

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza linaloolu v pivu s využitím opakované headspace extrakce

Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Houžvičková**  
Osobní číslo: **C19481**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Analýza linaloolu v pivu s využitím opakované headspace extrakce**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na analýzu těkavých složek potravin, a to se zaměřením na jejich kvantitativní vyhodnocení. Popište možnosti využití mikroextrakce tuhou fází (SPME) v kombinaci s metodou plynové chromatografie pro daný účel a prověřte i princip založený na opakované headspace extrakci (Multiple Headspace Extraction – MHE). Zaměřte se především na využití uvedených metod pro analýzu významných složek podílejících se na aromaprofilu piva, a to včetně složek pivovarských surovin.
2. V experimentální části prověřte možnosti vzorkování metodou MHE s využitím metody SPME pro analýzu linaloolu jako ukazatele metody studeného chmelení piva. Za pomoci statistického plánování experimentu nalezněte vhodné experimentální podmínky a tyto aplikujte na reálné vzorky.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

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

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

**Prohlašuji:**

Práci s názvem Analýza linaloolu v pivu s využitím opakované headspace extrakce 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 mou práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 také 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Martina Houžvičková

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. za spolupráci, vstřícnost a cenné rady při vypracování této diplomové práce.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá stanovením linaloolu v pivu s využitím vícenásobné headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí. V teoretické části je popsána historie výroby piva, dále jsou tu uvedeny suroviny potřebné pro výrobu piva, technologie výroby a vše o pivu, mikroextrakční techniky, plynová chromatografie a příklady použití vícenásobné headspace mikroextrakce tuhou fází. Experimentální část se zabývá stanovením linaloolu v reálných vzorcích piv již zmíněnou metodou. Tato mikroextrakční technika byla optimalizována pomocí standardního roztoku linaloolu a vzorku piva. Optimalizovanými parametry byly objem použitého vzorku, doba extrakce, teplota extrakce a doba inkubace. Následně pak byla k analýze reálných vzorků piva využita optimalizovaná mikroextrakční metoda. Na konci jsou obsahy linaloolu ve vzorcích piv vyhodnoceny a porovnány.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

MHS-SPME, plynová chromatografie, pivo, těkavé organické sloučeniny, linalool

## **TITLE**

Analysis of linalool in beer samples using multiple headspace extraction

## **ANOTATION**

This diploma thesis deals with the determination of linalool in beer using multiple headspace solid phase microextraction followed by gas chromatography and mass detection. In the theoretical part there are described history of beer production, together with the specifications raw materials needed for the beer production, production technology and all about beer, microextraction techniques, gas chromatography and principles of multiple headspace solid phase microextraction. The experimental part deals with the determination of linalool in real beer samples by the above-mentioned method. This microextraction technique was optimized using a standard linalool solution and a beer sample as well. The optimized variables were the sample volume, the extraction time, the extraction temperature and the incubation time. Subsequently, the optimized method was applied to real beer samples. Finally, the linalool contents in beer samples are evaluated and compared.

## **KEYWORDS**

MHS-SPME; Gas chromatography; Beer; Volatile Organic Compounds; Linalool

# OBSAH

ÚVOD .....	12
1    TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1.1    Pivo .....	13
1.1.1    Legislativa.....	13
1.1.2    Historie výroby piva .....	13
1.1.3    Suroviny pro výrobu piva .....	14
1.1.4    Sladařství .....	20
1.1.5    Pivovarství .....	24
1.1.6    Aromaprofil piva.....	30
1.1.7    Druhy piv .....	34
1.1.8    Konzumace piva v České republice.....	35
1.2    Klasické postupy vs. mikroextrakční metody.....	37
1.2.1    Mikroextrakce tuhou fází.....	37
1.2.2    Vícenásobná headspace extrakce.....	41
1.3    Plynová chromatografie.....	45
1.3.1    Kolony .....	46
1.3.2    Detektor .....	47
1.3.3    Metody kvantifikace .....	48
1.4    Stanovení těkavých složek potravin – příklady .....	49
1.4.1    Stanovení těkavých složek v kořeni a v bylinách.....	49
1.4.2    Stanovení těkavých volných mastných kyselin v sýrech.....	51
1.4.3    Stanovení aromatických složek v rajčatech .....	53
1.4.4    Stanovení ethylkarbamátu v kyselých okurkách.....	54
1.4.5    Stanovení sloučenin odpovědných za Brettův znak ve vínech .....	55
2    EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	58
2.1    Vzorky .....	58

