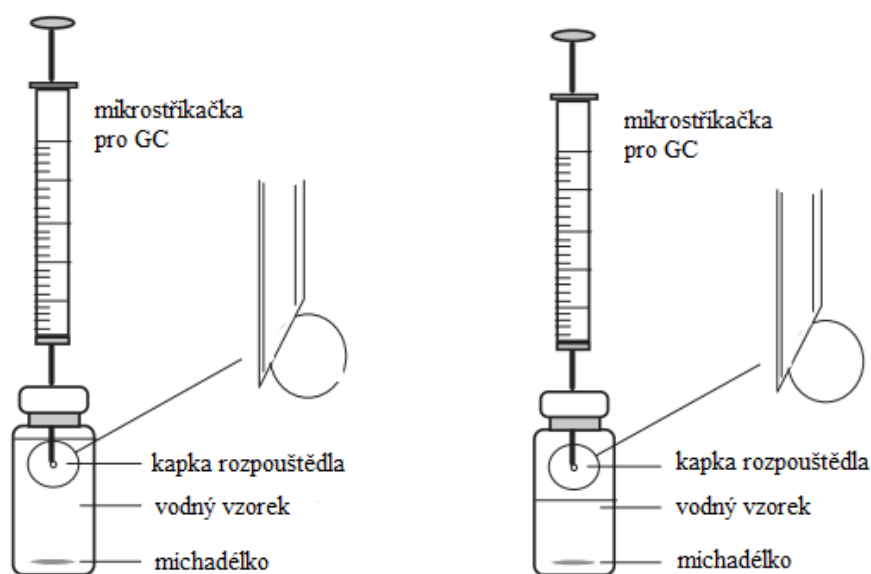
Tabulka 7: Příklady stacionárních fází pro SPME [29-31]

Stacionární fáze	Tloušťka [μm]	Chromatografie	Sorbované látky
PDMS – nepolární	100, 30, 7	GC/HPLC	VOC, PAH, PCB
PA – polární	85	GC/HPLC	organofosforové pesticidy, fenoly
PDMS/DVB – bipolární	65, 60	GC/HPLC	PAH, ketony, terpeny, alkoholy
CAR/PDMS – bipolární	75, 85	GC	VOC, BTEX, PAH, As, Sb, Se, Sn,
CW/DVB – polární	65, 70	GC	alkoholy, chlorbenzeny, herbicidy
CAR/TPR – polární	50	HPLC	povrchově aktivní látky

1.2.3 Mikroextrakce jednou kapkou

Mikroextrakce jednou kapkou neboli SDME (Single-Drop Microextraction) je jednoduchá, levná, rychlá, efektivní technika a zároveň minimalizuje spotřebu organických rozpouštědel. Tato technika kombinuje extrakci (případně přečištění) a zkoncentrování v minimálním počtu kroků a umožňuje následný přímý vstup do analytického systému, jako je plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) nebo kapilární elektroforéza (CE).

Principem této techniky je extrahovat ze vzorku (donorová fáze) sledované sloučeniny do kapky organického rozpouštědla (akceptorová fáze). Mikroextrakce jednou kapkou lze provádět ve dvou základních uspořádáních. První z nich je přímá mikroextrakce jednou kapkou neboli Direct Immersion SDME, která je zobrazena na obrázku 8 vlevo. Častěji využívanou je headspace mikroextrakce jednou kapkou neboli HS-SDME, která je zobrazena na obrázku 8 vpravo. Pracovní postup při HS-SDME je podobný jako u DI-SDME s tím rozdílem, že kapka extrakčního rozpouštědla visí nad hladinou kapalného nebo tuhého vzorku. Po ukončení extrakce je kapka zatažena zpět do jehly a analyzována pomocí GC nebo HPLC [36-42].



Obrázek 8: Zařízení pro DI-SDME (vlevo) a HS-SDME (vpravo) [41]

Konvenční extrakce z kapaliny do kapaliny je časově náročná a je při ní použito velké množství potenciálně toxických organických rozpouštědel. SDME byla první mikroextrakce pro vodné a plynné vzorky, která řeší miniaturizaci použití těchto rozpouštědel. V polovině

devadesátých let Liu a Dasgupta vyvinuli metodu, která zahrnovala použití jedné kapky k extrakci analytů, kde byla použita kapilára z oxidu křemičitého. Následně Jeannot a Cantwell představili metodu, ve které byla mikroextrakčním médiem kapka 8 μ l 1-oktanolu na konci teflonové tyčinky suspendovaná do míchaného vodného roztoku. Po extrakci byla teflonová tyčinka vyjmuta z roztoku a extrakční organická fáze byla mikrostříkačkou nadávkována do plynového chromatografu. Později byla tato technika zjednodušena tak, že teflonová tyčinka byla nahrazena přímo hrotem mikrostříkačky.

Existuje mnoho organických rozpouštědel, které lze použít jako extrakční rozpouštědla, například n-hexan, cyklohexan, toluen, xylen, izooktan, anizol, chloroform, oktanol nebo amylalkohol. Nezbytnou podmínkou je nemísitelnost rozpouštědla s vodnými vzorky, adekvátní hustota, díky které se drží na špičce jehly injekční stříkačky, a při chromatografické analýze by pík rozpouštědla měl být dostatečně separován od píků sledovaných látek. V tabulce 8 je přehled vybraných analýz různých vzorků v uspořádání DI-SDME a HS-SDME [26, 38-41].

Tabulka 8: Přehled využití SDME [41]

Uspořádání SDME	Analytická technika	Sledovaný analyt	Vzorek	Extrakční rozpouštědlo
DI-SDME	GC-MS	organochlorové pesticidy	ryby	toluen
DI-SDME	GC-MS	pesticidy	víno	izooktan
DI-SDME	GC-FID	tabákové alkaloidy	moč, sliny	chloroform
HS-SDME	GC-MS	aldehydy	okurka	pentanol
HS-SDME	GC-FID	BTEX	olej	hexadekan
HS-SDME	GC-FID	kyselina valproová	krvni sérum	dodekan

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem, GC-FID – plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem, BTEX – benzen, toluen, ethylbenzen, xylen

1.2.4 Možnosti kvantifikace

Jednou z nejčastějších možností, jak provést kvantifikaci, je kalibrační křivka. Pro přípravu kalibrační křivky je zapotřebí přípravy několika standardních (kalibračních) roztoků o různé koncentraci se vzorkovou maticí. Vzorky se dále analyzují při stejných extrakčních podmínkách. Poté se koncentrace analytu ve vzorku může počítat dosazením do kalibrační

rovnice ve tvaru: $y = kx + q$, kde k je směrnice přímky, q je úsek na ose y , x je nezávislá proměnná a y je závislá proměnná.

Dalším způsobem je standardní přídavek. Ten obnáší přidání známého množství standardu o známé koncentraci do matrice vzorku, která původně obsahuje neznámou koncentraci hledaného analytu. Tato metoda může být při velkém počtu vzorků časově náročná. Je také nevhodná pro tuhé nebo nehomogenní vzorky.

Třetím způsobem kvantifikace je metoda vnitřního standardu, při této metodě se ke vzorku přidá určité množství látky, kterou nesmí obsahovat analyzovaný vzorek, nesmí s žádnou složkou vzorku reagovat a musí být dobře oddělitelný od původní matrice. Vnitřní standard by se měl eluovat v blízkosti sledovaného analytu [43, 44].

1.2.5 Příklady stanovení těkavých složek kapalných potravin

1.2.5.1 Identifikace těkavých látek v sójových produktech

Mikroextrakce tuhou fází s využitím plynové chromatografie je běžně používanou metodou pro stanovení těkavých látek z různých matric. Zájem o aplikaci HS-SPME na sójové produkty se zvyšuje, důvodem jsou problémy s příchutěmi a pachy sóji, což je hlavní technologická překážka při výrobě sójových produktů. Mezi těkavé látky v sójových produktech patří především pentanol, hexanol, heptanol a ethylvinyl keton.

K proměření bylo použito 21 standardů z různých chemických tříd, jako jsou aldehydy (heptanal, hexanal atd.), alkoholy (1-hexanol, 1-heptanol atd.), ketony (2-heptanon, 3-hydroxy-2-butanon atd.), aromatické sloučeniny (benzaldehyd, n-butyl benzen atd.), estery (ethyl-heptanoát, ethyl-hexanoát atd.) a furany (2-pentyl furan). Optimalizované podmínky byly doba inkubace (5-60 min), teplota inkubace (30-70 °C), objem vzorku (0,5-5 ml) a typ vlákna (65 μm CWAX/DVB, 70 μm PDMS/DVB a 85 μm CAR/PDMS). Následná detekce probíhala na plynovém chromatografu s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) s heliem jako nosným plynem. Byla zde použita kapilární kolona WCOT CP-SIL 8 CB Low Bleed/MS o rozměrech 30 m \times 0,25 mm s chemicky vázaným polysiloxanem o tloušťce filmu 0,25 μm . Teplotní program byl následující: počáteční teplota byla 35 °C po dobu 3 minut a poté se zvyšovala na 210 °C rychlostí 6 °C za minutu. Vyhodnocení tohoto experimentu ukázalo, že optimální podmínky pro nejvyšší selektivitu a citlivost jsou následující: typ vlákna 85 μm CAR/PDMS, inkubace při teplotě 40 °C po dobu 20 minut a objem vzorku 5 ml. Tyto podmínky pak byly aplikovány na 6 komerčně dostupných sójových výrobků [45].

1.2.5.2 Stanovení těkavých látek produkovaných bakteriemi rodu *Salmonella* ve vzorcích kravského mléka

Detekce patogenních bakterií v potravě je důležitá pro ochranu spotřebitelů a pomáhá v prevenci před alimentárním onemocněním. Bakterie rodu *Salmonella* může způsobit vážná onemocnění u kojenců a lidí s chronickým onemocněním nebo sníženou imunitou. Je to gram-negativní, tyčinkovitá bakterie s optimální teplotou růstu při 32-37 °C, většina salmonel není tepelně rezistentní a dá se snadno zničit při pasterizaci.

V této studii byly exogenní těkavé organické látky produkované patogenní bakterií rodu *Salmonella* identifikovány a kvantifikovány pomocí HS-SPME s následnou detekcí na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. K detekci salmonel byly využity specifické enzymy C₈ esteráza, α-galaktosidáza a pyrrolidonyl peptidáza, které využívají substráty 2-chlorofenyloctanoát, fenyl α-D-galaktopyranózu a L-pyrrolidonylfluoroanilid. Poté následovala detekce vzniklých produktů 2-chlorofenolu, fenolu a 3-fluoranilinu. K extrakci těchto těkavých látek bylo použito vlákno s vrstvou 85 μm polyakrylátu. Vyvinutá metodika byla schopna detekovat a identifikovat druhy salmonel během 5 hodin při inkubaci na 37 °C pomocí těchto uvolněných těkavých organických látek [46].

1.2.5.3 Stanovení profilu těkavých látek bílých likérových vín

Profil těkavých látek je důležitým znakem vín, který je závislý mimo jiné na druhu vína, kvašení a procesu stárnutí. Ve víně bylo doposud identifikováno několik set těkavých látek patřících do různých chemických tříd, z nichž nejdominantnější jsou alkoholy a estery, dále karbonylové sloučeniny, kyseliny, terpeny a sloučeniny síry. Stanovení profilu těkavých látek může být rychlou metodou pro klasifikační účely.

Stanovení aromaprofilu a množství těkavých látek metodou HS-SPME bylo realizováno u osmi bílých likérových vín (Jutrzenka, Massandra Krymwejn, Moscatel de Setubal, Riversaltes, Leyenda Sherry Cream, Moscatel Oro, Marsala Superiore Riserva a Offley White Porto). Pro tento účel byla testována různá vlákna, jako jsou PDMS, CAR/PDMS, CAR/DVB/PDMS, PA a DVB/PDMS. Vzorky (20 ml) byly zahřáty na 50 °C po dobu 15 minut. Poté následovala extrakce na vlákno (5-30 minut). Detekce probíhala na plynovém chromatografu s hmotnostní spektrometrií (GC×GC-MS). Látky byly děleny pomocí kolony DB-5MS (25 m × 0,2 mm × 0,33 μm, Agilent Technologies). Sekundární kolona byla středně polární BPX-50 (1,090 m × 0,1 mm × 0,1 μm, SGE, Austrálie). Teplota nástřiku byla 260 °C, teplotní program byl následující: počáteční teplota byla 40 °C

(udržována 1 minutu), poté se zvyšovala na 250 °C rychlostí 10 °C za minutu. Teplota sekundárního programu byla o 30 °C vyšší (stoupala ze 70 °C na 280 °C). Jako nosný plyn byl využit dusík s průtokem 0,8 ml za minutu. Jako optimální podmínky byly zvoleny: 20 minutová extrakce a vlákno CAR/DVB/PDMS. Všechna analyzovaná vína obsahovala různá množství těkavých sloučenin. Nejvyšší množství těkavých látek obsahovalo víno Riversaltes. Nejméně těkavých látek bylo zaznamenáno u vína Muscat Oro [47].

1.2.5.4 Stanovení reziduí pesticidů v kokosové vodě

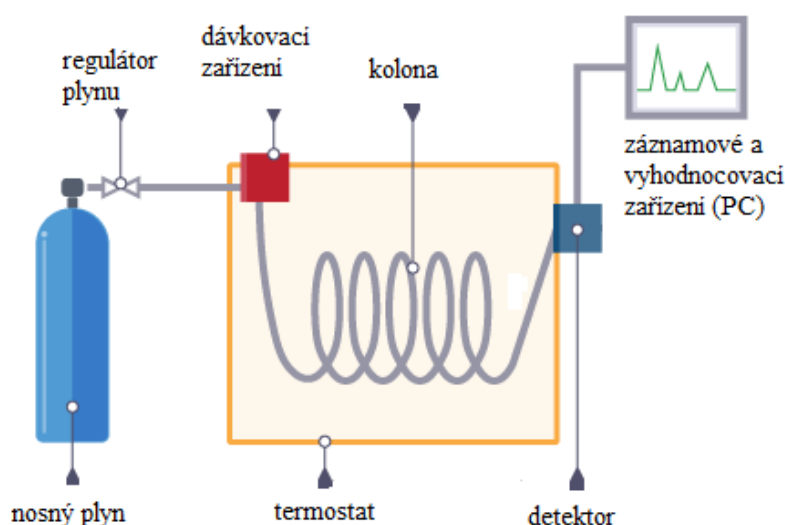
Kokosová voda je přírodní izotonický nápoj. Je to bohatý zdroj cukrů, solí, vitamínů, minerálů a aminokyselin.

Cílem této studie bylo navrhnout jednoduchou a účinnou metodu pro stanovení reziduí pesticidů z různých chemických tříd (organofosfáty, organochlorové pesticidy, karbamáty atd.) ve vzorcích průmyslově ošetřených a přírodních kokosových vod. Byla použita mikroextrakce jednou kapkou (SDME) s následnou plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Separace pesticidů byla provedena na kapilární koloně Restek Rtx®-1MS (30 m × 0,25 mm ID; tloušťka filmu 0,25 μm). Použitý nosný plyn byl helium s průtokem 1 ml/min. Teplota nástřiku byla 300 °C, teplotní program byl následující: 60 °C po dobu jedné minuty, poté rostl na 200 °C rychlostí 25 °C/min, dále rostl na 280 °C rychlostí 10 °C/min, poté rostl na 300 °C rychlostí 5 °C/min, teplota 300 °C byla udržována 1,4 minuty. Optimalizovanými parametry byly: rozpouštědlo (toluen, cyklohexan a izooktan), doba extrakce (10, 20, 30 a 40 min), velikost kapky (0,5, 0,8 a 1 μl), objem vzorku (1,5 a 10 ml), rychlost míchání (bez míchání, 100, 200 a 300 ot./min), okyselení extrakčního média (bez okyselení, H₃PO₄ a HCl) a přídavek soli (bez přídavku a přídavek 10% NaCl). Finální podmínky mikroextrakce byly: 10 ml vzorku, 1 μl kapka toluenu jako extrakčního rozpouštědla, doba míchání 30 minut při 200 otáčkách za minutu, okyselení HCl a bez přídavku soli.

Tato metoda umožnila identifikaci a kvantifikaci pesticidů z různých tříd chemických látek. Bylo zjištěno, že vyšší množství pesticidů obsahují kokosové vody, které pocházejí z industrializovaného zemědělství oproti přírodním kokosovým vodám [48].

1.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) je kvalitativní i kvantitativní separační metoda, při které dochází k dělení složek, které jsou obsaženy ve vzorku. Složky vzorku jsou děleny mezi stacionární a mobilní fázi, které jsou navzájem nemísitelné. Vzorky pro plynovou chromatografii mohou být v plynné nebo kapalně fázi, ale aby mohly být transportovány, musí se rychle přeměnit na plyn. Vzorek je dávkován do proudu nosného plynu (mobilní fáze) a jednotlivé složky jsou zachytávány v koloně, která obsahuje stacionární fázi. Jednotlivé složky analyzovaného vzorku jsou při pohybu kolonou absorbovány kapalinou nebo adsorbovány na povrchu tuhých částic stacionární fáze. Transport analytu od začátku ke konci kolony je určen lineární rychlostí mobilní fáze v koloně. Čas, za který projde mobilní fáze od začátku ke konci kolony, se nazývá jako mrtvý čas. Plynová chromatografie je vhodná pro organické látky s teplotou varu do 400 °C, důležité je, aby se látky při vypařování nerozkládaly. Mohou být analyzovány i anorganické látky, ale pouze ty, které jsou těkavé. Netěkavé sloučeniny lze též analyzovat převedením na těkavější deriváty derivatizací [49-52]. Na obrázku 9 je zobrazeno schéma plynového chromatografu.



Obrázek 9: Schéma plynového chromatografu [53]

Zdrojem nosného plynu je tlaková lahev obsahující argon, dusík, helium nebo vodík. Plynový chromatograf je vybaven regulačním systémem, který zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu. Termostaty zajišťují vysokou teplotu v dávkovači, koloně a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Nástřík do dávkovacího zařízení se provádí injekční stříkačkou (0,1-10 μ l) přes pryžové septum. První

technika nástřiku se nazývá do kolony (on column), při které se dávkuje 1-10 μl vzorku do náplňových kolon, horní část kolony je zahřívána na teplotu o 10 až 30 $^{\circ}\text{C}$ nižší než je teplota varu rozpouštědla, po zhruba 30 sekundách se teplota prudce zvýší, aby došlo k odpaření vzorku. Druhou technikou je nástřik pomocí děliče toku (split injection), používá se pro koncentrované vzorky, kdy se část musí oddělit, do kolony se dostává pouze 0,1-10 % z nástřikovaného množství. Poslední technikou je nástřik bez děliče toku (splitless injection), který je vhodný pro stopovou analýzu [49].

1.3.1 Typy kolon v plynové chromatografii

Kolony v plynové chromatografii se rozdělují na náplňové a kapilární. U kapilárních kolon je stacionární vrstva o tloušťce 0,1-1 μl nanese přímo na stěny kolon a u náplňových je stacionární fáze nanese na indiferentní nosiče, kterými je kolona vyplněna. Náplňové kolony jsou nejčastěji zhotoveny z nerezové oceli nebo skla, délka kolony je v rozmezí 30-400 cm s vnitřním průměrem 2-4 mm, mikronáplňové kolony mají vnitřní průměr menší než 1 mm. Náplňové kolony mají vyšší kapacitu než kapilární kolony. Jako adsorpční náplně se používá silikagel, grafitizované saze nebo alumina, jako nosiče pro kapalnou fázi se používají křemeliny. U kapilárních kolon slouží vnitřní stěna kapiláry jako nosič pro kapalnou stacionární fázi. Tyto kolony jsou zhotoveny z taveného křemene a jsou potaženy vrstvou polyamidu, díky kterému je kolona pružná a méně křehká. Délka kapilární kolony se pohybuje od 15 do 60 metrů. Dle způsobu uložení SF v kapiláře se dělí na tři typy: WCOT – kapalina je zakotvena přímo na stěnách kapiláry; SCOT – kapalina je zakotvená na nosiči, který je zachycený na stěnách kapiláry; PLOT – pórovitý adsorbent je zachycen na stěnách kapiláry. Volba stacionární fáze je závislá na charakteru a rozsahu bodů varu složek analyzovaného vzorku. Nejpoužívanější fáze jsou na bázi polysiloxanů a Carbowax jako silně polární SF [50, 52, 54, 55]. Přehled SF a jejich použití je zobrazen v tabulce 9.