2.2	Chemikálie.....	60
2.3	Použité přístroje a zařízení.....	60
2.4	Podmínky separace na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem .....	61
2.5	Optimalizace metody opakované headspace mikroextrakce tuhou fází.....	61
2.6	Kalibrace pro metodu opakovaná headspace mikroextrakce tuhou fází .....	63
2.7	Analýza reálných vzorků piv .....	63
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	64
3.1	Volba separačních a detekčních podmínek.....	64
3.2	Vyhodnocení optimalizace metody opakované headspace mikroextrakce tuhou fází .....	64
3.3	Vyhodnocení kalibrace, meze detekce a meze stanovitelnosti.....	70
3.4	Zjištění koncentrace linaloolu v reálných vzorcích piv .....	71
4	ZÁVĚR.....	75
	POUŽITÁ LITERATURA .....	76
	PŘÍLOHY .....	85



# SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A PŘÍLOH

<b>Obrázek 1:</b> Pivo .....	13
<b>Obrázek 2:</b> Chmelové hlávky .....	17
<b>Obrázek 3:</b> Chmel zavěšený na speciální konstrukci .....	17
<b>Obrázek 4:</b> Kvasinka <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
<b>Obrázek 5:</b> Schéma výroby sladu.....	21
<b>Obrázek 6:</b> Zrno ječmene .....	22
<b>Obrázek 7:</b> Schéma výroby piva .....	24
<b>Obrázek 8:</b> Stereoizomery linaloolu.....	32
<b>Obrázek 9:</b> Graf spotřeby piva v ČR v litrech na osobu a rok .....	36
<b>Obrázek 10:</b> DI-SPME a HS-SPME.....	38
<b>Obrázek 11:</b> Manuální uspořádání SPME .....	39
<b>Obrázek 12:</b> Tepelná desorpce u GC a desorpce rozpouštědlem u HPLC .....	39
<b>Obrázek 13:</b> Lineární graf závislosti $\ln A$ vs. $(i - 1)$ .....	44
<b>Obrázek 14:</b> Schéma plynového chromatografu .....	46
<b>Obrázek 15:</b> Umístění stacionární fáze uvnitř kapiláry.....	46
<b>Obrázek 16:</b> Plynový chromatograf GC-2030 s MS-QP2020 NX detekcí v kombinaci s FID .....	61
<b>Obrázek 17:</b> MS spektrum linaloolu .....	64
<b>Obrázek 18:</b> Závislost $\ln A$ na počtu extrakčních kroků (10 extrakčních kroků pro MHE).....	65
<b>Obrázek 19:</b> Závislost $\ln A$ na $i - 1$ .....	66
<b>Obrázek 20:</b> Závislost $\ln A$ na $i - 1$ pro 4 kroky MHE .....	66
<b>Obrázek 21:</b> Vyhodnocení podmínek MHS-SPME s inkubací.....	67
<b>Obrázek 22:</b> Odezvové vhodnostní profily podmínek MHS-SPME .....	68
<b>Obrázek 23:</b> Vyhodnocení podmínek MHS-SPME bez inkubace .....	69
<b>Obrázek 24:</b> Odezvový vhodnostní profil MHS-SPME.....	69
<b>Obrázek 25:</b> Závislost průměrných celkových ploch píků na koncentraci linaloolu ( $n = 3$ ) ..	71
<b>Obrázek 26:</b> Porovnání koncentrace linaloolu v reálných vzorcích piv ( $n = 3$ ).....	73
<b>Obrázek 27:</b> Závislost $\ln A$ na $i - 1$ .....	73
<b>Tabulka 1:</b> Dělení vody podle tvrdosti .....	19
<b>Tabulka 2:</b> Nejčastěji používané stacionární fáze .....	41
<b>Tabulka 3:</b> Vzorky piv.....	58
<b>Tabulka 4:</b> Podmínky MHS-SPME s inkubací .....	62
<b>Tabulka 5:</b> Podmínky MHS-SPME bez inkubace.....	63
<b>Tabulka 6:</b> Klíčové parametry pro MHE postup spolu s $A_T$ .....	67
<b>Tabulka 7:</b> Kalibrace metody MHS-SPME.....	70
<b>Tabulka 8:</b> Průměrné celkové plochy píků a koncentrace linaloolu .....	72
<b>Tabulka 9:</b> Naměřené hodnoty + hodnoty potřebné k výpočtu .....	74
<b>Tabulka 10:</b> Vypočtené hodnoty potřebné ke zjištění celkové plochy.....	74
<b>Příloha I:</b> Optimalizace metody MHS-SPME-GC-MS .....	85
<b>Příloha II:</b> Chromatogramy z měření reálných vzorků piv pomocí MHS-SPME-GC-MS.....	87
<b>Příloha III:</b> Závislost $\ln A$ na $i - 1$ pro reálné vzorky piva .....	93