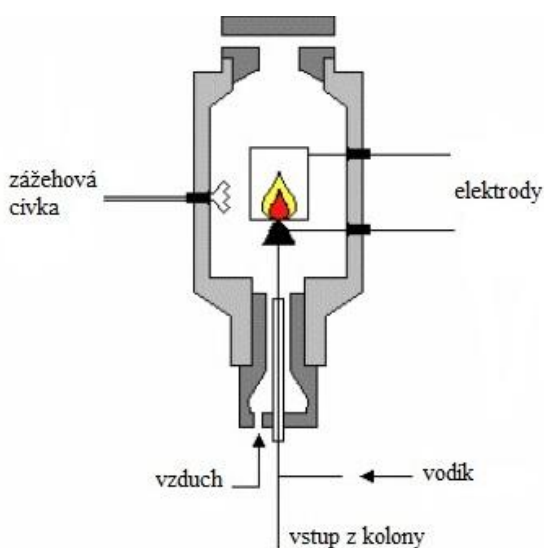
Tabulka 9: Typy stacionárních fází pro GC [50]

Typ stacionární fáze	Max. teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Využití
polyethylenglykol	250	volné kyseliny, alkoholy, glykoly
polydimethylsiloxan	350	nepolární sloučeniny
poly(fenylmethyl)siloxan	250	drogy, steroidy, pesticidy
poly(trifluoropropyldimethyl)siloxan	200	chlorované aromatické uhlovodíky
poly(dikvanoallyldimethyl)siloxan	240	pryskyřice, volné kyseliny, alkoholy

1.3.2 Plamenový ionizační detektor

Detektor je konstrukční část plynového chromatografu, ve kterém je fyzikálně-chemická vlastnost vzorku převedena na měřitelný signál, který je zaznamenáván v závislosti na čase. Vývoj velmi citlivých, robustních a snadno použitelných detektorů pro GC výrazně přispěl k rychlému růstu oblíbenosti této metody pro analýzu komplexních vzorků. V průběhu let se nejpoužívanějšími detektory staly tepelně-vodivostní, plamenový ionizační a detektor elektronového zachytu. Jejich popularita vychází z jejich jednoduchosti a robustnosti, spolu s jejich přijatelnou citlivostí pro velké množství aplikací [49, 52, 55].

Plamenový ionizační detektor neboli FID (Flame Ionization Detector) je nejpoužívanějším detektorem již od svého zavedení v roce 1958. FID je citlivý, univerzální a destruktivní. K ionizaci molekul eluovaných z kolony dochází ve vodíko-vzduchovém plameni, který hoří mezi dvěma elektrodami. Je tvořen hořákem, do kterého ústí výstup z kolony, přívod vodíku a vzduchu. Nad hořákem jsou umístěny elektrody, které zaznamenávají ionty a elektrony vzniklé při hoření vodíku a měřeného analytu. Schéma FID detektoru je znázorněno na obrázku 10. Molekuly organických látek, které se dostanou do plamene, jsou štěpeny na ionty nebo radikály, které se na první elektrodě nabijí na určitý potenciál a jsou přitahovány druhou elektrodou, které svůj náboj odevzdávají. Vzniklý ionizační proud, který mezi elektrodami protéká, je přímo úměrný počtu iontů a zaznamenává se. FID může být použit i pro stopovou analýzu ve všech analytických odvětvích [52, 54, 56].



Obrázek 10: Plamenový ionizační detektor [57]

2 Experimentální část

2.1 Použité vzorky piva

V této diplomové práci bylo analyzováno 14 vzorků piv od 7 různých značek. Od každé značky bylo zakoupeno alespoň jedno pivo chmelené za studena a druhé chmelené klasicky. Výjimkou bylo pivo značky Mordýř, od které bylo analyzováno pouze jedno pivo. Přehled všech zakoupených vzorků piv spolu s údaji výrobce o druhu a obsahu alkoholu jsou uvedeny v tabulce 10 a na obrázku 11.

Tabulka 10: Vzorky piva pro analýzu

Značka	Výrobce	Druhy
Bakalář	Tradiční pivovar v Rakovníku a.s. Rakovník	Světlý ležák (4,9 % obj.) Světlý ležák za studena chmelený (5,2 % obj.) Nealkoholický za studena chmelený (0,5 % obj.)
Krušovice	Heineken Česká republika a.s. Krušovice	Královská dvanáctka (5,0 % obj.) Ležák za studena chmelený (4,8 % obj.)
Postřižinské	Pivovar Nymburk spol. s.r.o. Nymburk	Francinův ležák (5,1 % obj.) Jubilejní Hrabalův ležák (5,8 % obj.)
Svijany	Pivovar Svijany a.s. Svijany	Svijanský máz (4,8 % obj.) Svijanský rytíř (5,0 % obj.)
Primátor	Primátor a.s. Náchod	Premium (6,5 % obj.) India Pale Ale (5,0 % obj.)
Lobkowicz	Pivovar Lobkowicz Group a.s. Praha	Premium ležák (4,7 % obj.) Premium Ale (4,4 % obj.)
Mordýř	Pivovar Mordýř s.r.o. Dolní Ředice	New England IPA (6,3 % obj.)



Obrázek 11: Analyzované vzorky piva

2.2 Použité chemikálie

- Linalool 97 % – Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, ČR
- Ethanol 96 % – Lach-Ner spol. s r.o., Neratovice, ČR
- Methanol 99,9 % – Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, ČR
- Amylalkohol – Lach-Ner spol. s r.o., Neratovice, ČR
- Hexanol – Reachim, Moskva, Rusko
- p-xylen – Merck KGaA, Darmstadt, Německo
- 1-dekanol – Sigma-Aldrich s.r.o., Steinheim, Německo
- 1-undekanol – Sigma-Aldrich s.r.o., Steinheim, Německo
- 1-dodekanol – Sigma-Aldrich s.r.o., Steinheim, Německo
- Vodík 3.0 – čistota 99,9 %, Linde Gas a.s., Praha, ČR
- Centrální rozvod dusíku a vzduchu – Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR
- Destilovaná voda – Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR

2.3 Použitá instrumentace a software

- Plynový chromatograf Hewlett Packard 5890 – Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA (GC I)
- Plynový chromatograf Hewlett Packard 5890 Series II (GC II)
- Mikrostříkačka Hamilton s šikmým hrotem, objem 10 µl - Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko
- Čistič stříkaček Hamilton – Reno, NV, USA
- Automatické mikropipety – Biohit Oyj, Helsinky, Finsko
- Vlákna se stacionární fází 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 75 µm CAR/PDMS, 65 µm PDMS/DVB a 100 µm PDMS – Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA
- SPME držák pro ruční vzorkování – Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA
- Vodní lázeň Julabo 5 – Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Německo
- Třepačka Vibrax 100 – Heidolph Instruments GmbH & Co, KG, Schwabach, Německo
- CSW32 – Chromatography Station for windows – DataApex, Praha, ČR
- STATISTICA 12 CZ – Dell Software, Praha, ČR

2.4 Podmínky separace na plynovém chromatografu

Zvolené parametry a podmínky pro separaci látek na plynovém chromatografu jsou vypsány v tabulce 11.

Tabulka 11: Podmínky separace pro GC

Parametry kolony	HP 5-ms, délka 30 m, vnitřní průměr 0,32 mm stacionární fáze 5% fenyl-methylsiloxan s filmem o tloušťce 1 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)
Používané teploty	teplotní program kolony: 55 °C po dobu 3 minut, poté nárůst rychlostí 6 °C/min na teplotu 250 °C, která byla udržována po dobu 10 minut, teplota dávkovacího zařízení (splitovací poměr 1:2) i detektoru byla 250 °C
Nosný plyn	dušík z centrálního rozvodu s přetlakem na hlavě kolony 30 kPa
Palivo pro FID	vodík z tlakové lahve s průměrným průtokem 30 ml/min
Oxidovadlo FID	tlakový vzduch z centrálního rozvodu s průměrným průtokem 400 ml/min

2.5 Zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti nástříku

Meze detekce a meze stanovitelnosti byly stanoveny pomocí kalibrační křivky. Mez detekce je koncentrace, kdy látka vyvolá odezvu (S) měřicího přístroje větší, než je trojnásobek úrovně šumu (N) pozadí, tedy $S/N = 3$. Mez stanovitelnosti je koncentrace, kdy látka vyvolá odezvu (S) měřicího přístroje větší, než je desetinásobek úrovně šumu (N) pozadí, tedy $S/N = 10$.

Kalibrační závislost byla připravena následovně: ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml v 96% ethanolu byly připraveny kalibrační roztoky do 5 ml odměrných baněk dle tabulky 12, každý kalibrační bod byl proměřen třikrát a poté byl zhotoven průměr ploch píků a průměr výšek píků. Dávkovaný objem do plynového chromatografu byl 1 μ l mikrostříkačnou Hemilton.

Tabulka 12: LOD a LOQ nástříku (n = 3)

Koncentrace [mg/ml]	Průměrná plocha píků [mV·s]	Průměrná výška píků [mV]
0,01	72,87	10,08
0,05	300,98	47,31
0,10	553,17	93,23
0,15	871,72	149,18
0,20	1243,16	215,27
0,25	1520,42	265,31
0,30	1884,93	332,41

2.6 Optimalizace metody headspace mikroextrakce jednou kapkou

Do extrakčních nádobek byly nadávkovány roztoky o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml v 5% methanolu. Inkubace byla prováděna 30 minut ve vodní lázni na určitou teplotu. Jehla mikrostříkačky byla skrze septum umístěna nad hladinu kapaliny a extrakce linaloolu byla prováděna do 2 μ l kapky amylalkoholu. Po extrakci byla kapka amylalkoholu vtažena zpět do mikrostříkačky a nadávkována do plynového chromatografu. Optimalizované veličiny byly teplota inkubace, čas extrakce a objem vzorku (viz tabulka 13). Finální podmínky byly vyhodnoceny programem Statistica metodou Spline a byly následující: inkubace při 90 °C, 1,5 minuty dlouhá extrakce a 10 ml vzorku.

Tabulka 13: Podmínky pro extrakce HS-SDME

Pokus č.	Teplota [°C]	Čas [min]	Objem [ml]
1	52	5	5
2	60	3	3
3	60	3	7
4	60	7	3
5	60	7	7
6	70	5	5
7	70	5	5
8	70	1,4	5
9	70	8,6	5
10	70	5	1,4
11	70	5	8,6
12	70	5	5
13	70	5	5
14	80	3	3
15	80	3	7
16	80	7	3
17	80	7	7
18	88	5	5

2.7 Kalibrace pro metodu headspace mikroextrakce jednou kapkou

Do odměrných baněk o objemu 50 ml byly připraveny kalibrační roztoky ze zásobního roztoku o koncentraci 0,01 mg/ml v 5% methanolu (viz tabulka 14). Z těchto kalibračních roztoků bylo odměřeno 10 ml. Tyto nádoby byly inkubovány po dobu 30 minut při 90 °C. Jehla mikrostříkačky byla skrze septum umístěna nad hladinu kapaliny, kde byla kapka rozpouštědla udržována u hrotu mikrostříkačky. Extrakce linaloolu probíhala po dobu 1,5 minuty do 2 µl amylalkoholu. Extrakt byl nadávkován do plynového chromatografu.

Tabulka 14: Kalibrace metody HS-SDME (n = 3)

Koncentrace [mg/ml]	Průměrná plocha píků [mV·s]	Průměrná výška píků [mV]
$5 \cdot 10^{-5}$	105,75	28,77
$1 \cdot 10^{-4}$	166,37	46,16
$2 \cdot 10^{-4}$	296,29	82,83
$3 \cdot 10^{-4}$	428,04	118,11
$4 \cdot 10^{-4}$	571,89	156,52
$8 \cdot 10^{-4}$	998,80	274,12

2.8 Optimalizace metody headspace mikroextrakce tuhou fází

Do extrakčních nádobek byly nadávkovány roztoky o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml v 5% methanolu. K optimalizaci byla použita čtyři vlákna, která jsou vypsána v tabulce 15 a znázorněna na obrázku 12.

Tabulka 15: Použitá vlákna pro metodu HS-SPME

Barevné označení	Sorpční vrstva	Kondicionace
šedé	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	270 °C, 1 h
černé	75 μ m CAR/PDMS	300 °C, 0,5 h
modré	65 μ m PDMS/DVB	250 °C, 0,5 h
červené	100 μ m PDMS	250 °C, 0,5 h



Obrázek 12: Vlákna a držák jehly pro metodu HS-SPME

Ochranná jehla byla skrze septum umístěna nad hladinu kapaliny, poté bylo vysunuto vlákno a byla provedena extrakce linaloolu. Následně byla jehla vložena do plynového chromatografu, kde vlákno setrvalo 2 minuty. Optimalizované veličiny byly teplota během extrakce, čas extrakce a objem vzorku (viz tabulka 16), tento experiment (optimalizace) byl proměřen všemi vlákny. Finální podmínky byly vyhodnoceny programem Statistica metodou Spline.

Tabulka 16: Podmínky pro extrakce HS-SPME

Pokus č.	Teplota [°C]	Čas [min]	Objem [ml]
1	52	30	5
2	60	45	3
3	60	15	3
4	60	45	7
5	60	15	7
6	70	30	8,6
7	70	3,2	5
8	70	30	5
9	70	56,8	5
10	70	30	5
11	70	30	5
12	70	30	1,4
13	70	30	5
14	80	15	7
15	80	45	7
16	80	15	3
17	80	45	3
18	88	30	5

Následně byla tato čtyři vlákna porovnána při zjištěných optimálních podmínkách a proměřeny na 2 různých plynových chromatogramech (GC I a GC II). Extrahován a analyzován byl standardní roztok linaloolu o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml v 5% methanolu.

Podmínky, které byly vyhodnoceny programem Statistica jako optimální, byly aplikovány na reálný vzorek piva Svijanský máz kvůli prověření vlivu matrice na podmínky extrakce. K měření bylo použito černé a šedé vlákno, jejichž odezva byla v porovnání všech čtyř vláken, nejvyšší. K analýze byl dále používán plynový chromatogram GC I. Optimalizované veličiny byly teplota extrakce, čas extrakce a objem vzorku, viz tabulka 16. Finální podmínky pro černé vlákno (extrakce s matricí), které bylo dále používáno, byly: 2 ml vzorku, doba extrakce jedna hodina při 50 °C.

2.9 Kalibrace pro metodu headspace mikroextrakce tuhou fází

Do odměrných baněk o objemu 25 ml byly připraveny kalibrační roztoky ze zásobního roztoku o koncentraci 0,01 mg/ml v 5% metanolu, viz tabulka 17. Z těchto kalibračních roztoků byly odpipetovány 2 ml do extrakčních nádobek. Extrakční nádobka byla umístěna do vodní lázně vyhřáté na 50 °C a ochranná jehla byla skrze septum nádobky umístěna nad hladinu kapaliny, poté bylo vysunuto 75 µm CAR/PDMS vlákno (černé) a byla provedena

extrakce linaloolu, která probíhala po dobu jedné hodiny. Poté byla jehla vložena do plynového chromatografu, kde vlákno setrvalo dvě minuty.

Tabulka 17: Kalibrace metody HS-SPME (n = 3)

Koncentrace [ng/ml]	Průměrná plocha píků [mV·s]	Průměrná výška píků [mV]
16	57,38	13,68
28	124,04	27,85
60	316,23	70,32
88	426,28	96,47
120	612,54	135,39
160	871,47	187,09

Dále byla provedena kalibrace s matricí, kde bylo využito pivo Svijanský Máz k ředění standardu linaloolu. Do extrakčních nádobek byly odměřeny 2 ml piva a k tomu určité množství standardu o koncentraci 0,01 mg/ml, viz tabulka 18. Nádobka byla vložena do vodní lázně vyhřáté na 50 °C. Jehla mikrostříkačky byla skrze septum umístěna nad hladinu kapaliny a bylo vysunuto 75 µm CAR/PDMS vlákno (černé) po dobu jedné hodiny. Připravené kalibrační roztoky byly proměřeny na plynovém chromatografu.

Tabulka 18: Kalibrace s matricí metody HS-SPME (n = 3)

Koncentrace [ng/ml]	Průměrná plocha píků [mV·s]	Průměrná výška píků [mV]
25	148,62	34,05
50	227,32	54,61
100	361,53	96,81
150	551,47	138,12
200	685,19	188,82

2.10 Analýza reálných vzorků piv

K analýze reálných vzorků piv bylo vybráno 14 vzorků sedmi různých značek, kompletní seznam je vypsán v tabulce 10. Všechny vzorky byly před analýzou zbaveny CO₂ pomocí třepačky Vibrax 100 při 850 ot/min po dobu 30 minut. Poté následovala extrakce tuhou fází. 2 ml vzorku piva byly odměřeny do extrakčních nádobek. Extrakční nádobka byla

umístěna do vodní lázně vyhřáté na 50 °C a ochranná jehla byla skrze septum nádoby umístěna nad hladinu kapaliny, poté bylo vysunuto 75 µm CAR/PDMS vlákno (černé) a byla provedena extrakce linaloolu, která probíhala po dobu jedné hodiny, znázorněno na obrázku 13. Poté byla jehla vložena do plynového chromatografu, kde vlákno setrvalo dvě minuty. Dále byla extrakce provedena se standardním přídatkem, kdy bylo ke 2 ml vzorku piva před extrakcí přidáno 5 µl standardu o koncentraci 0,01 mg/ml.



Obrázek 13: Aparatura metody HS-SPME

3 Výsledky a diskuze

3.1 Zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti nástříku

Z průměrných hodnot ploch a výšek byly sestrojeny kalibrační závislosti na koncentraci linaloolu, viz obrázky 14 a 15. Dále byla pomocí rovnice regrese vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti, viz tabulka 19. LOD byl vypočten pomocí vzorce (1) a LOQ pomocí vzorce (2).

$$\text{LOD} = \frac{(3 \cdot s_a) - q}{k} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{(10 \cdot s_a) - q}{k} \quad (2)$$

Tabulka 19: Zjištění LOD a LOQ nástříku

Rovnice regrese	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
A: $y = 6257,24x - 26,49$	0,017	0,046
h: $y = 1114,44x - 9,79$	0,023	0,057

s_a ... směrodatná odchylka úseku

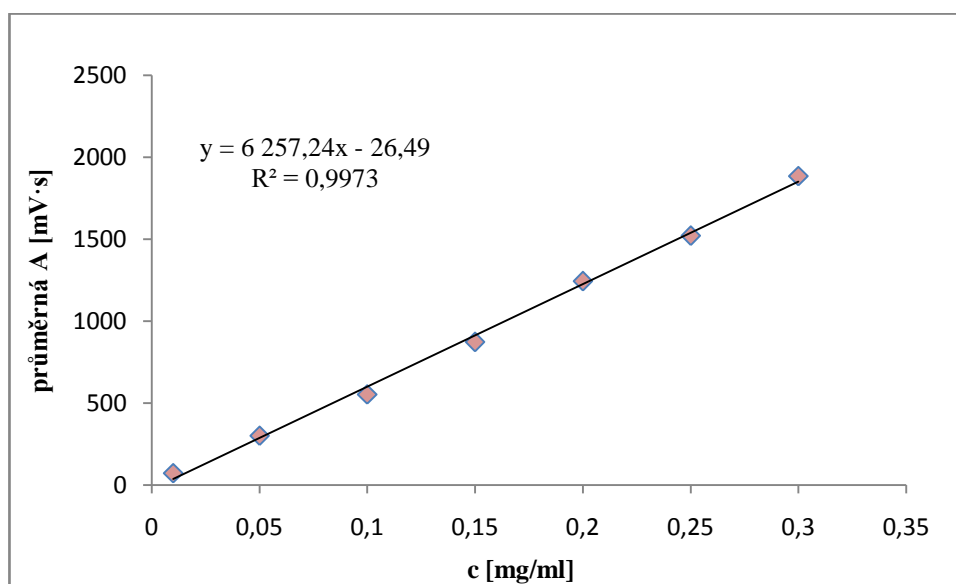
q ... úsek rovnice regrese

k ... směrnice rovnice regrese

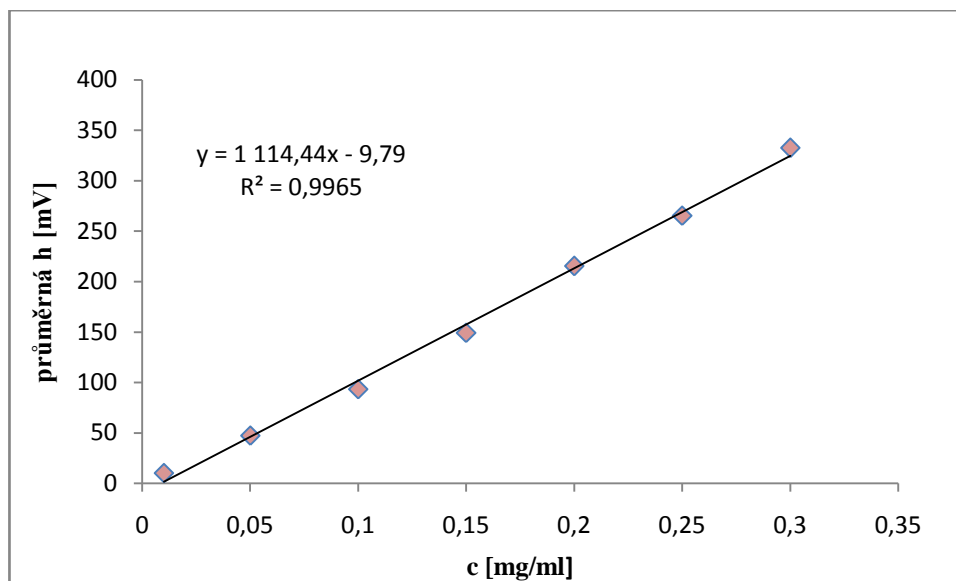
A ... plocha píku [mV·s]

h ... výška píku [mV]

c ... koncentrace linaloolu [mg/ml]



Obrázek 14: Závislost průměrné plochy píku (A) na koncentraci linaloolu (c)



Obrázek 15: Závislost průměrné výšky píku (h) na koncentraci linaloolu (c)

3.2 Výběr extrakčního rozpouštědla pro headspace mikroextrakci jednou kapkou

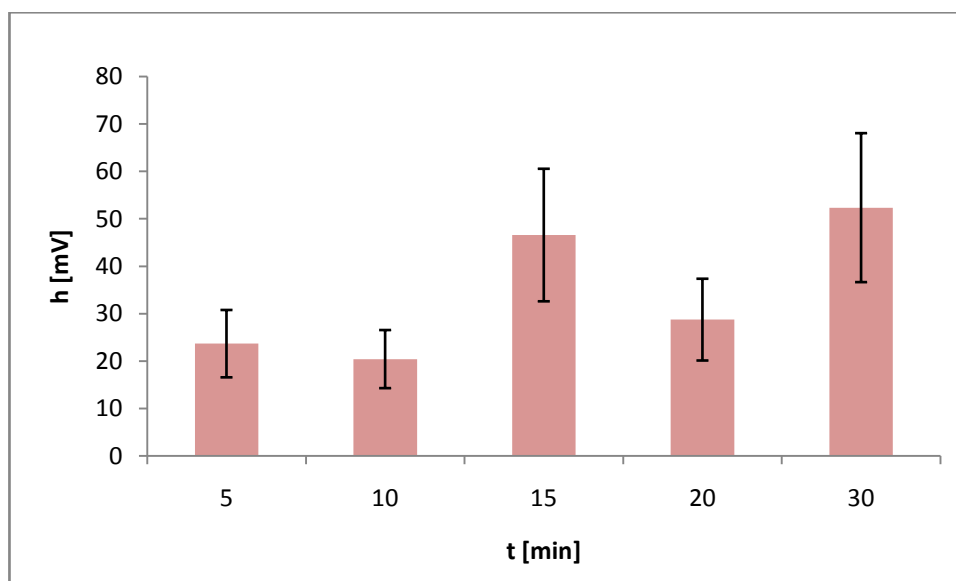
Nejprve byly proměřeny retenční časy vybraných extrakčních rozpouštědel (amylalkohol, p-xylen, hexanol, 1-dekanol, 1-undekanol a 1-dodekanol), které jsou vypsány v tabulce 20. Inkubace roztoku linaloolu v 5% methanolu byla prováděna 30 minut při 70 °C ve vodní lázni, extrakce linaloolu byla prováděna 2 μ l jednotlivých zkoušených rozpouštědel po dobu 1, 2, 4, 6 a 8 minut. Po extrakci byla kapka extrakčního rozpouštědla vtažena zpět do mikrostříkačky a nadávkována do plynového chromatografu. Tyto Chromatogramy jsou uvedeny v příloze I. Rozpouštědla, která měla retenční čas vyšší než linalool (21,23 min) způsobovala destrukci píku linaloolu. Při použití hexanolu se vyskytoval koeluuující pík v blízkosti píku linaloolu. Rozpouštědlo p-xylen bylo nestabilní (rychle se odpařovalo) při dobách extrakce vyšších než 2 minuty. Jako nejvhodnější se jevílo rozpouštědlo amylalkohol, které vydrželo extrakci delší než 6 minut (neodpařovalo se) a neodtrhávalo se od hrotu mikrostříkačky.

Tabulka 20: Retenční časy zkoušených extrakčních rozpouštědel

Rozpouštědlo	Retenční čas [min]
amylalkohol	12,20
p-xylen	14,07
hexanol	15,40
1-dekanol	26,70
1-undekanol	28,79
1-dodekanol	31,28

3.3 Zjištění doby inkubace headspace mikroextrakce jednou kapkou

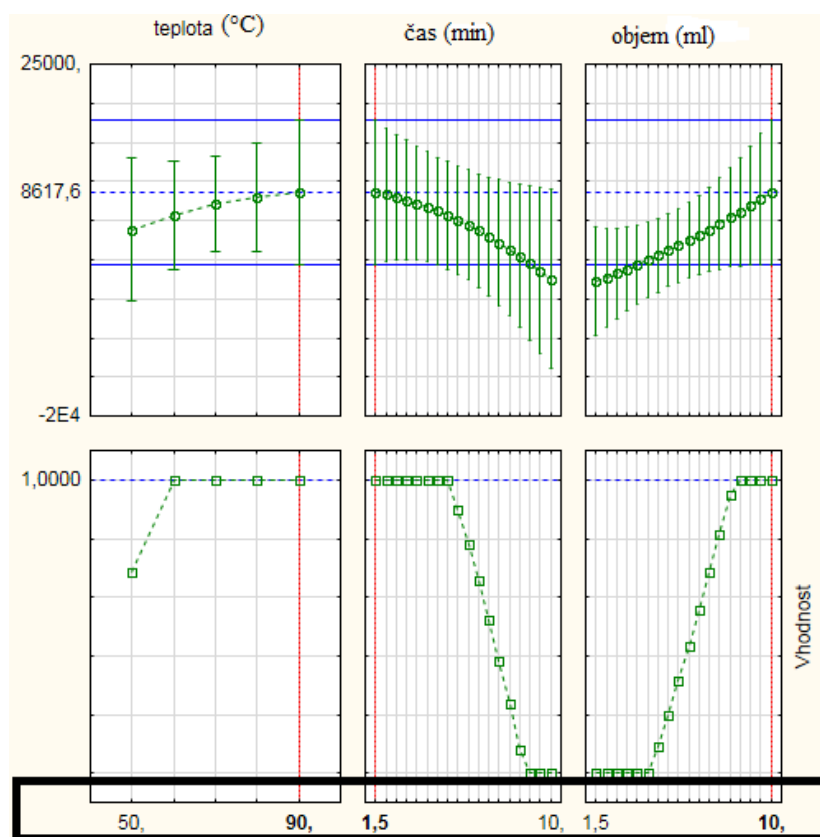
Doba inkubace byla proměřována u roztoků o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml v 5% methanolu ve skleněné extrakční nádobce o objemu 20 ml, opatřené uzavíratelným víčkem obsahující polytetrafluoretylen/silikonové septum, mikrostříkačka Hemilton byla umístěna tak, aby vytlačená kapka amylalkoholu byla nad hladinou kapaliny. Inkubace byla prováděna 5, 10, 15 a 30 minut při 70 °C ve vodní lázni, extrakce linaloolu byla prováděna 2 μ l amylalkoholu po dobu 5 minut. Po extrakci byla kapka amylalkoholu vtažena zpět do mikrostříkačky a nadávkována do plynového chromatografu. Poté byl sestaven sloupcový graf závislosti výšky píku inkubovaného vzorku na době inkubace (obrázek 16). Nejvyšší odezva byla zjištěna u 30 minutové doby inkubace, proto byla tato doba zvolena jako vhodná.



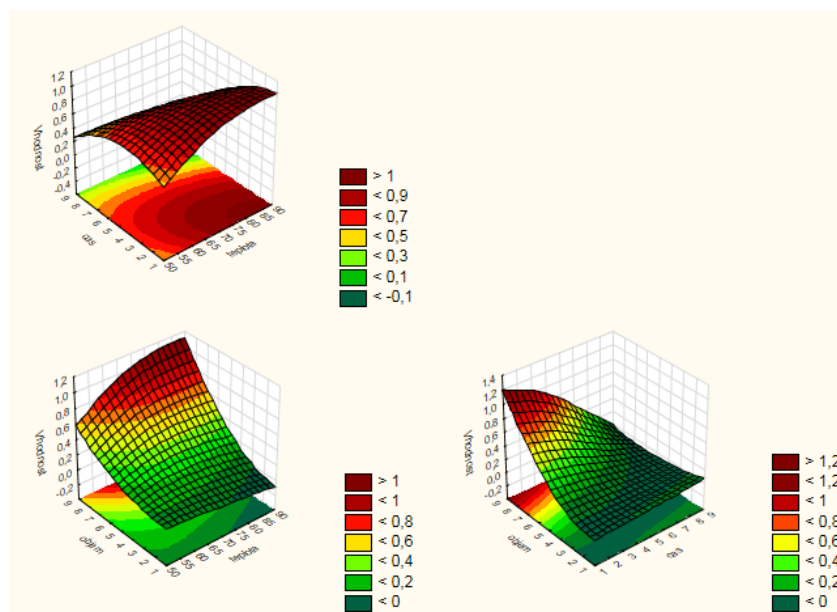
Obrázek 16: Závislost výšky píku na době inkubace (n = 3)

3.4 Optimalizace metody headspace mikroextrakce jednou kapkou

Optimalizace byla provedena na základě 18 měření, kde se měnily různé teploty během inkubace (52, 60, 70, 80 a 88 °C), doby extrakce (1,4, 3, 5, 7 a 8,6 min) a objemy inkubovaného vzorku (1,4, 3, 5, 7 a 8,6 ml) v různých kombinacích, viz tabulka 13 kapitola 2.6. Optimální podmínky byly vyhodnoceny programem Statistica metodou Spline pomocí naměřených ploch a výšek píků. Finální podmínky byly: 10 ml vzorku, inkubace při 90 °C po dobu 30 minut a následná 1,5 minutová extrakce do 2 μ l kapky amylalkoholu. Na obrázcích 17 a 18 je zobrazeno vyhodnocení podmínek metodou Spline.



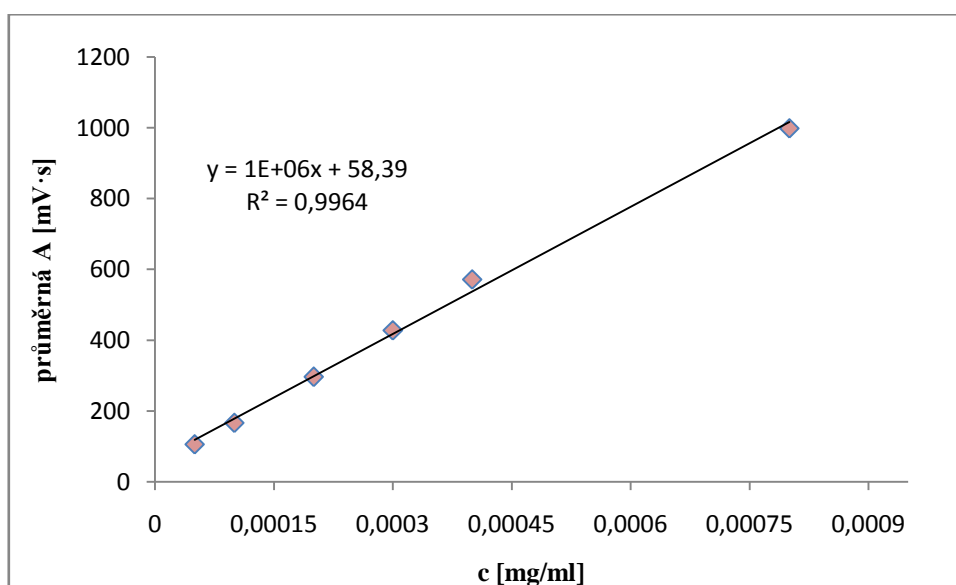
Obrázek 17: Vyhodnocení podmínek pro HS-SDME



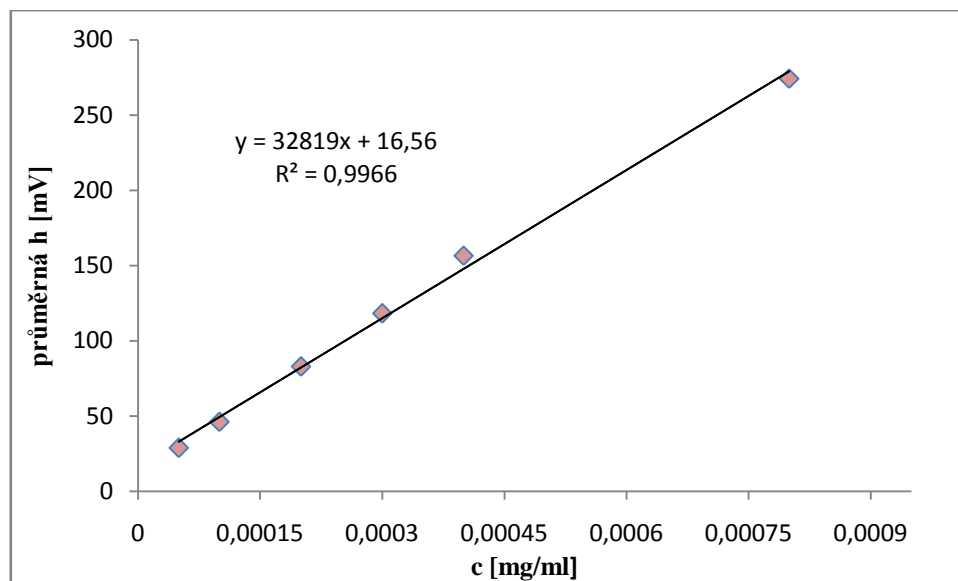
Obrázek 18: Odezvové vhodnostní profily podmínek HS-SDME

3.5 Kalibrace metody headspace mikroextrakce jednou kapkou

Optimální podmínky byly aplikovány na kalibrační řadu. Bylo proměřeno 6 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí od $5 \cdot 10^{-5}$ do $8 \cdot 10^{-4}$ mg/ml v 5% methanolu. Z naměřených hodnot byly sestrojeny závislosti ploch a výšek píků na koncentraci jednotlivých kalibračních bodů, viz obrázky 19 a 20.



Obrázek 19: Kalibrační závislost plochy píku (A) na koncentraci linaloolu (c) – HS-SDME



Obrázek 20: Kalibrační závislost výšky píky (h) na koncentraci linaloolu (c) – HS-SDME

Meze detekce a meze stanovitelnosti pro metodu HS-SDME byly vypočteny z rovnice regrese pomocí vzorců (1) a (2). LOD a LOQ jsou vypočteny v tabulce 21.

Tabulka 21: Zjištění LOD a LOQ metody HS-SDME

Rovnice regrese	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
A: $y = 1,20 \cdot 10^6 x + 58,39$	$3,55 \cdot 10^{-5}$	$1,18 \cdot 10^{-4}$
h: $y = 32819x + 16,56$	$3,49 \cdot 10^{-4}$	$1,16 \cdot 10^{-4}$

3.6 Optimalizace metody headspace mikroextrakce tuhou fází

Optimalizace byla provedena pro sadu 18 měření, kdy se měnily různé teploty během extrakce (52, 60, 70, 80 a 88 °C), doba extrakce (3,2; 5, 15, 30, 45 a 56,8 min) a objem extrahovaného vzorku (1,4; 3, 5, 7 a 8,6 ml) v různých kombinacích, viz tabulka 16 kapitola 2.8. Nejprve byl tento experiment proveden se všemi čtyřmi vlákny na standardním roztoku linaloolu a poté byly vyhodnoceny optimální podmínky programem Statistica metodou Spline pomocí naměřených ploch a výšek píků. Optimální podmínky jsou vypsány v tabulce 22. Vhodnostní profily šedého, černého, červeného a modrého vlákna jsou zobrazeny v příloze II.

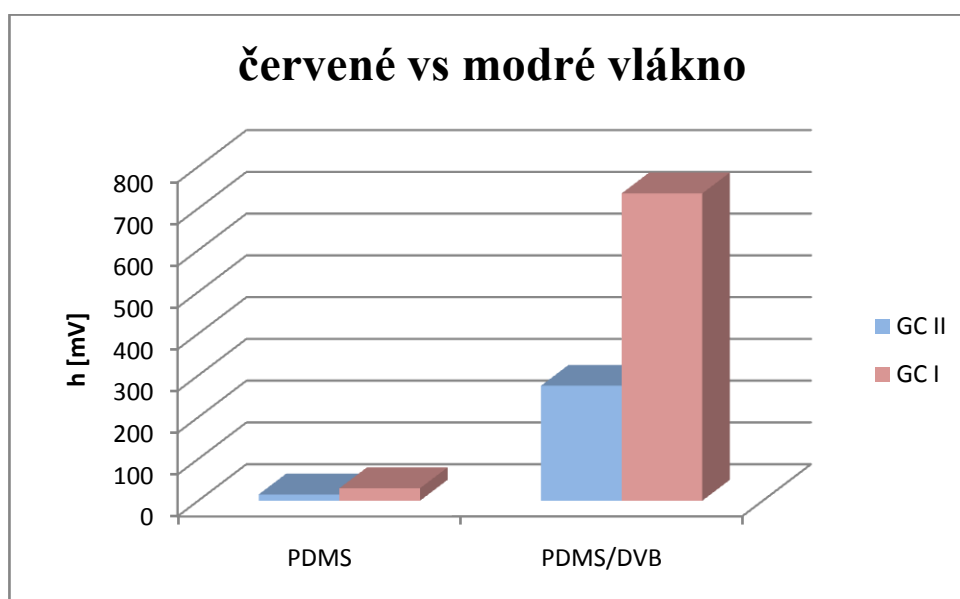
Tabulka 22: Optimální podmínky měření HS-SPME

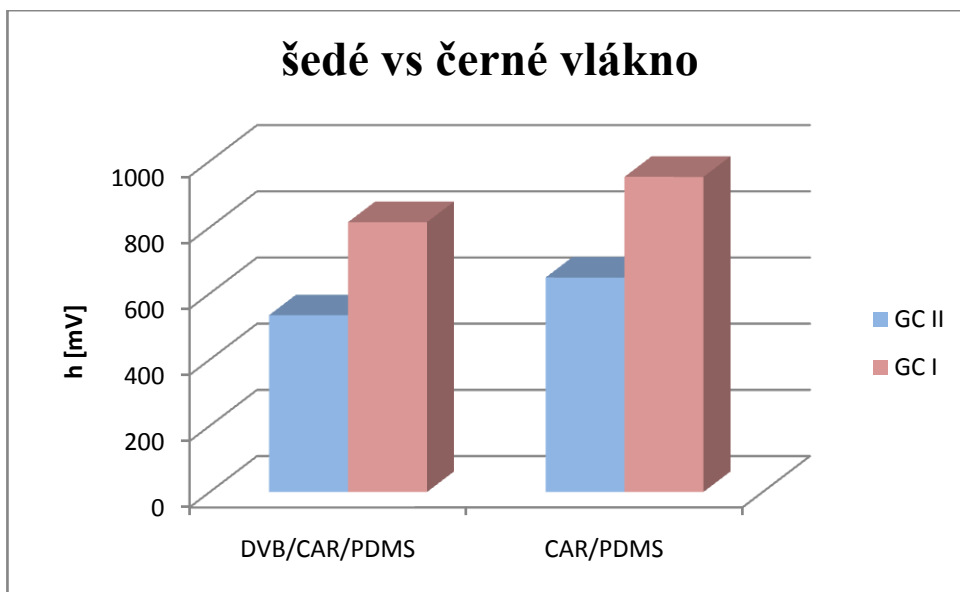
Barevné označení vlákna	Teplota extrakce [°C]	Doba extrakce [min]	Objem vzorku [ml]
šedé	60	60	8
černé	80	60	9
červené	90	3	9
modré	60	60	9

Dále došlo k porovnání těchto čtyř vláken při stanovených optimálních podmínkách na standardu linaloolu. Porovnání probíhalo na dvou různých plynových chromatogramech (GC I a GC II) viz tabulka 23. Z naměřených výšek byly sestaveny sloupcové grafy (obrázky 21 a 22).