## SEZNAM ZKRATEK

A.M.U.	Atomová hmotnostní jednotka ( <i>Atomic Mass Unit</i> )
CKT	Cylidrokónické tanky
CW/DWB	Carbowax/divinylbenzen
ČR	Česká republika
DI-SPME	Přímá mikroextrakce tuhou fází ( <i>Direct Immersion Solid Phase Microextraction</i> )
EI	Elektronová ionizace ( <i>Electron Ionization</i> )
FID	Plamenový ionizační detektor ( <i>Flame Ionization Detector</i> )
FFA	Volné mastné kyseliny ( <i>Free Fatty Acids</i> )
GC	Plynová chromatografie ( <i>Gas Chromatography</i> )
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie ( <i>Gas Liquid Chromatography</i> )
GSC	Plynová adsorpční chromatografie ( <i>Gas Solid Chromatography</i> )
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HS	Headspace
HS-SPME	Headspace mikroextrakce tuhou fází ( <i>Headspace Solid Phase Microextraction</i> )
CHZO	Chráněné zeměpisné označení
LOD	Mez detekce ( <i>Limit of Detection</i> )
LOQ	Mez stanovitelnosti ( <i>Limit of Quantification</i> )
MF	Mobilní fáze
MHE	Vícenásobná headspace extrakce ( <i>Multiple Headspace Extraction</i> )
MHS-SDME	Vícenásobná headspace mikroextrakce jednou kapkou ( <i>Multiple Headspace Single Drop Microextraction</i> )
MHS-SPME	Vícenásobná headspace mikroextrakce tuhou fází ( <i>Multiple Headspace Solid Phase Microextraction</i> )
MHS-SPME-GC-FID	Vícenásobná headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a s plamenovým ionizačním detektorem