Tabulka 23: Porovnání 4 vláken

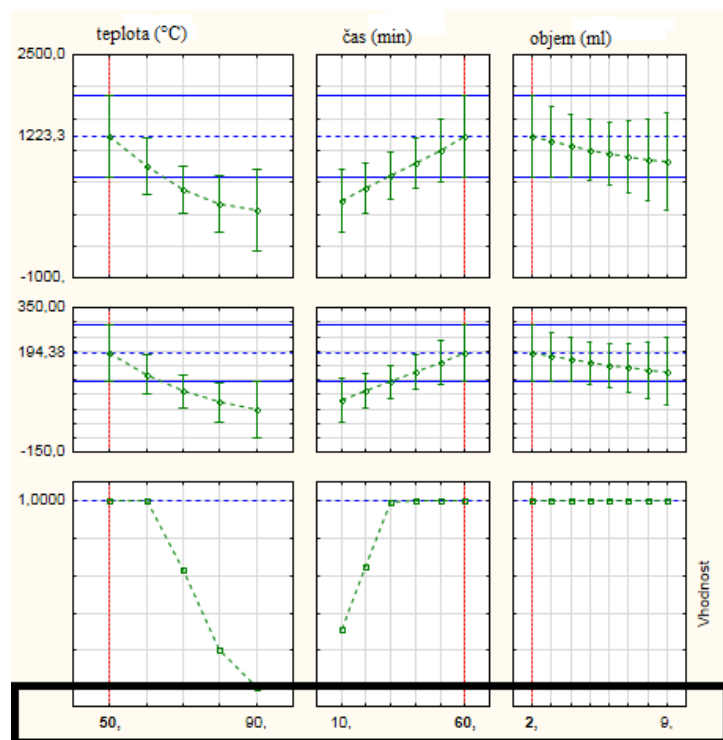
Barevné označení	GC II		GC I	
	A	h	A	h
šedé	2091,554	534,266	3408,342	815,393
černé	2814,319	648,021	3655,328	952,256
červené	58,540	15,026	121,710	29,827
modré	1075,561	275,299	3047,514	735,993

**Obrázek 21:** Porovnání vláken PDMS a PDMS/DVB

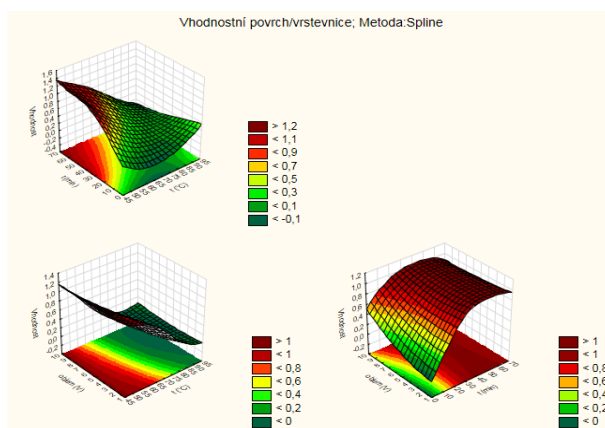


Obrázek 22: Porovnání vláken DVB/CAR/PDMS a CAR/PDMS

Z grafů je patrné, že největší odezvu má černé a šedé vlákno na plynovém chromatografu GC I. Další měření tedy probíhalo s vláknem CAR/PDMS a DVB/CAR/PDMS, jejichž odezva byla nejvyšší na plynovém chromatografu GC I. Optimální podmínky černého a šedého vlákna, viz tabulka 22, byly aplikovány na reálný vzorek piva Svijanský máz. Experiment 18 měření byl tedy aplikován na reálný vzorek piva, aby se zjistilo, zda má matrice reálného vzorku vliv na podmínky měření. Podmínky s vlivem matrice pro černé vlákno byly: teplota během extrakce 50 °C, čas extrakce jedna hodina a objem vzorku 2 ml. Tyto podmínky se lišily v porovnání s podmínkami, které byly měřeny na standardu linaloolu. Na obrázcích 23 a 24 je zobrazeno vyhodnocení podmínek metodou Spline.



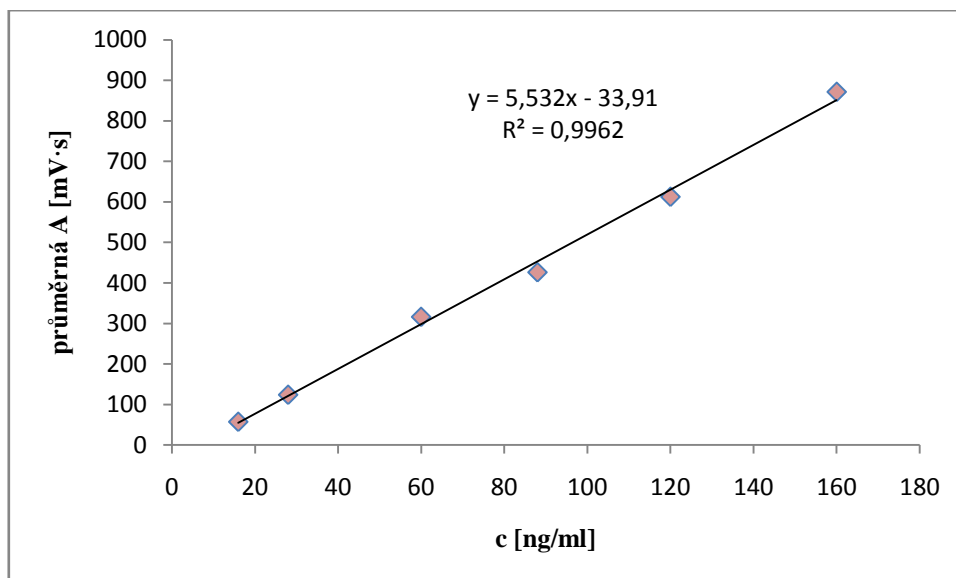
Obrázek 23: Vyhodnocení podmínek pro HS-SPME



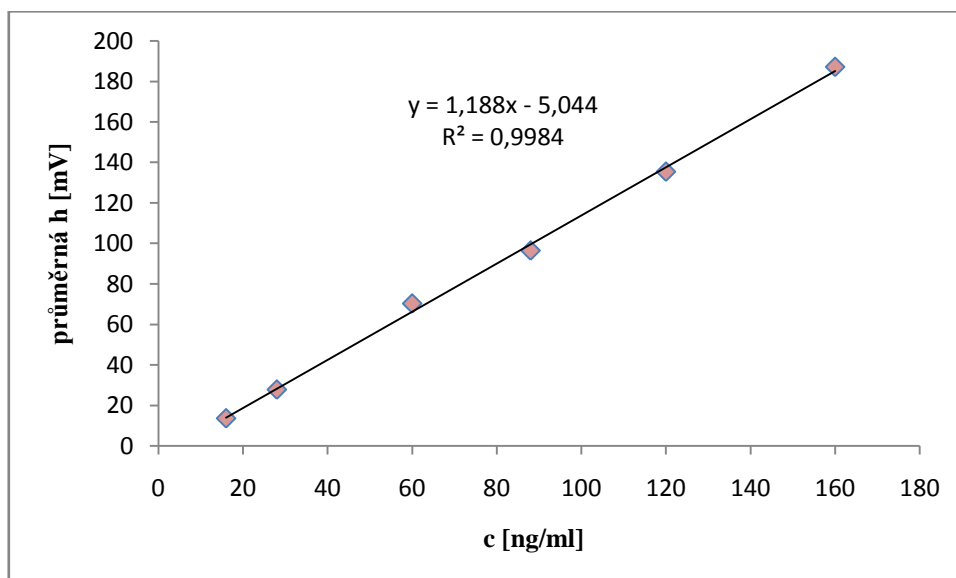
Obrázek 24: Odezvové vhodnostní profily podmínek HS-SPME

3.7 Kalibrace metody headspace mikroextrakce tuhou fází

Optimální podmínky byly aplikovány na kalibrační řadu. Dále bylo měřeno pouze s CAR/PDMS vláknem. Bylo proměřeno 6 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí od 16 do 160 ng/ml v 5% methanolu. Z naměřených hodnot byly sestrojeny závislosti ploch a výšek píků na koncentraci jednotlivých kalibračních bodů, viz obrázky 25 a 26.



Obrázek 25: Kalibrační závislost plochy píku (A) na koncentraci linaloolu (c) – HS-SPME



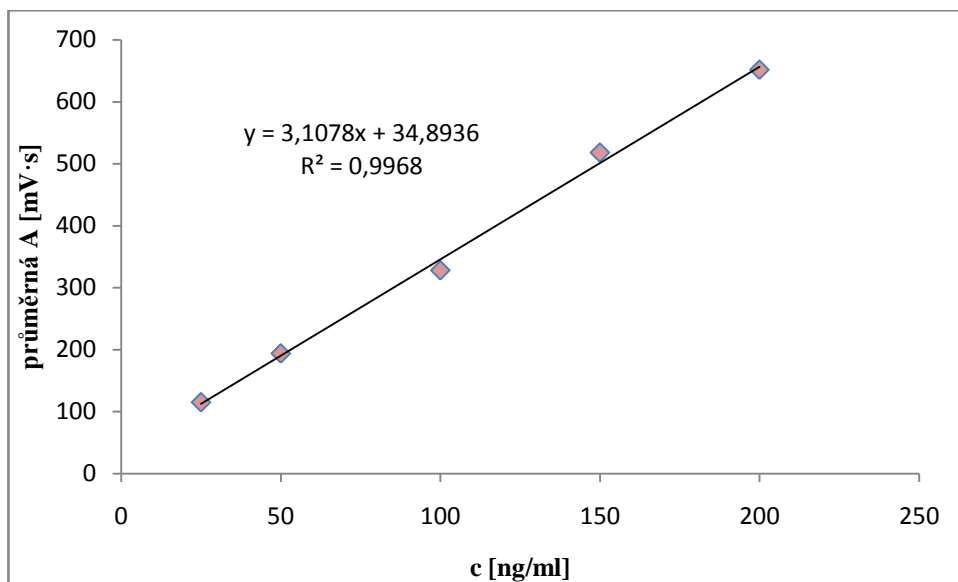
Obrázek 26: Kalibrační závislost výšky píku (h) na koncentraci linaloolu (c) – HS-SPME

Meze detekce a meze stanovitelnosti pro metodu HS-SPME byly vypočteny z rovnice regrese pomocí vzorců (1) a (2). LOD a LOQ jsou vypočteny v tabulce 24.

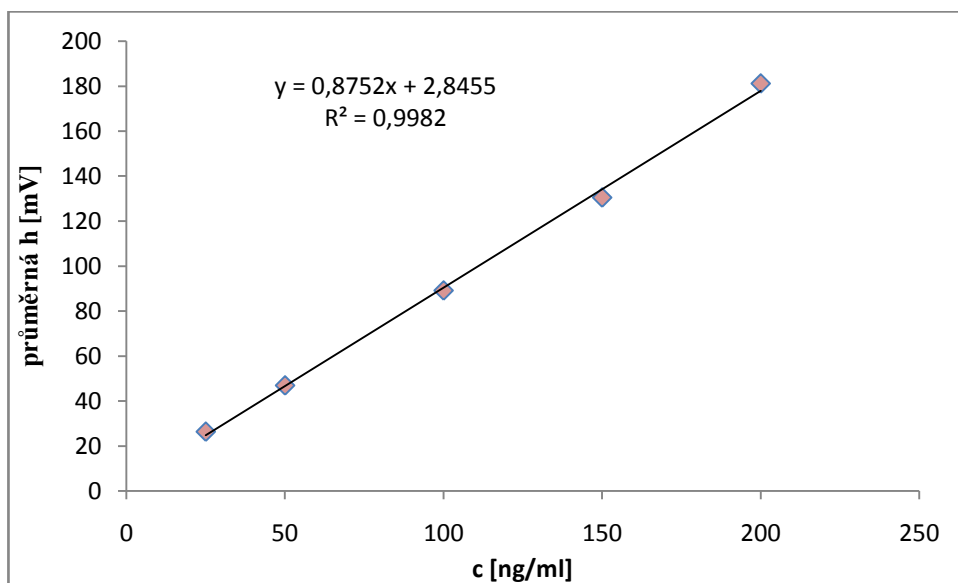
Tabulka 24: Vyhodnocení LOD a LOQ metody HS-SPME

Rovnice regrese	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
A: $y = 5,532x - 33,910$	8,63	28,77
h: $y = 1,188x - 5,044$	5,63	18,76

Dále byla naměřena kalibrace s maticí, kde byl ředěn standard linaloolu pivem Svijanský máz. Bylo proměřeno 5 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí od 25 do 200 ng/ml. Z naměřených hodnot byly sestrojeny závislosti ploch a výšek píků na koncentraci jednotlivých kalibračních bodů, viz obrázky 27 a 28.



Obrázek 27: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci linaloolu HS-SPME pro kalibraci s maticí



Obrázek 28: Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci linaloolu HS-SPME pro kalibraci s maticí

Meze detekce a meze stanovitelnosti pro metodu HS-SPME pro kalibraci s maticí byly vypočteny z rovnice regrese pomocí vzorců (1) a (2). LOD a LOQ jsou vypočteny v tabulce 25.

Tabulka 25: Vyhodnocení LOD a LOQ metody HS-SPME pro kalibraci s maticí

Rovnice regrese	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
A: $y = 3,1078x + 34,8936$	12,10	29,11
h: $y = 0,8752x + 2,8455$	7,08	23,62

3.8 Analýza reálných vzorků piv

K měření reálných vzorků piv byla použita metoda HS-SPME. Důvodem bylo dosažení nižší meze stanovitelnosti a jednodušší provedení mikroextrakce než u metody HS-SDME. Množství linaloolu bylo vyhodnoceno pomocí kalibrační křivky za asistence matrice a metodou standardního přídávku. Pomocí metody kalibrační křivky se nedala vyhodnotit piva klasicky chmelená, jelikož se koncentrace linaloolu pohybovaly pod mezí stanovitelnosti, tudíž byla k porovnání koncentrace linaloolu použita metoda standardního přídávku. Obě metody byly vyhodnoceny pomocí výšek píků. V příloze III lze nalézt sloupcové grafy, které porovnávají výšky píků piv od jedné značky, ze kterých vyplývá, že alkoholická piva chmelená za studena obsahují vyšší koncentraci linaloolu než piva klasicky chmelená. V příloze IV jsou znázorněny chromatogramy jednotlivých reálných vzorků.

Z tabulky 26 je patrné, že nejvyšší koncentraci linaloolu obsahuje pivo New England IPA s obsahem alkoholu 6,3 % obj. z piv za studena chmelených a pivo Bakalář světlý ležák obsahuje nejvyšší koncentraci linaloolu z piv klasicky chmelených. Z tabulky také vyplývá, že alkoholická piva od jedné značky, která jsou chmelená za studena, obsahují vyšší obsah linaloolu než piva klasicky chmelená. Piva klasicky chmelená mají obsah linaloolu v rozmezí 7,69-22,62 ng/ml a piva chmelená za studena 23,63-462,87 ng/ml, výjimkou bylo nealkoholické pivo Bakalář za studena chmelené, které se v tomto intervalu nepohybovalo (8,07 ng/ml). V tomto případě mohla sehrát klíčovou roli dealkoholizace piva, která může měnit organoleptické vlastnosti a aromaprofil konečného produktu.

V diplomové práci Daniely Fikarové (2018) bylo provedeno měření stejných vzorků piv přímou mikroextrakcí tuhou fází. Výsledky koncentrací linaloolu se lišily, což mohlo být způsobeno tím, že ve výše zmiňované práci nebyly podmínky optimalizace prováděny přímo

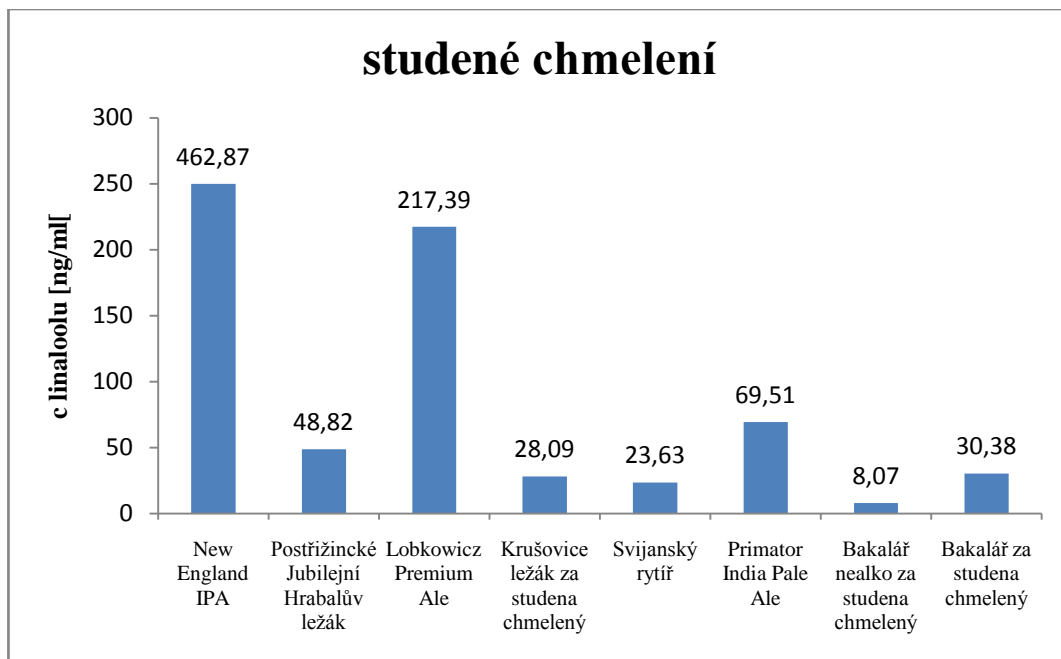
se vzorkem piva (vliv matricového efektu) nebo destrukcí vlákna přímým ponořením do vzorku piva a následná snížená schopnost měření dalšího vzorku.

Tabulka 26: Hodnoty koncentrací linaloolu reálných vzorků piv

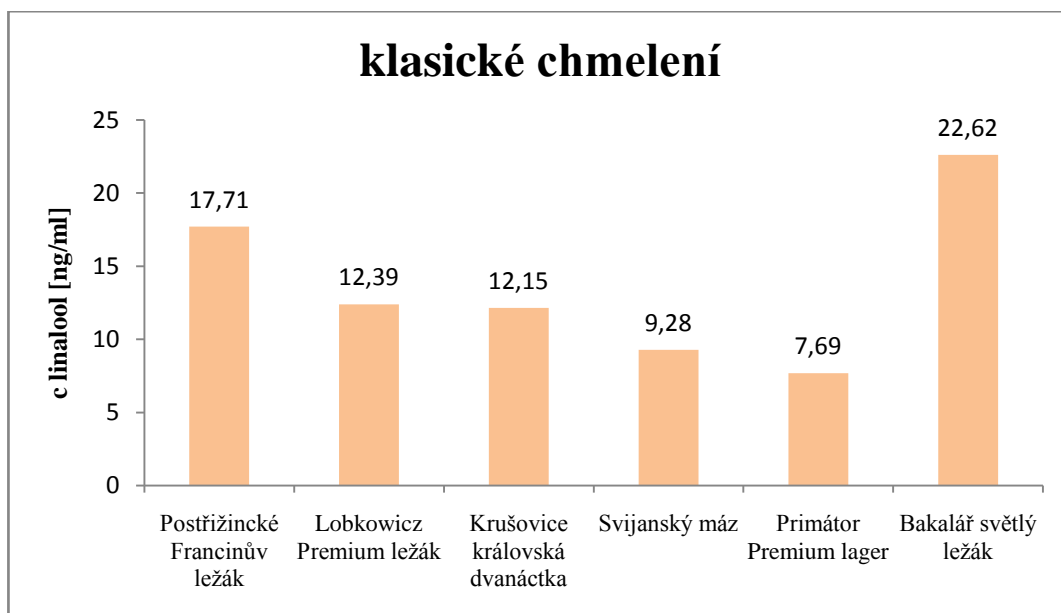
Druh piva	Koncentrace [ng/ml]	
	Kalibrace	Standardní přídavek
Bakalář – Světlý ležák	<LOQ	22,62 ± 4,41
Bakalář – Světlý ležák za studena chmelený	28,97 ± 0,47	30,38 ± 0,58
Bakalář – Nealkoholický za studena chmelený	<LOQ	8,07 ± 0,40
Krušovice – Královská dvanáctka	<LOQ	12,15 ± 1,85
Krušovice – Ležák za studena chmelený	39,44 ± 2,75	28,09 ± 0,08
Postřižinské – Francinův ležák	<LOQ	17,71 ± 0,92
Postřižinské – Jubilejní Hrabalův ležák	48,05 ± 1,06	48,82 ± 6,85
Svijany – Svijanský máz	<LOQ	9,28 ± 0,31
Svijany – Svijanský rytíř	<LOQ	23,63 ± 5,92
Primátor – Premium lager	<LOQ	7,69 ± 0,16
Primátor – India Pale Ale	66,50 ± 3,11	69,51 ± 0,02
Lobkowicz – Premium ležák	<LOQ	12,39 ± 0,38
Lobkowicz – Premium Ale	217,40 ± 8,67	217,39 ± 10,25
New England IPA	480,52 ± 4,28	462,87 ± 33,96

piva v šedých řádcích jsou chmelená za studena, průměrné hodnoty (n = 3) ± směrodatná odchylka

Na obrázku 29 je zobrazen sloupcový graf, který vyjadřuje koncentrace linaloolu ve vzorcích piv chmelených za studena a na obrázku 30 je zobrazen sloupcový graf, který znázorňuje koncentrace linaloolu ve vzorcích klasicky chmelených piv.



Obrázek 29: Porovnání koncentrací linaloolu u piv za studena chmelených



Obrázek 30: Porovnání koncentrací linaloolu u klasicky chmelených piv

Navržená metoda (HS-SPME) je použitelná pro rozlišení piv chmelených různým způsobem. Předpokládaná hranice koncentrace linaloolu mezi klasicky chmeleným a za

studena chmeleným pivem je cca 23 ng/ml. Upřesnění této hranice by vyžadovalo mnohem větší sadu vzorků, což by byla dlouhodobější záležitost přesahující rozsah této diplomové práce.

3.9 Porovnání HS-SDME a HS-SPME v headspace uspořádání

HS-SDME a HS-SPME jsou dvě rychlé a hojně využívané mikroextrakční metody. Obě metody představují silnou alternativu ke konvenčním extrakčním metodám, vzhledem k jejich schopnosti detekovat v kombinaci s vhodnou analytickou metodou i analyty ve velmi nízké koncentraci. Výčet kladů a záporů obou metod je porovnán v tabulce 27.

Hlavní nevýhodou HS-SPME ve srovnání s HS-SDME je, že vyžaduje dražší aparaturu, což zvyšuje náklady na analýzu. Další nevýhodou je životnost vlákna, která degraduje s rostoucím používáním a složitostí matrice analyzovaného vzorku. Nicméně HS-SPME poskytuje nižší meze stanovitelnosti než druhá z porovnávaných metod a manipulace s vláknem je velmi jednoduchá.

HS-SDME vyžaduje vyšší manuální vzručenost, která ovlivňuje linearitu a preciznost měření. Je zapotřebí dbát na přesnost při vytlačení a zpětnému nasátí mikrokapky zpět do mikrostříkačky, která se snadno od hrotu jehly odtrhne. Stabilita kapky je také velmi závislá na teplotě a době extrakce, kdy hrozí její rychlé odpaření nebo odtrhnutí. Tato metoda není náchylná na paměťový efekt, jelikož se extrakce provádí vždy do čistého podílu rozpouštědla.

Dále byly porovnány meze detekce, meze stanovitelnosti a koeficienty determinace. Metoda HS-SPME poskytuje nižší LOD a LOQ oproti metodě HS-SDME a zároveň vyšší hodnotu spolehlivosti. Metoda HS-SPME má mez detekce 7,08 ng/ml, mez stanovitelnosti 23,62 ng/ml a koeficient determinace 0,9982. Metoda HS-SDME má mez detekce 34,91 ng/ml, mez stanovitelnosti 116,37 ng/ml a koeficient determinace 0,9966.

Tabulka 27: Porovnání HS-SDME a HS-SPME

HS-SDME	HS-SPME
menší paměťový efekt - extrakce do čistého rozpouštědla	křehkost vlákna, mechanické poškození, omezená životnost, nutná kondicionace
levnější náklady na analýzu	dražší náklady na analýzu
malá stabilita kapky, náročnější manipulace	jednoduchá manipulace
vyšší hodnoty LOD a LOQ	nižší hodnoty LOD a LOQ
nižší koeficient determinace	vyšší koeficient determinace

Závěr

Tato diplomová práce se zabývá stanovením linaloolu v klasicky chmelených a za studena chmelených pivech pomocí mikroextrakčních technik. Cílem bylo prověřit, zda lze pomocí prováděných analýz ověřit, zda byl při výrobě piva použit postup studeného chmelení.

Teoretická část je věnována vstupním surovinám pro výrobu piva, samotné výrobě piva, různým druhům chmelení a profilu těkavých látek piva. V další části jsou rozebrány mikroextrakční techniky SDME a SPME a příklady stanovení těkavých složek kapalných potravin těmito technikami. Poslední část patří plynové chromatografii ve spojení s plamenovým ionizačním detektorem, která je použita jako separační metoda v experimentální části.

V experimentální části byly nejprve optimalizovány obě výše uvedené techniky v headspace uspořádání a následně byly finální podmínky aplikovány na reálné vzorky piv. Optimalizované a finální parametry u HS-SDME byly: výběr extrakčního rozpouštědla (amylalkohol), doba inkubace (30 min), teplota inkubace (90 °C), čas extrakce (1,5 min) a objem vzorku (10 ml). Optimalizované a finální parametry u metody HS-SPME byly: výběr vlákna (75 µm CAR/PDMS), doba extrakce (60 min), teplota během extrakce (50 °C) a objem vzorku (2 ml). Jako vhodnější se ukázala být metoda HS-SPME, která byla následně aplikována na 14 vzorků piv.

Analyzované vzorky piv byly 7 různých značek (Bakalář, Krušovice, Lobkowicz, Mordýř, Postřižinské, Primátor a Svijany). K porovnání koncentrace linaloolu bylo zakoupeno od jedné značky vždy alespoň jedno pivo chmelené za studena a druhé klasicky chmelené, s výjimkou značky Mordýř, od které bylo analyzováno pouze jedno pivo typu IPA. Nejvyšší koncentraci linaloolu z piv klasicky chmelených obsahovalo pivo značky Bakalář – světlý ležák a z piv chmelených za studena pivo značky Mordýř – New England IPA. Naměřené hodnoty ukázaly, že piva téže značky, která byla chmelená za studena, měla vždy vyšší koncentraci linaloolu než klasicky chmelená piva. Touto experimentální částí lze prokázat, že metoda HS-SPME je vhodná k extrakci těkavého linaloolu ze vzorků piv a linalool je patřičný ukazatel při ověřování způsobu chmelení.

Seznam použité literatury

- [1] BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ a Tomáš LEJSEK. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [2] VRÁNA, Filip. Brewing-law Burghers - Part 1: History and Legal Development. *Kvasny Prumysl.* 2018, 64 (1), 29-34.
- [3] *České pivo: klenot České republiky*. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2015. ISBN 978-80-7434-168-7.
- [4] *Češi berou útokem malé pivovary. Asociace malých a středních podniků a živnostníků ČR* [online]. [cit. 2018-10-11]. Dostupné z: <http://amsp.cz/cesi-berou-utokem-male-pivovary/>
- [5] 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.
- [6] DE KEUKELEIRE, Denis. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova.* 2000, 23(1), 108-112.
- [7] CHLÁDEK, Ladislav. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [8] DRDÁK, Milan. *Základy potravinárskych technológií spracovania rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé Centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1.
- [9] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0510-2.
- [10] ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0239-1.
- [11] BENDOVIÁ, Olga a Miroslav KAHLER. *Pivovarské kvasinky*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981.

- [12] BASAŘOVÁ, Gabriela a Olga BENDOVIÁ. *Pokroky v technologii sladu a piva: identifikace výroby a zvýšení jakosti*. Praha: SNTL-Nakladatelství technické literatury, 1982. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [13] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [14] CEJPEK, Karel. Vonné a chuťové složky sladů. *Chemické listy*. 2014, 108 (5), 426-435.
- [15] ZANOLI, Paola a Manuela ZAVATTI. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, 116(3), 383-396.
- [16] *Schéma procesu výroby piva* [online]. [cit. 2018-11-01]. Dostupné z: <https://ceskepivo-ceskezlato.cz/pivovarnictvi/18/>.
- [17] KIRKPATRICK, Kaylyn R. a Thomas H. SHELLHAMMER. Evidence of Dextrin Hydrolyzing Enzymes in Cascade Hops (*Humulus lupulus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018, 66(34), 9121-9126.
- [18] PAUL MAYE, John a Robert SMITH. Dry Hopping and its Effects on the International Bitterness Unit Test and Beer Bitterness. *Technical Quarterly*. 2016, 53(3), 134-136.
- [19] SCHÖNBERGER, Christina a Tim KOSTELECKY. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011, 117(3), 259-267.
- [20] *Extraktor chmele* [online]. [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: <http://www.ceskeminipivovary.cz/nabidka/vyroba/komponenty-pivovaru/studeny-blok/studene-suche-chmeleni-piva/>
- [21] *Pivo a suroviny k výrobě piva* [online]. [cit. 2018-11-12]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~koplikr/5%20Pivo_2014a.pdf
- [22] CASABIANCA, Herve a Jean-Bernard GRAFF. Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1998, (21), 107-112.
- [23] *Linalool* [online]. [cit. 2018-11-12]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Linalool>
- [24] BRÅRED CHRISTENSSON, Johanna, Klaus E. ANDERSEN a Magnus BRUZE. Air-oxidized linalool-a frequent cause of fragrance contact allergy. *Contact Dermatitis*. 2012, 67(5), 247-259.

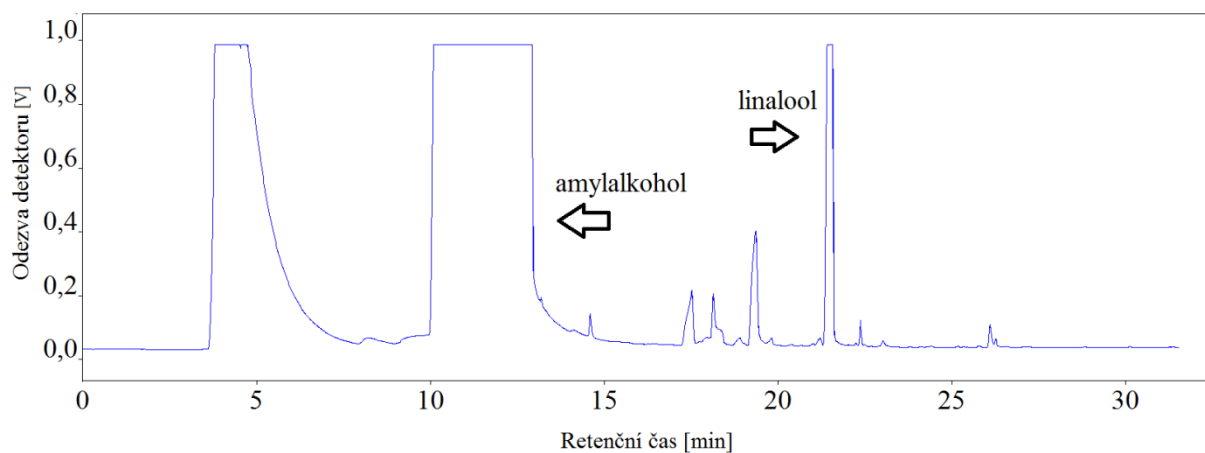
- [25] APROTOSOAIE, Ana C., Monica HĂNCIANU, Irina-Iuliana COSTACHE a Anca MIRON. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*. 2014, 29(4), 193-219.
- [26] *Extrakční techniky* [online]. [cit. 2018-11-19]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968
- [27] PAWLISZYN, Janusz, Barbara PAWLISZYN a Michael PAWLISZYN. Solid Phase Microextraction (SPME). *The Chemical Educator*. 1997, 2(4), 1-7.
- [28] KATAOKA, Hiroyuki, Heather L. LORD a Janusz PAWLISZYN. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, 880(1-2), 35-62.
- [29] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analyzů. *Chemické listy*. 2002, 96(4), 827-852.
- [30] SPIETELUN, Agata, Michał PILARCZYK, Adam KLOSKOWSKI a Jacek NAMIEŚNIK. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*. 2010, 39(11), 4524-4537.
- [31] MILLS, Graham A. a Valerie WALKER. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A*. 2000, 902(1), 267-287.
- [32] *Extraction modes using direct immersion solid-phase microextraction and headspace solid phase microextraction* [online]. [cit. 2018-11-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Extraction-modes-using-direct-immersion-solid-phase-microextraction-DI-SPME-2a-and_fig27_321319230
- [33] MERKLE, Sybille, Kim KLEEBERG a Jan FRITSCHÉ. Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis - A Review. *Chromatography*. 2015, 2(3), 293-381.
- [34] ZHANG, Zhouyao a Janusz PAWLISZYN. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. 2002, 65(14), 1843-1852.
- [35] BALASUBRAMANIAN, Sundar a Suranjan PANIGRAHI. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, 4(1), 1-26.

- [36] VIDAL, Lorena, Antonio CANALS, Nicolas KALOGERAKIS a Elefteria PSILLAKIS. Headspace single-drop microextraction for the analysis of chlorobenzenes in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1089(1-2), 25-30.
- [37] HASHEMI, Mahdi, Ali HABIBI, Narges JAHANSHAHI a Elefteria PSILLAKIS. Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection. *Food Chemistry*. 2011, 124(3), 1258-1263.
- [38] TANG, Sheng, Tong QI, Prince Dim ANSAH, Juliette Chancellevie NALOUZEBI FOUEMINA, Wei SHEN, Chanbasha BASHEER a Hian Kee LEE. Single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018, 108, 306-313.
- [39] XU, Li, Chanbasha BASHEER a Hian Kee LEE. Developments in single-drop microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1152(1-2), 184-192.
- [40] PSILLAKIS, Elefteria a Nicolas KALOGERAKIS. Developments in single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002, 21(1), 54-64.
- [41] JAIN, Archana a Krishna K. VERMA. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2011, 706(1), 37-65.
- [42] JEANNOT, Michael A., Andrzej PRZYJAZNY a John M. KOKOSA. Single drop microextraction—Development, applications and future trends. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217(16), 2326-2336.
- [43] OUYANG, Gangfeng a Janusz PAWLISZYN. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2008, 627(2), 184-197.
- [44] *Kvantitativní vyhodnocovací metody v plynové chromatografii* [online]. [cit.2019-04-06]. Dostupné z: <https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/index.pl?cast=52966>
- [45] ACHOURI, Allaoua, Joyce BOYE a Youness ZAMANI. Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chemistry*. 2006, 99(4), 759-766.
- [46] BAHROUN, Najat H.O., John D., PERRY, Stephen P. STANFORTH a John R. DEAN. Use of exogenous volatile organic compounds to detect *Salmonella* in milk. *Analytica Chimica Acta*. 2018, 1028(4), 121-130.

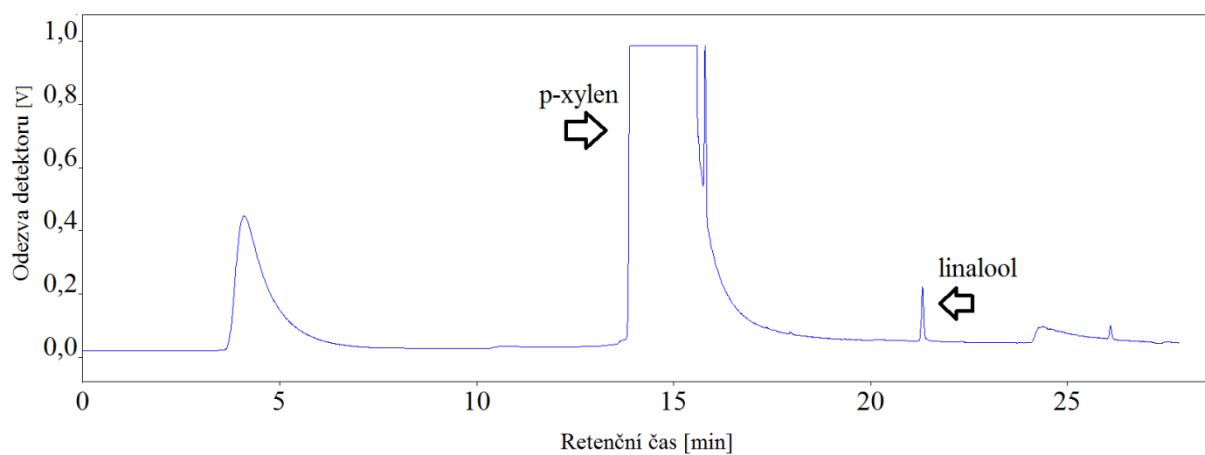
- [47] JELEN, Henryk H. a Anna SZCZUREK, Solid phase microextraction for profiling volatile compounds in liquered white wines. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 2010, 9(1), 23-32.
- [48] DOS ANJOS, Jeancarlo Pereira a Jailson B. DE ANDRADE. Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC–MS. *Microchemical Journal*. 2014, 112, 119-126.
- [49] JENNINGS, Walter, Eric MITTLEFEHLDT a Phillip Paul STREMPLE. *Analytical gas chromatography*. 2. vydání. San Diego: Academic Press, 1997. ISBN 01-238-4357-X.
- [50] BARTOVSKÝ, Tomáš. Provozní plynové chromatografy. *Automa*. 2017, 4, 24-29.
- [51] *Separáční metody* [online]. [cit. 2019-01-23]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52964
- [52] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separáční metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [53] *Gas Chromatography* [online]. [cit. 2019-01-22]. Dostupné z: https://getrevising.co.uk/revision-notes/gas_chromatography
- [54] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [55] ANNINO, Raymond a Richard VILLALOBOS. *Process gas chromatography: fundamentals and applications : on-line analysis for process monitoring and control*. Research Triangle Park, NC: Instrument Society of America, 1992. ISBN 15-561-7272-9.
- [56] *Detektory v plynové chromatografii* [online]. [cit. 2019-01-28]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52965
- [57] *Precision Solution for FID Gas* [online]. [cit. 2019-01-25]. Dostupné z: <https://www.peakscientific.com/articles/precision-solution-for-fid-gas/>

Přílohy

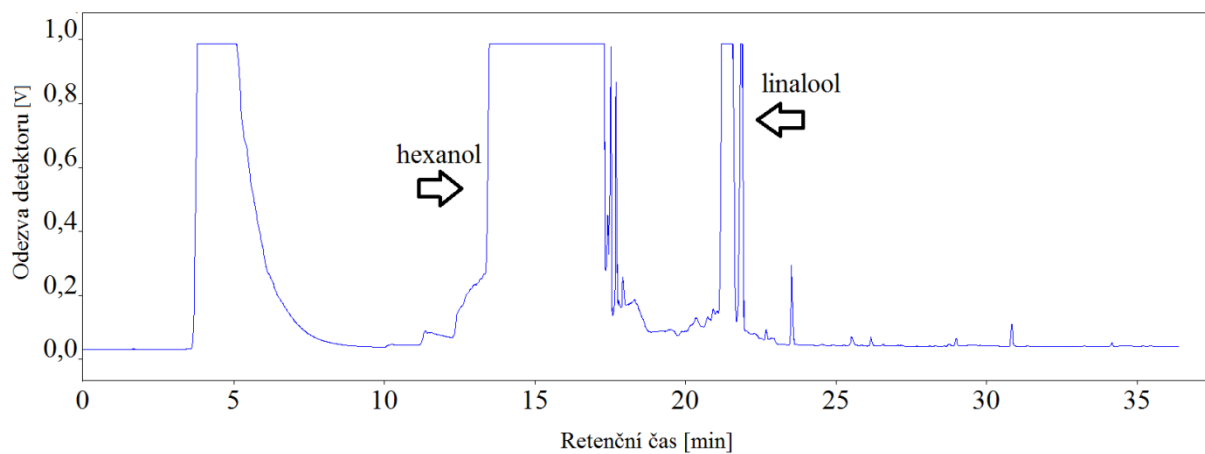
Příloha I: Chromatogramy pro výběr extrakčních rozpouštědel



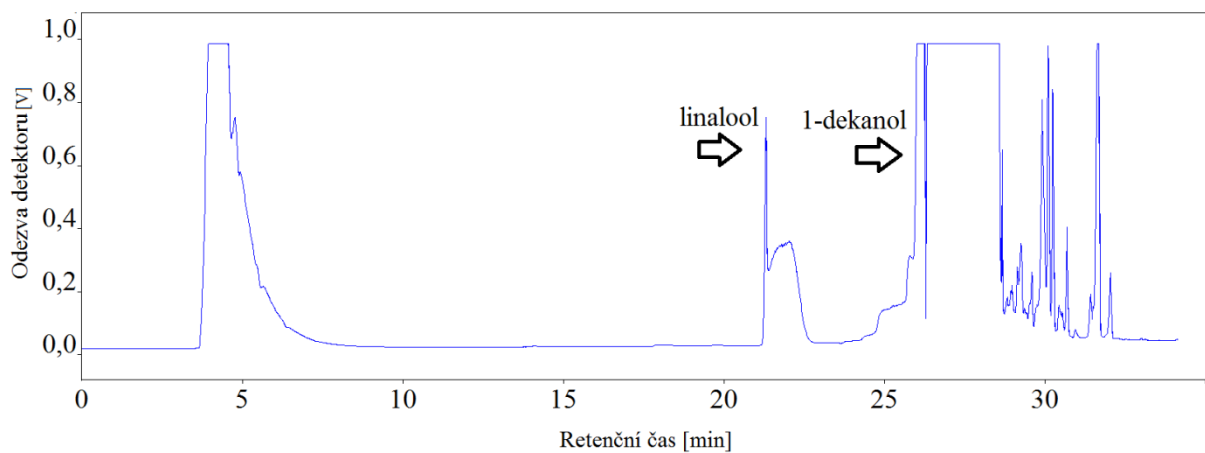
Obrázek: I-1: Chromatogram amylalcohol + linalool