MHS-SPME-GC-MS	Vícenásobná headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií
MHS-SPME-MS	Vícenásobná mikroextrakce tuhou fází ve spojení s hmotnostní spektrometrií
MS	Hmotnostní spektrometrie ( <i>Mass Spectrometry</i> )
MSD	Hmotnostně spektrometrický detektor ( <i>Mass Spectrometry Detector</i> )
PA	Polyakrylát
PCA	Analýza hlavních komponent ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDMS/CAR	Polydimethylsiloxan/Carboxen
PDMS/CAR/DVB	Polydimethylsiloxan/Carboxen/divinylbenzen
PDMS/DVB	Polydimethylsiloxan/divinylbenzen
PLOT	Pórovitý adsorbent zachycený na stěnách kapiláry ( <i>Porous Layer Open Tubular</i> )
RSD	Relativní směrodatná odchylka ( <i>Relative Standard Deviation</i> )
SCOT	Kapalina zakotvená na nosiči, který je ukotven na stěně kapiláry ( <i>Support Coated Open Tubular</i> )
SF	Stacionární fáze
SPME	Mikroextrakce tuhou fází ( <i>Solid Phase Microextraction</i> )
TCD	Tepelně-vodivostní detektor ( <i>Thermal Conductivity Detector</i> )
WCOT	Tenký film kapaliny zakotvený na stěnách kapiláry ( <i>Wall Coated Open Tubular</i> )

## ÚVOD

Pivo je nápoj, který se pil již v dávných dobách (zhruba 7000 let před naším letopočtem). Jeho objev byl zcela náhodný. Jeho celkové aroma a chuť se ovšem od dnešního piva značně lišily. Dnes musí pivo mít přesně definované složení a musí splňovat určité požadavky na jakost. Pivo je v celém světě oblíbeným nápojem a Česká republika se řadí na přední příčky v konzumaci piva. Vyrobí se přes 20 miliónů hektolitřů piva.

Aromaprofil piva je dán obsahem těkavých látek. Tyto látky pocházejí hlavně ze surovin, jež jsou potřeba k jeho výrobě. Některé však vznikají až při výrobě piva. Nejvýznamnějšími složkami jsou chmelové silice a pro tuto diplomovou práci hlavně linalool. Ten se vyskytuje ve větším množství převážně v pivech, která jsou chmelená za studena. To znamená, že chmel se přidává jak v průběhu chmelovaru, tak hlavně během studené části výroby, jako jsou hlavní kvašení a zrání.

Cílem této práce bylo prověření metody vícenásobné headspace mikroextrakce tuhou fází ke stanovení linaloolu ve vzorcích piva. Byla proměřena piva chmelená klasickým způsobem a chmelená za studena. Následně pak byla tato piva porovnána.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Pivo

Pivo (obrázek 1) je pěnivý alkoholický nápoj, který se vyrábí ze sladu, vody a chmelu pomocí mikroorganismů (pivovarských kvasinek). Celý proces výroby piva je velmi složitý, časově náročný a vyžaduje značné zkušenosti. Pivo je vyráběno v pivovarech a technologie výroby se sestává z několika úseků, které jsou popsány níže. Tyto technologie zahrnují řadu složitých mechanických, fyzikálně-chemických a biochemických procesů [1–4].



Obrázek 1: Pivo [5]

### 1.1.1 Legislativa

Následující text v uvozovkách je citací z vyhlášky č. 248/2018 Sb. „*Pivo je pěnivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových výrobků, který vedle kvasným procesem vzniklého ethanolu a oxidu uhličitého, obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu. Slad lze do výše jedné třetiny hmotnosti celkového extraktu původní mladiny nahradit extraktem zejména cukru, obilného škrobu, nesladovaných obilovin nebo rýže. U piv ochucených může být obsah alkoholu zvýšen přidávkem lihovin nebo ostatních alkoholických nápojů*“ [6].

### 1.1.2 Historie výroby piva

První zmínka o pivu se objevila asi 7000 let před našim letopočtem v Mezopotámii, zde ho připravovali Sumerové. Objev piva byl zcela náhodný a existují tři hlavní teorie, jakým způsobem pivo vzniklo. První říká, že někdo omylem nechal nádobu s obilnou kaší před domem. Do nádoby napršelo a poté působením slunce obsah v nádobě po určité době zkvasil. Druhá teorie tvrdí, že někdo rozkousal chléb pro nemocného a vložil ho do nádoby s vodou