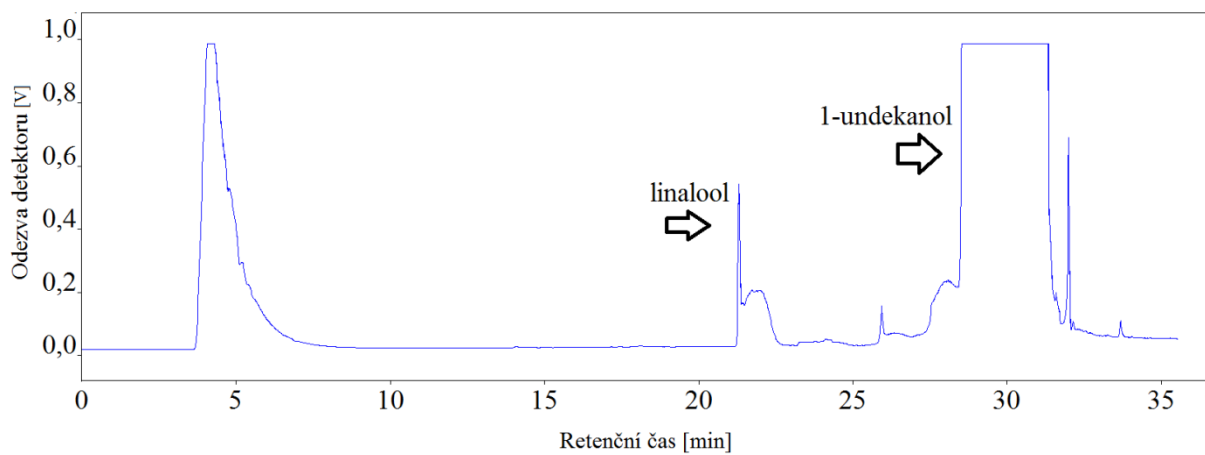
Obrázek: I-2: Chromatogram p-xylene + linalool



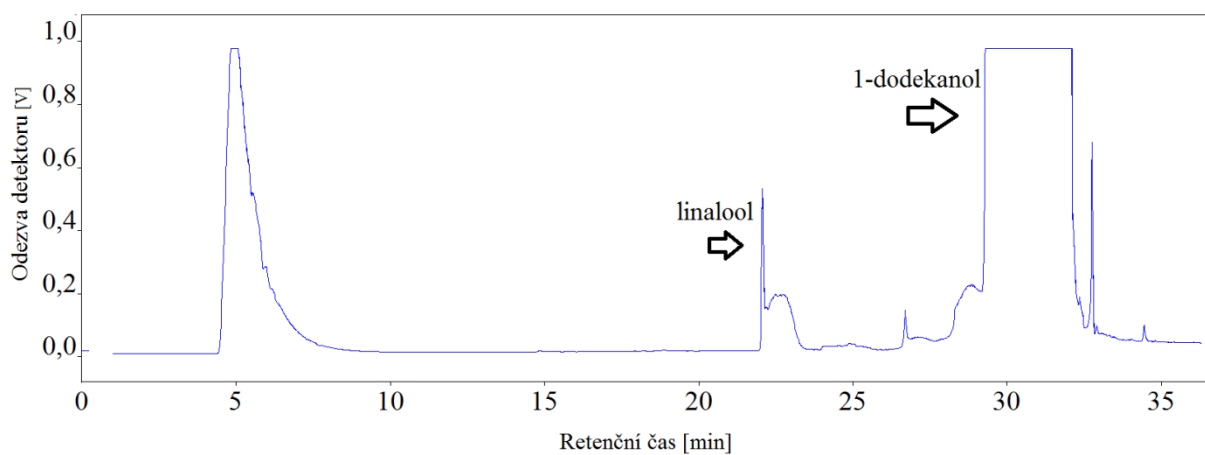
Obrázek: I-3: Chromatogram hexanol + linalool



Obrázek: I-4: Chromatogram 1-dekanol + linalool

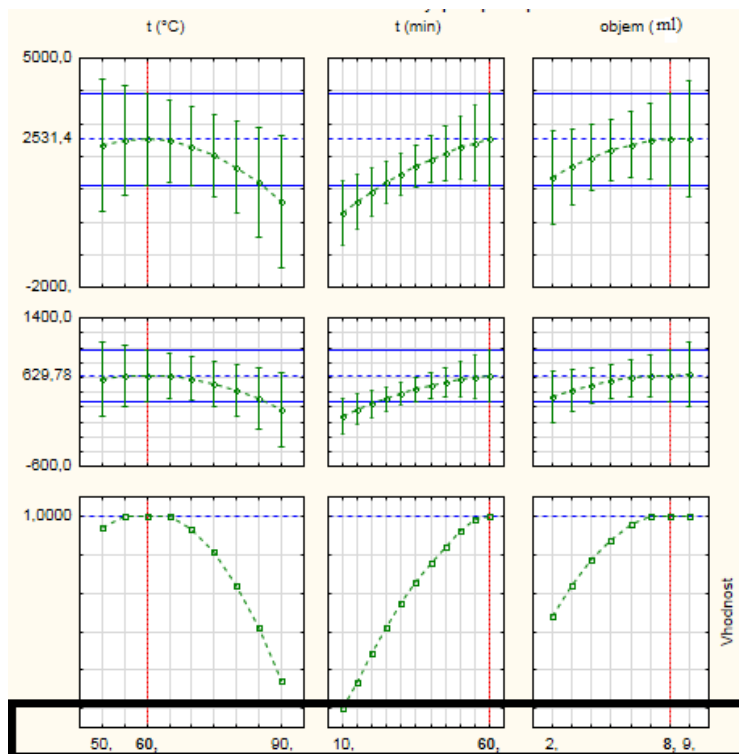


Obrázek: I-5: Chromatogram 1-undekanol + linalool

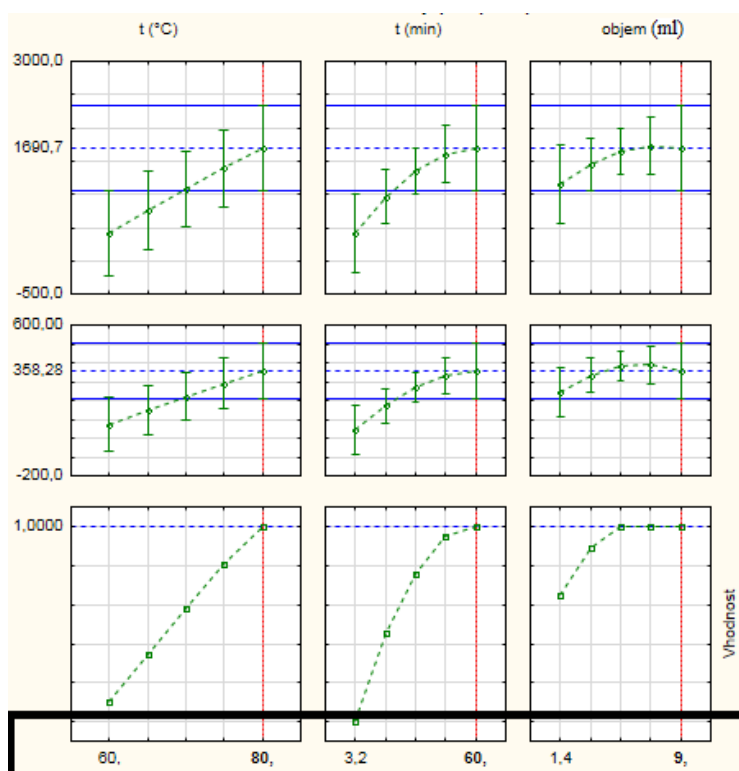


Obrázek: I-6: Chromatogram 1-dodekanol + linalool

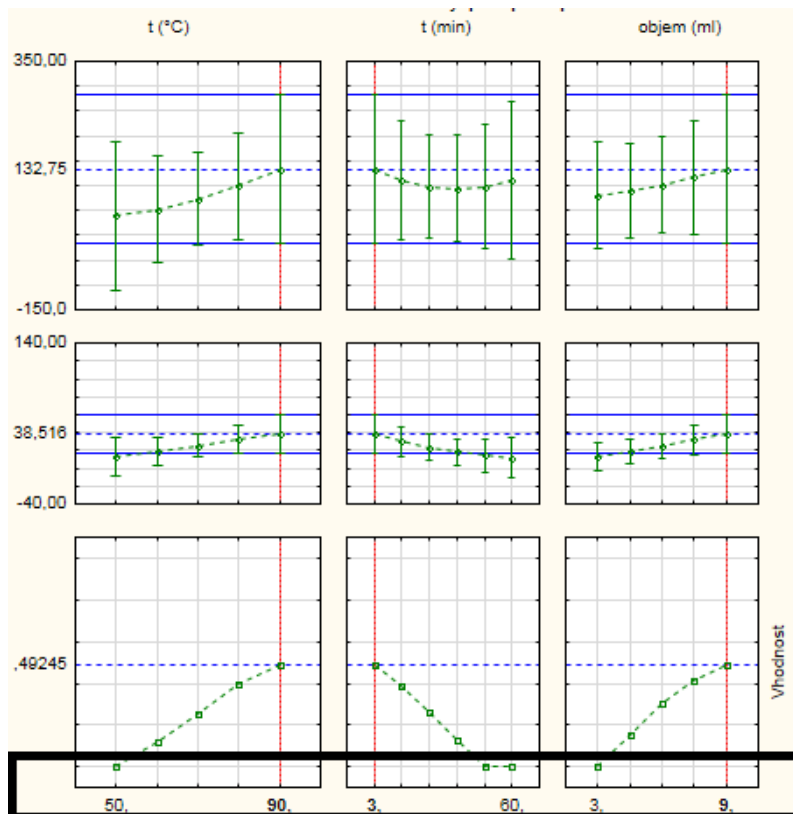
Příloha II: Vhodnostní profily zkoušených vláken



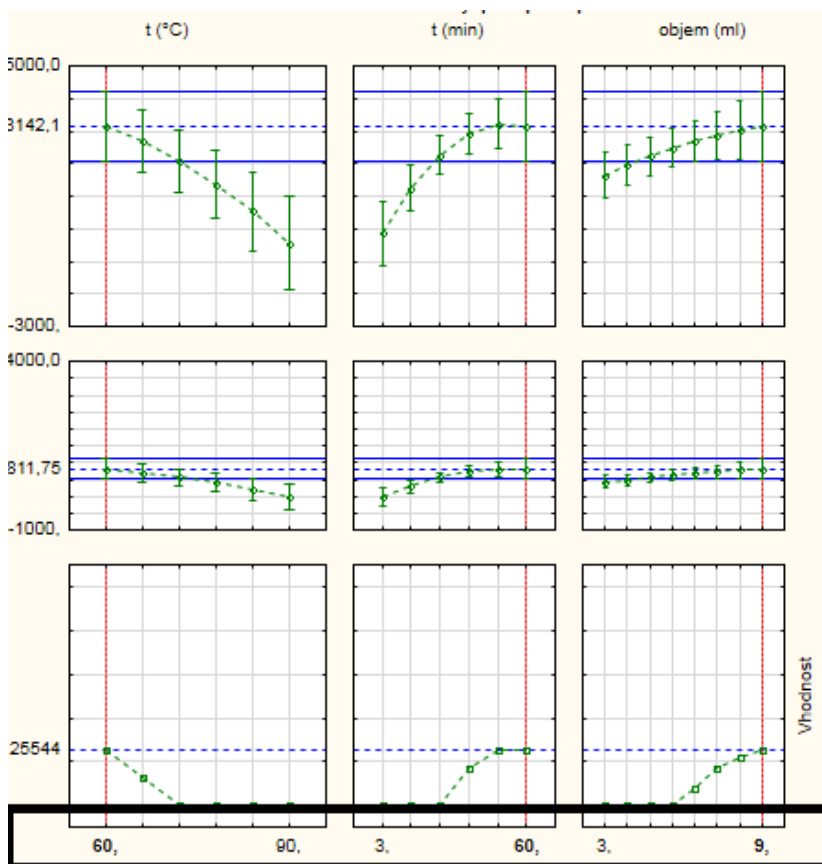
Obrázek: II-1: Vhodnostní profil pro šedé vlákno



Obrázek: II-2: Vhodnostní profil pro černé vlákno

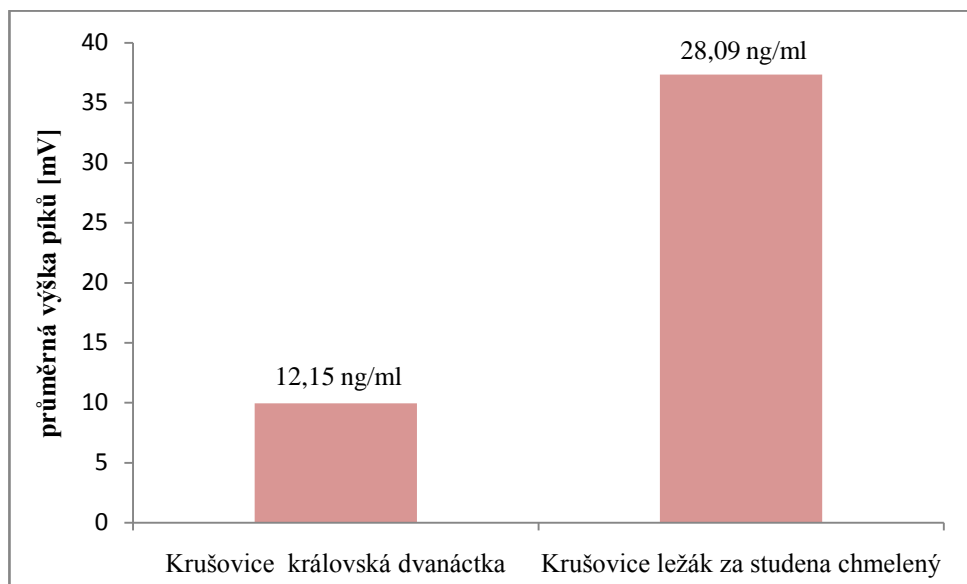


Obrázek II-3: Vhodnostní profil pro červené vlákno

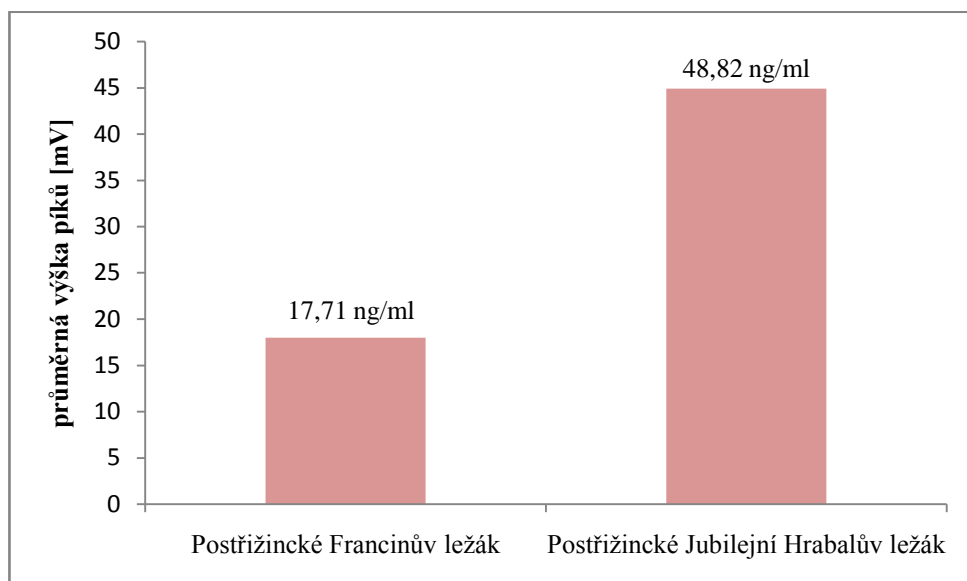


Obrázek II-4: Vhodnostní profil pro modré vlákno

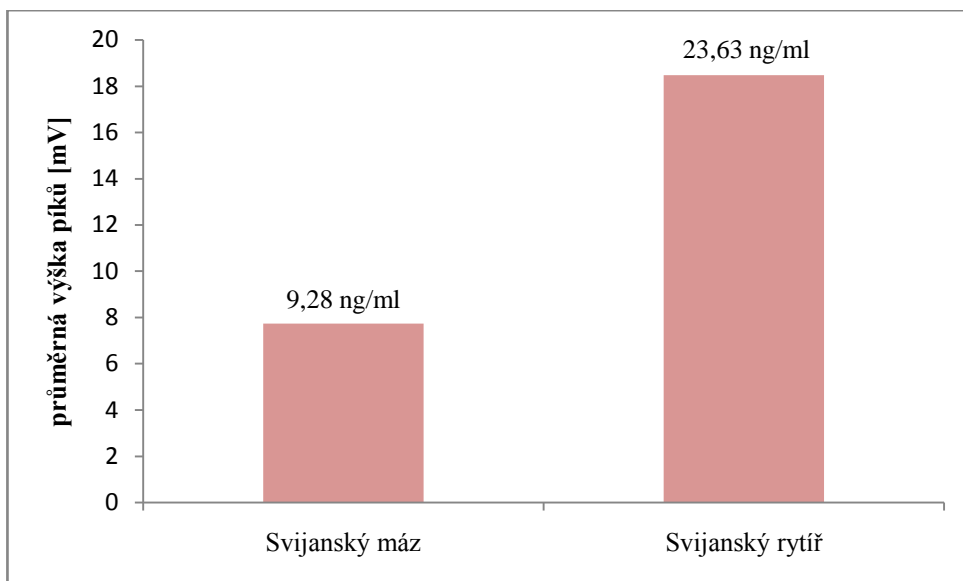
Příloha III: Porovnání výšek píků piv jedné značky



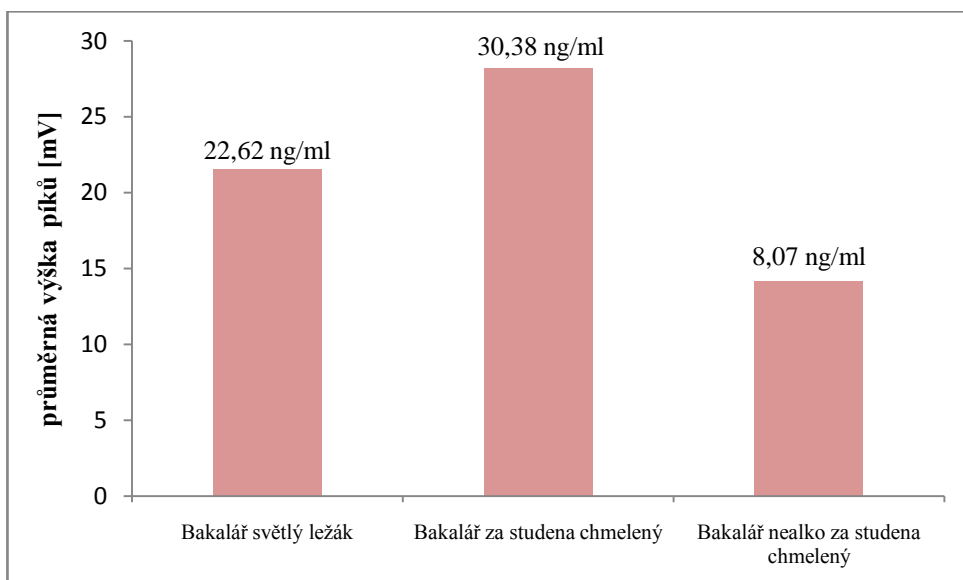
Obrázek III-1: Porovnání výšek píků piv značky Krušovice



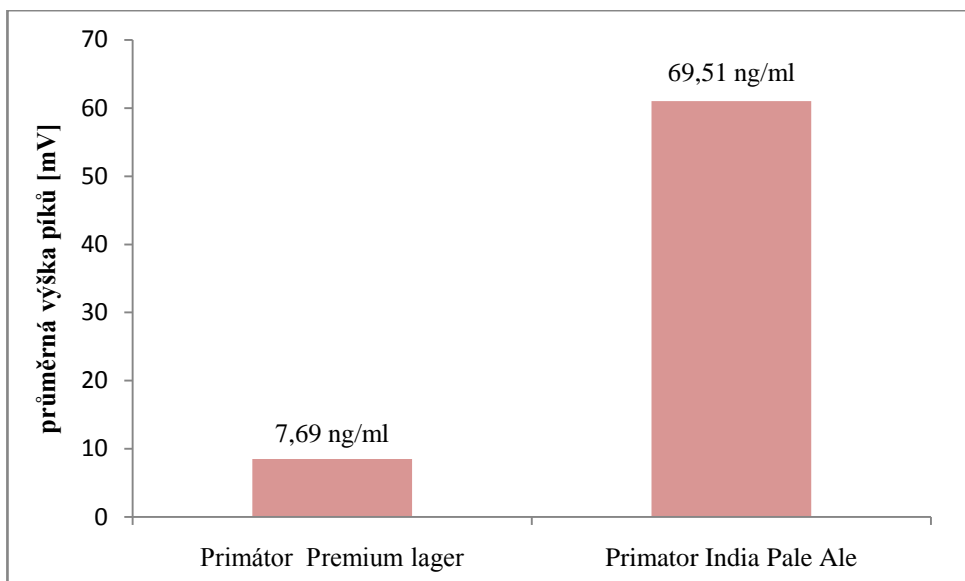
Obrázek III-2: Porovnání výšek píků piv značky Postřižinské



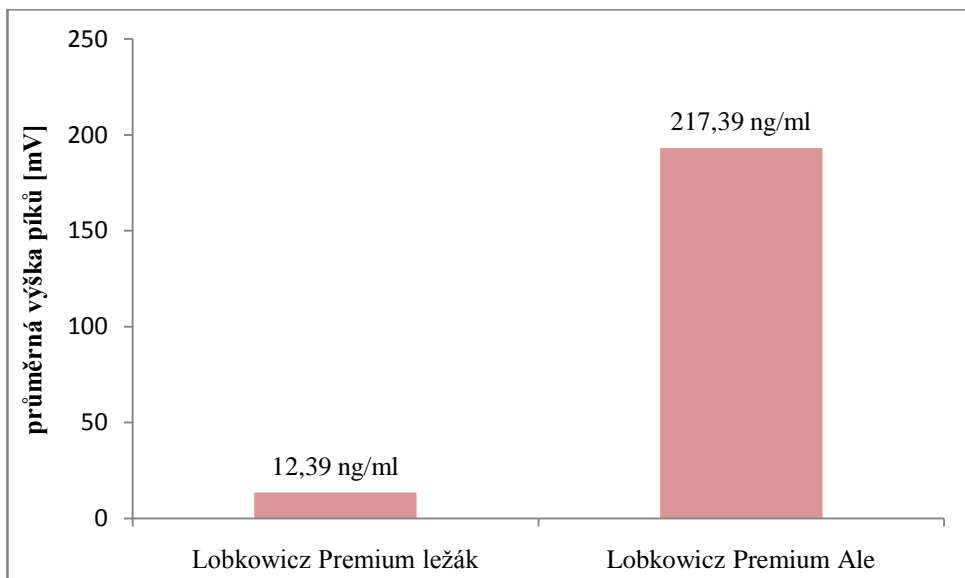
Obrázek III-3: Porovnání výšek píků piv značky Svijany



Obrázek III-4: Porovnání výšek píků piv značky Bakalář

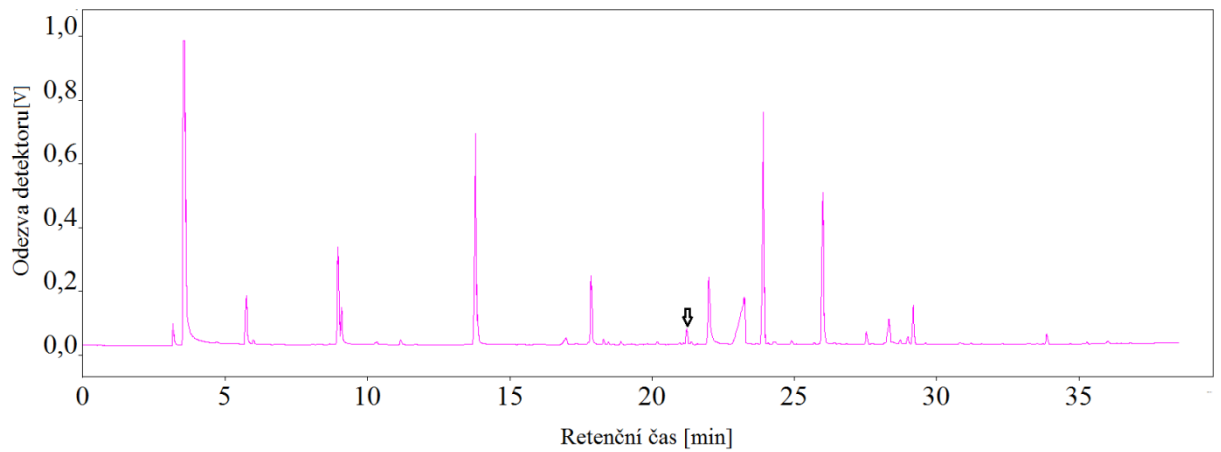


Obrázek III-5: Porovnání výšek píků piv značky Primátor

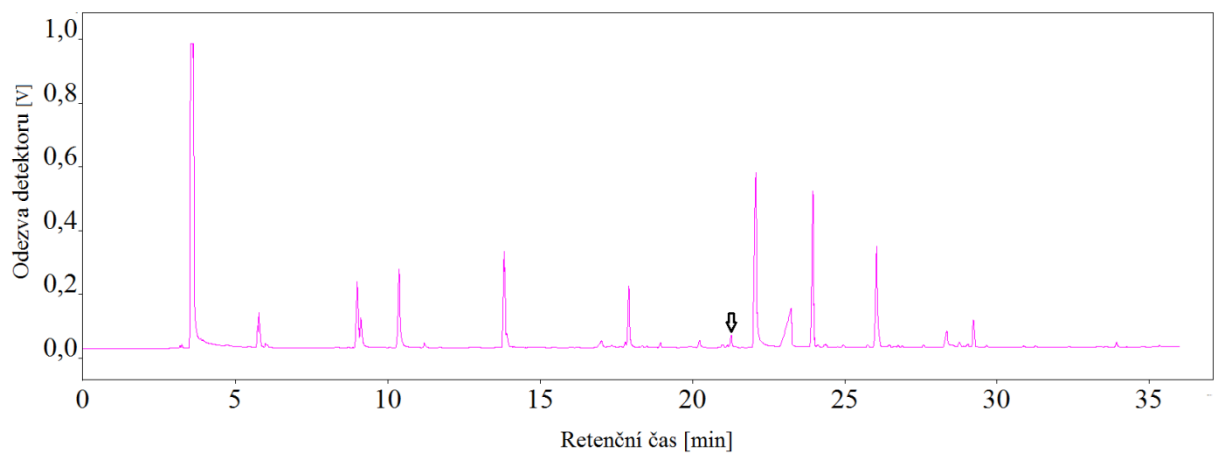


Obrázek III-6: Porovnání výšek píků piv značky Lobkowicz

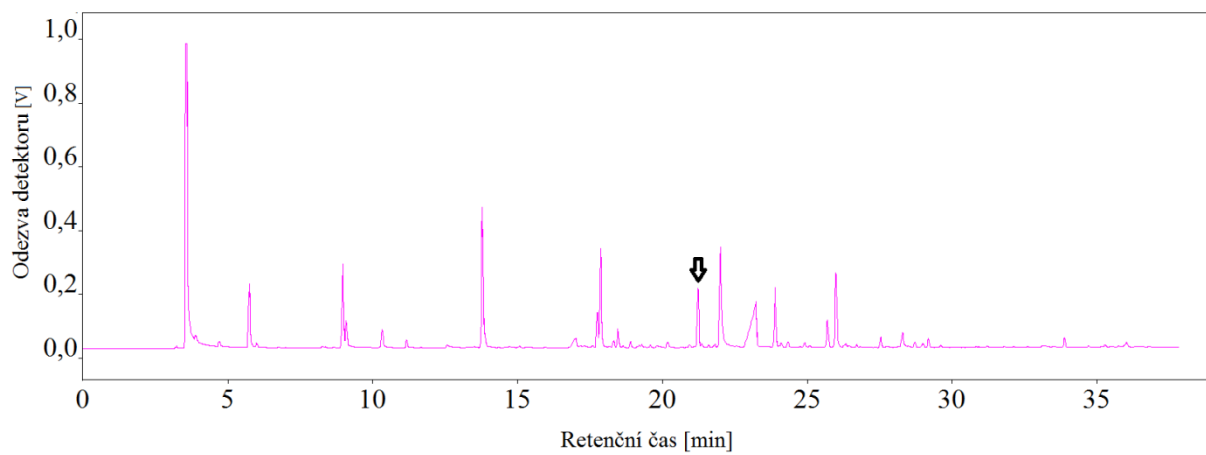
Příloha IV: Záznamy chromatogramů jednotlivých vzorků pív



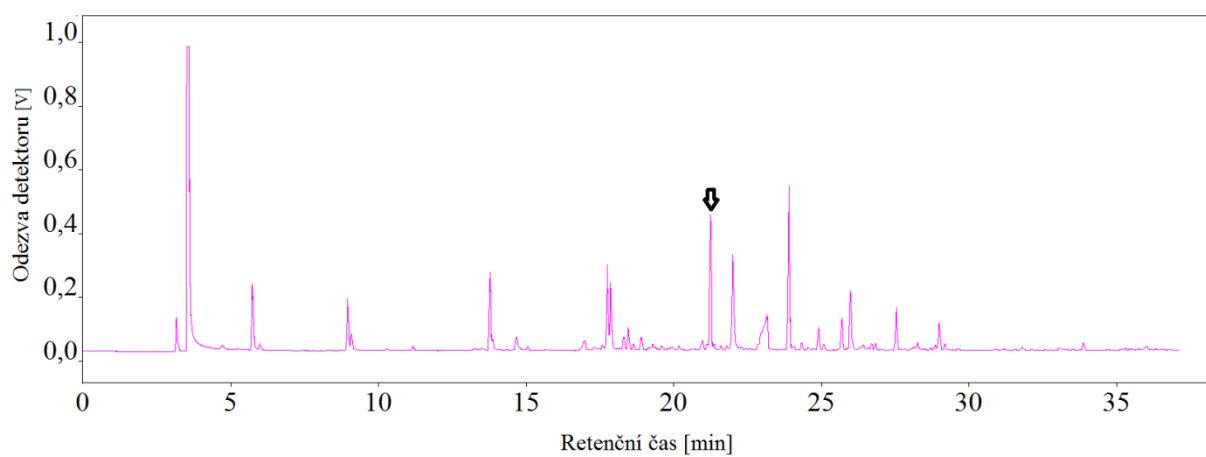
Obrázek VI-1: Chromatogram piva Postřizinské – Jubilejní Hrabalův ležák



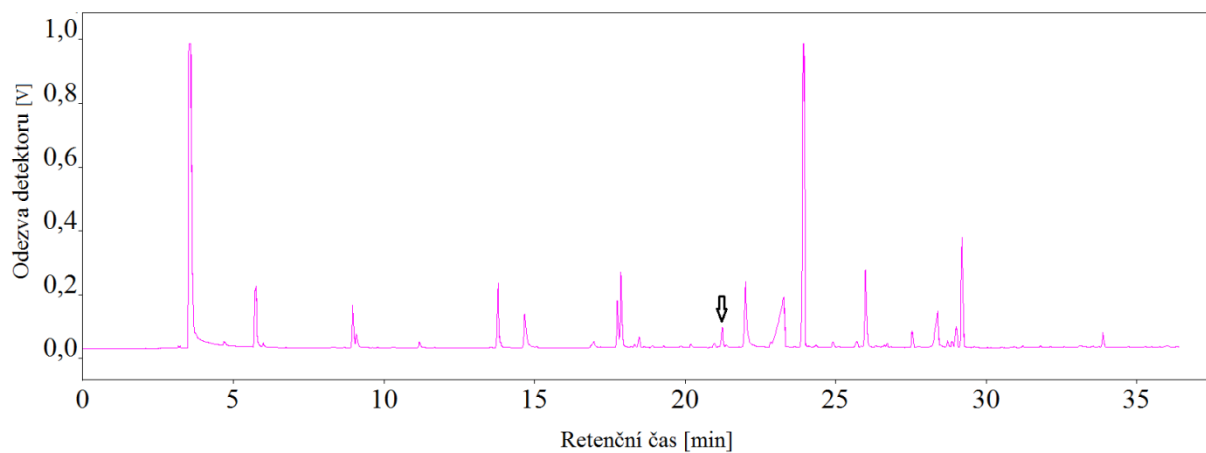
Obrázek VI-2: Chromatogram piva Krušovice – Ležák chmelený za studena



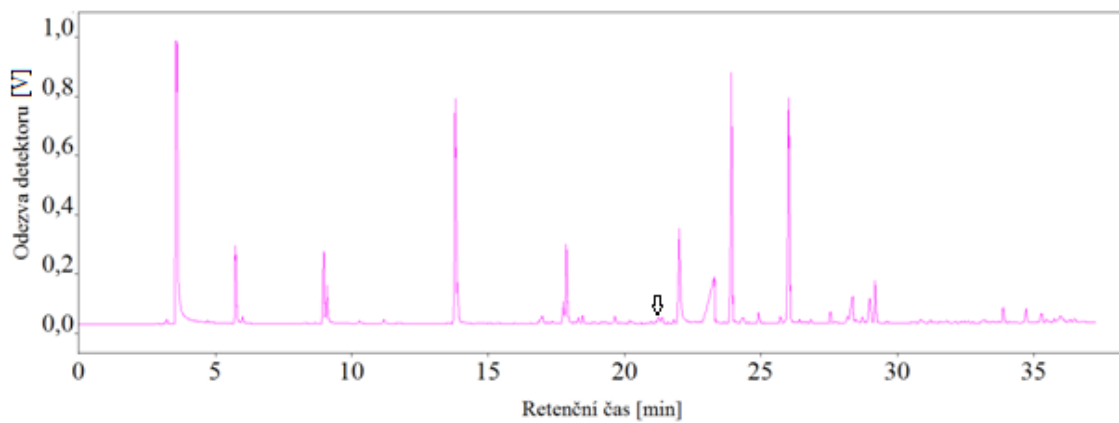
Obrázek VI-3: Chromatogram piva Lobkowicz – Premium Ale



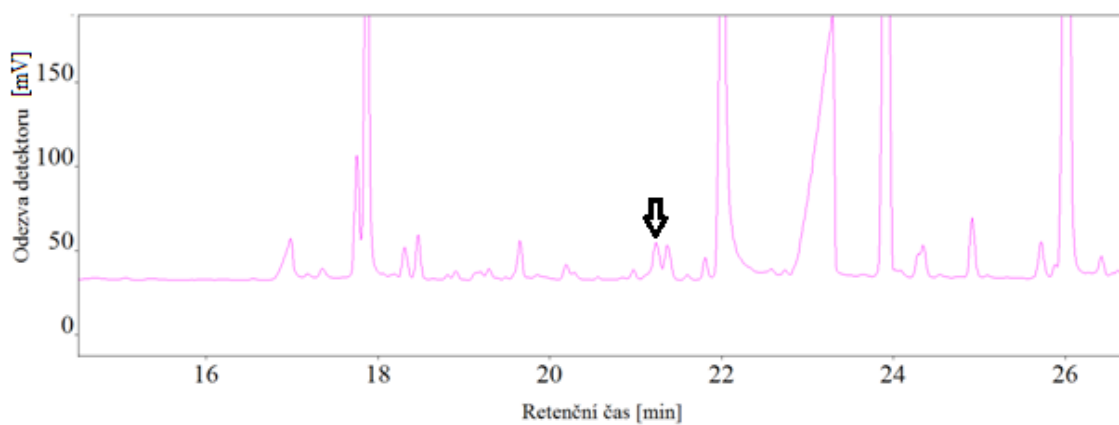
Obrázek VI-4: Chromatogram piva Mordýř – New England IPA



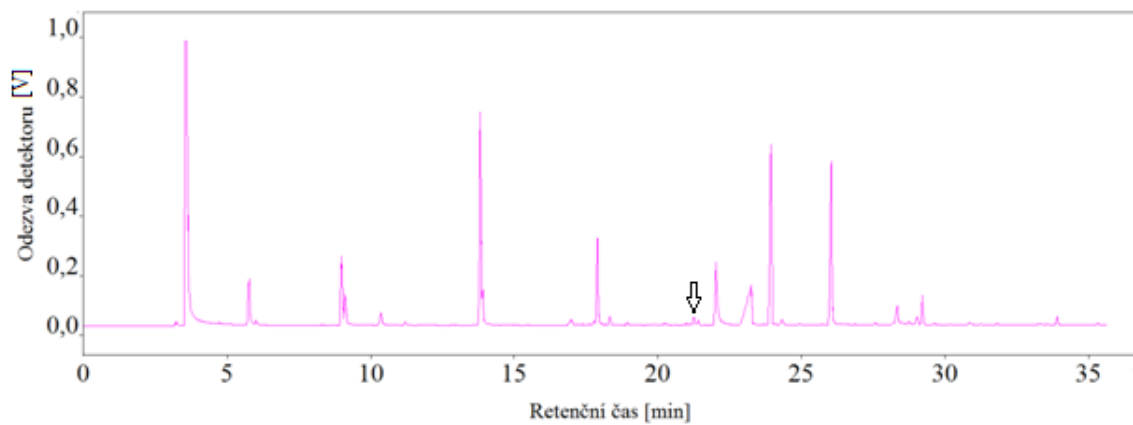
Obrázek VI-5: Chromatogram piva Primátor – India Pale Ale



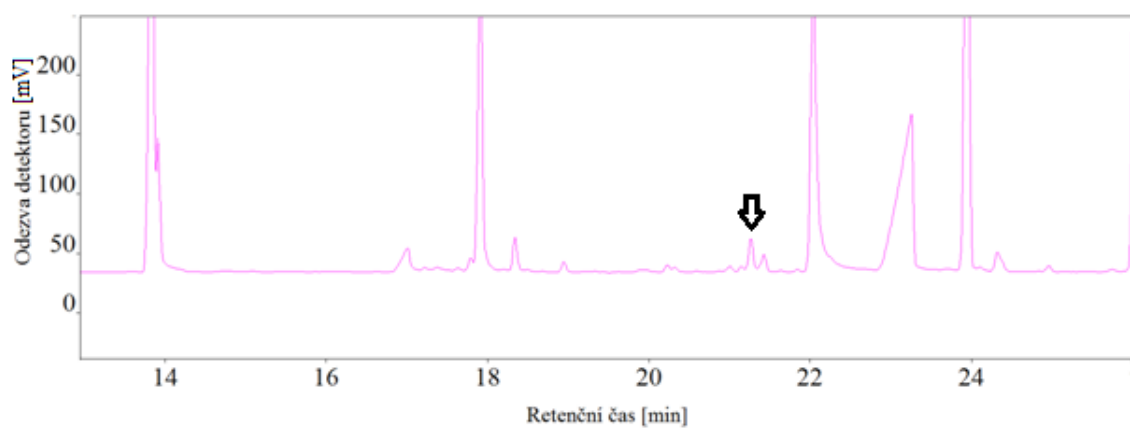
Přibliženo:



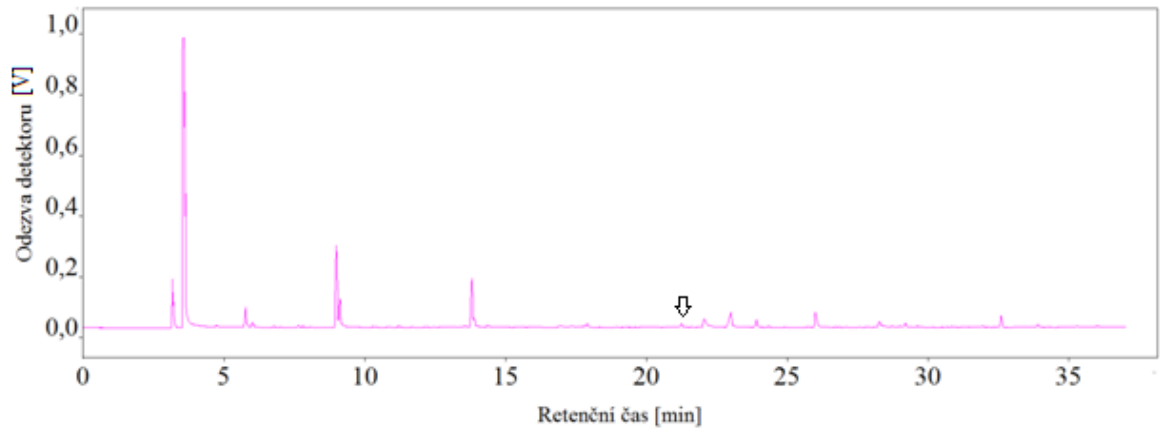
Obrázek VI-6: Chromatogram piva Svijany – Svijanský rytíř



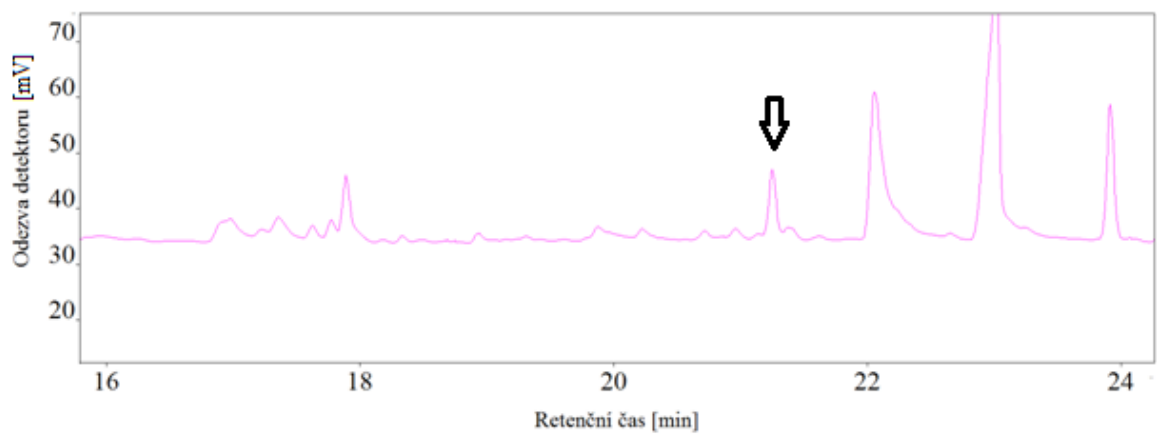
Přibliženo:



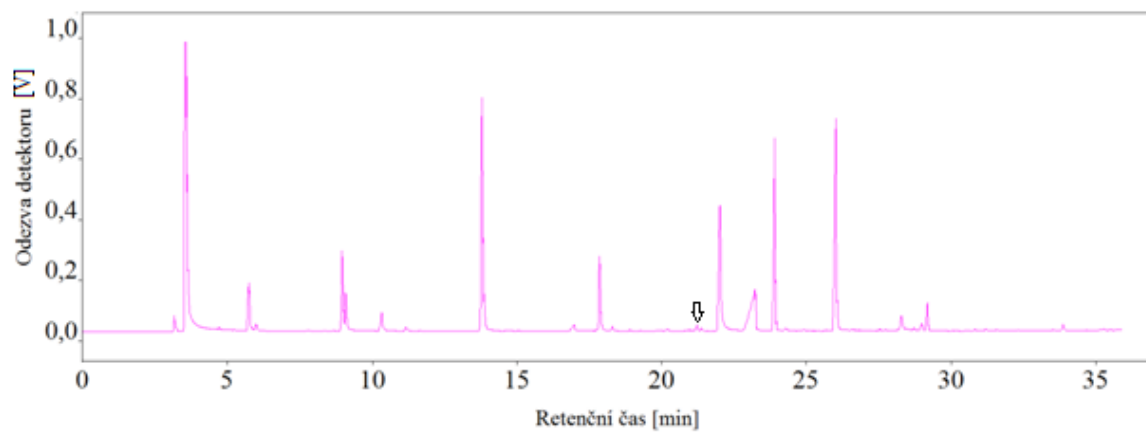
Obrázek VI-7: Chromatogram piva Bakalář – ležák za studena chmelený



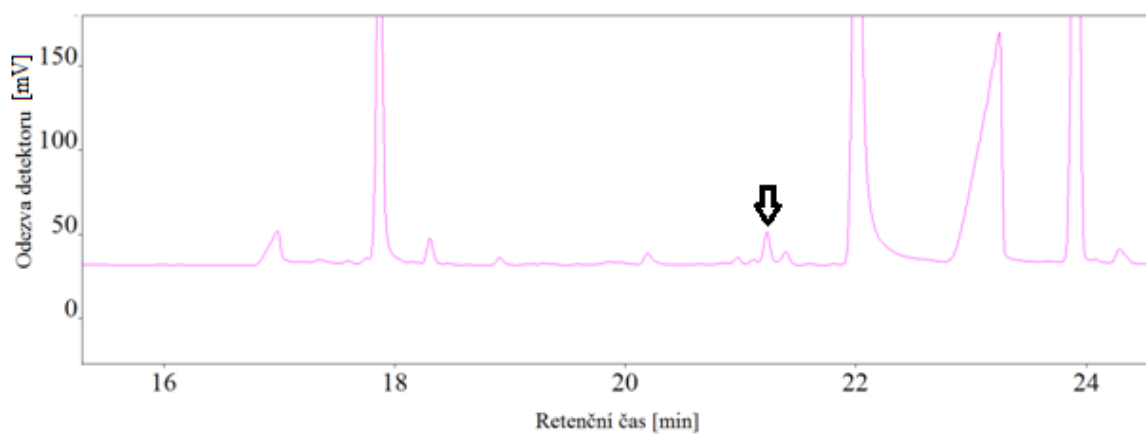
Přiblíženo:



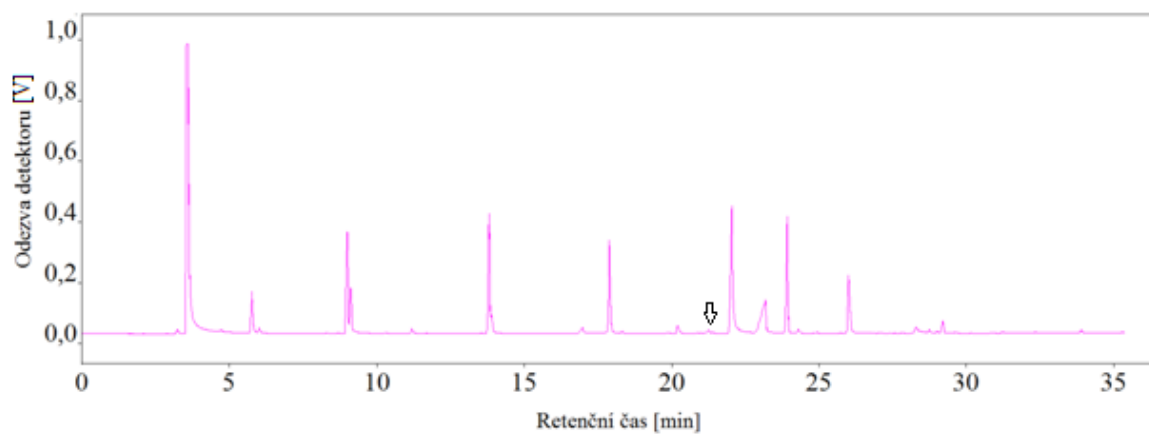
Obrázek VI-8: Chromatogram piva Bakalář – nealkoholický za studena chmelený



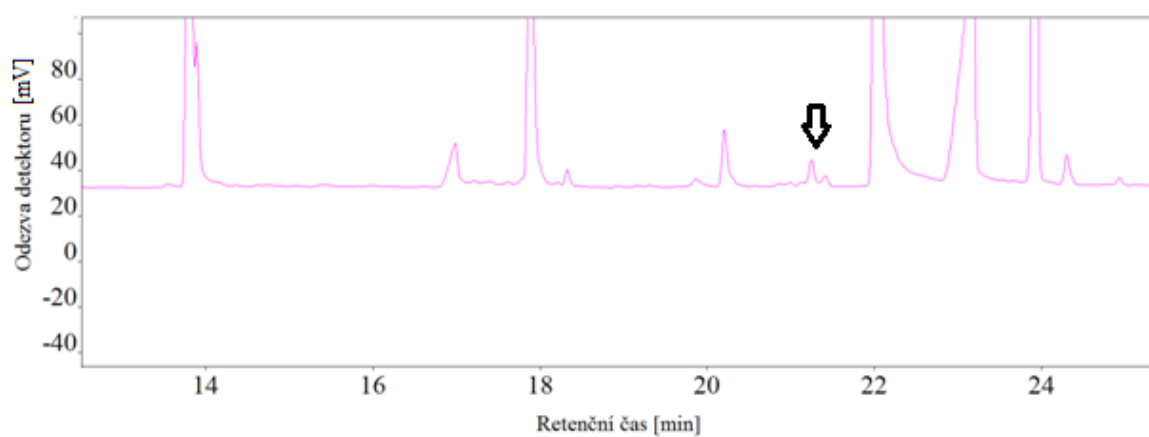
Přiblíženo:



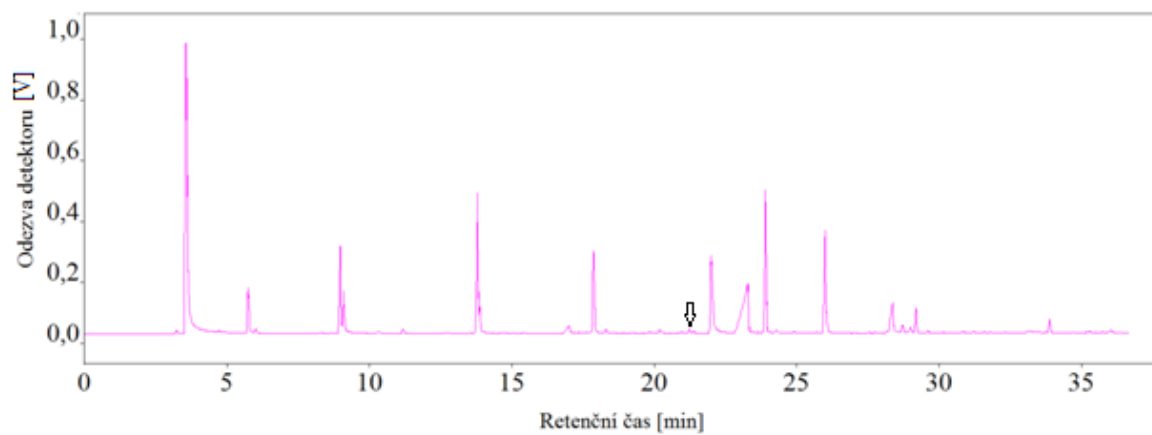
Obrázek VI-9: Chromatogram piva Postřizinské – Francinův ležák



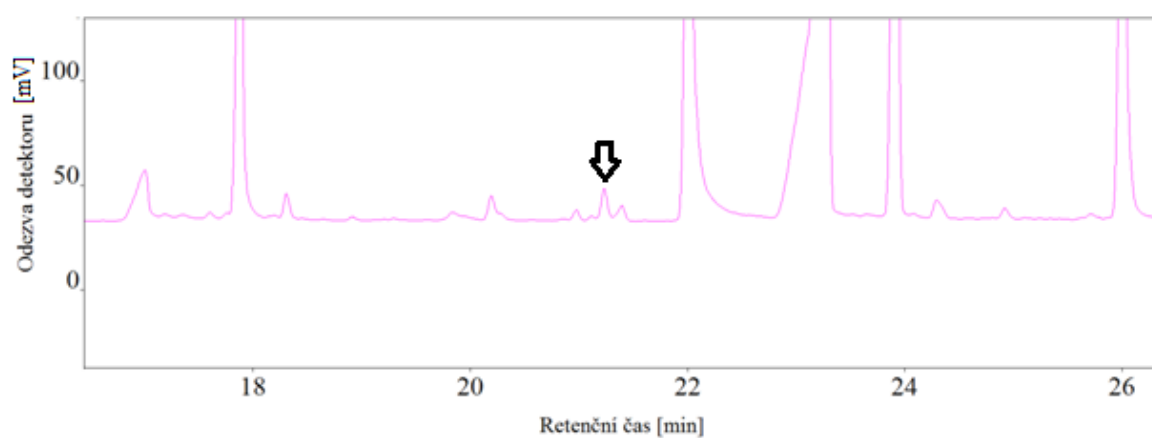
Přiblíženo:



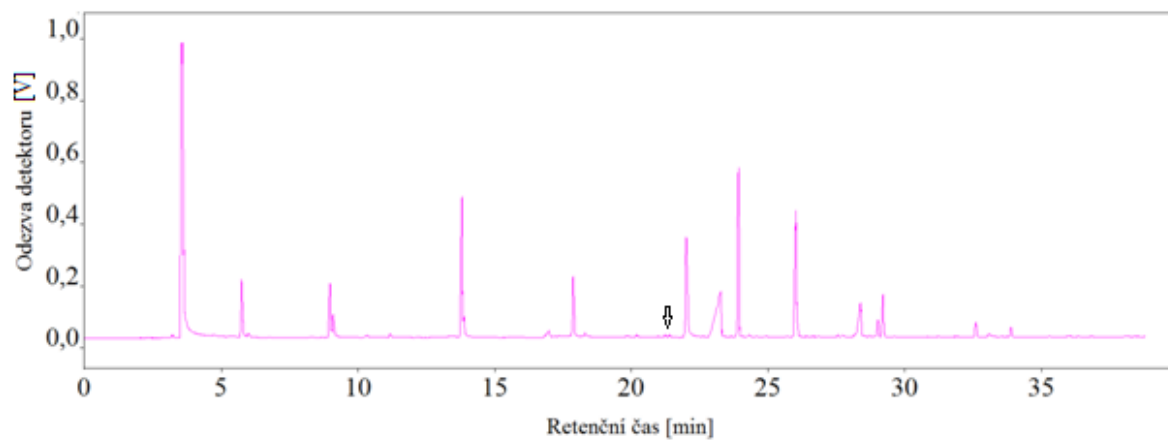
Obrázek VI-10: Chromatogram piva Krušovice – Královská dvanáctka



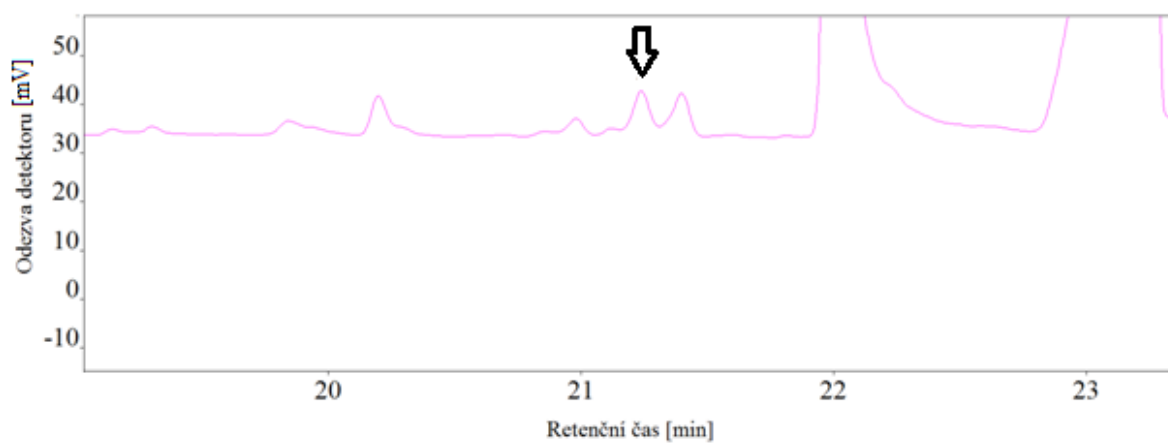
Přiblíženo:



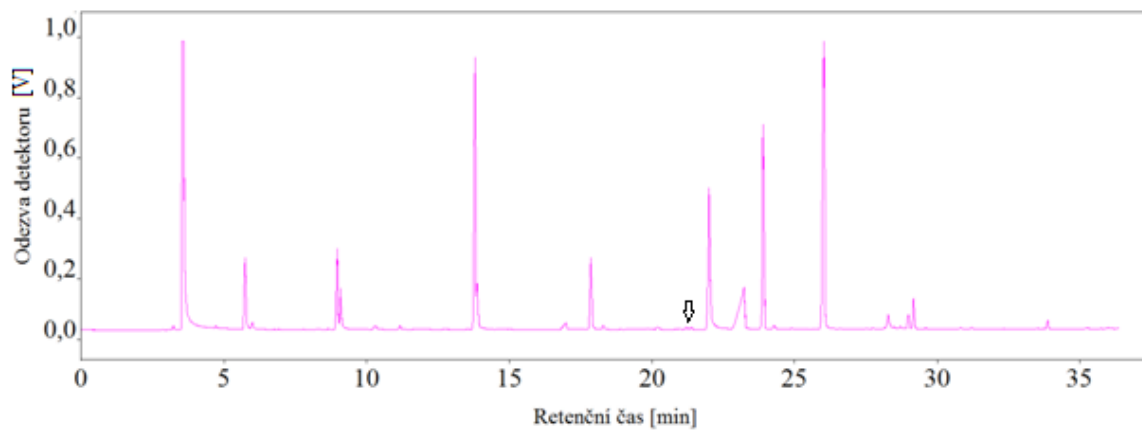
Obrázek VI-11: Chromatogram piva Lobkowicz – Premium ležák



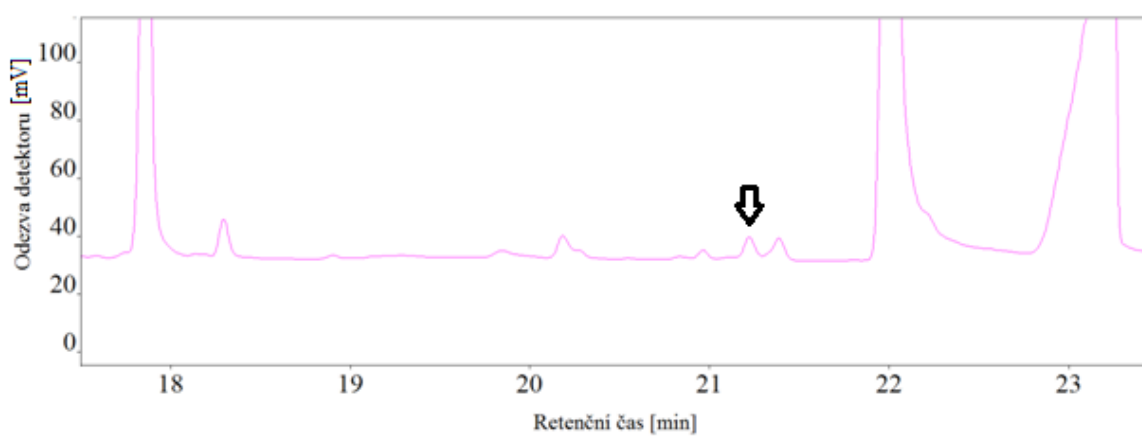
Přibliženo:



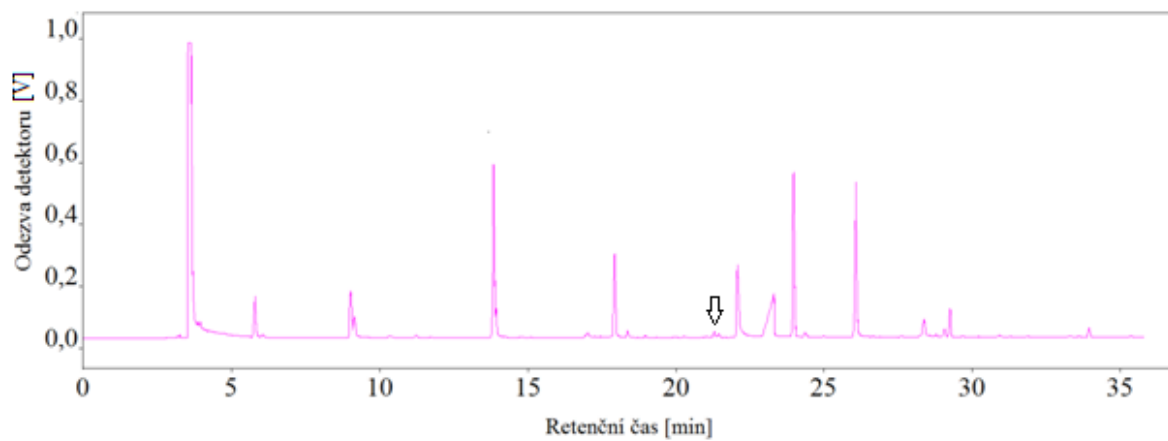
Obrázek VI-12: Chromatogram piva Primátor – Premium lager



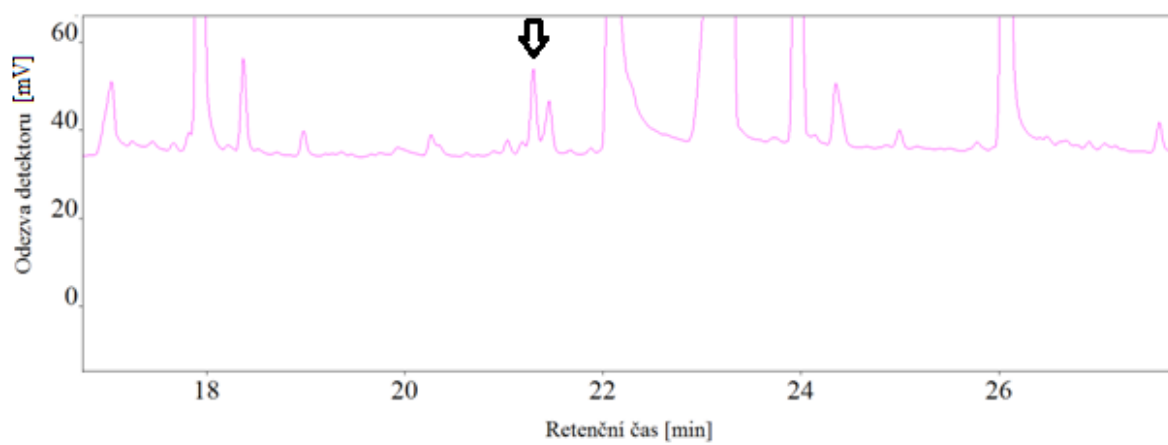
Přibliženo:



Obrázek VI-13: Chromatogram piva Svijany – Svijanský Máz



Přibliženo:



Obrázek VI-14: Chromatogram piva Bakalář – Světlý ležák