a opět teplo v místnosti způsobilo za nějaký čas zkvašení. Třetí teorie uvádí, že někdo dal těsto na chléb do vody a nechal jej tam. Teplo se opět postaralo o vykvašení. Tyto teorie spojuje jedno, a to že se vždy našla nějaká osoba, která tento vzniklý nápoj ochutnala a zjistila jeho příznivé účinky. Díky tomu se pak slad nebo ječné chleby nechávaly úmyslně zkvasit a započala výroba piva, kterému Sumerové říkali „kaš“. Pivo vyrobené v této době bylo nefiltrované a bylo zakalené. K výrobě piva se nepoužíval chmel (s chmelem poprvé přišli Babyloňané). Hořkosti piva se proto dosahovalo pražením ječného chleba v horkém popelů [1, 3, 7–9].

Ve středověku se rozvíjely hlavně klášterní pivovary. Důležitá byla produkce zejména z královských měst, kterým panovník uděloval různá privilegia, například právo várečné a mílové. Podle těchto práv mohl každý měšťan vařit a točit pivo. Měšťané byli obvykle sdružení do cechů. Cechy se staraly o kvalitu vařeného piva. Tyto cechy pak měly díky mílovému právu zaručené, že se do jedné míle od městských hradeb nesmí vyrábět jiné pivo. Byli tím pádem chráněni před konkurencí [3, 8, 9].

Nejstarším českým pivovarem byl Břevnovský klášterní pivovar, který byl založen roku 993. Jeho existenci nepřímo dokládá listina z poloviny 13. století. V této listině papež Innocenc IV. nařizoval zrušit zákaz sv. Vojtěcha pražským měšťanům vařit v době neúrody pivo na prodej. To bylo možné pouze v klášterním pivovaru [10].

Pivovary se v České republice (ČR) postupně rozvíjely a dnes je jich zde více než 400 [3].

### **1.1.3 Suroviny pro výrobu piva**

Jak již bylo v této práci zmíněno, výroba piva je velmi složitý proces. Je důležité dodržovat technologické postupy a rovněž je důležitá i kvalita používaných surovin. Principem výroby je rozštěpení složitých cukrů, které jsou přítomny v obilných zrnech, na jednoduché cukry. Jednoduché cukry se následně dají zkvasit [1, 11].

Mezi suroviny potřebné pro výrobu piva se řadí slad, voda, chmel a pivovarské kvasinky. Používají se také cukernaté a škrobnaté náhražky sladu [1, 11, 12].

#### **1.1.3.1 Slad**

Slad je za specifických podmínek naklíčená a usušená obilovina (nejčastěji speciálně vyšlechtěné druhy ječmene, případně pšenice). Je důležitou surovinou, protože rozhoduje o chuti, barvě, aromatu piva a je nositelem plnosti piva [1, 11].

Díky úpravám technologických podmínek se připravují různé druhy sladů s konkrétními speciálními vlastnostmi. Výroba sladu zahrnuje následující kroky: čištění a třídění, máčení,

klíčení, hvozdění zeleného sladu, odkličování, leštění, balení a expedici hotového sladu. Slad se vyrábí se z ječmene, pšenice, ovsa, žita, kukuřice, rýže, čiroku, tritikale, pohanky, prosa, brambor atp. Nejčastěji se ale vyrábí z jarního dvouřadého, nícího ječmene *Hordeum distichum* varieta *nutans*, čeled' lipnicovité (*Poaceae*) [1, 13–15].

Slady se rozdělují na:

- **světlé slady plzeňského typu**
  - slouží pro výrobu piv typu ležáků, konzumních piv a speciálních piv s různou koncentrací původní mladiny;
  - vyznačují se nižší hodnotou barvy, přiměřeným proteolytickým rozluštěním a aktivitou amylolytických enzymů;
- **polotmavé slady vídeňského typu**
  - jsou to přechodné typy mezi světlými a tmavými slady, jsou nositeli zlatavé barvy a výrazné sladové vůně a chuti;
- **tmavé slady mnichovského typu**
  - slouží pro výrobu tmavých piv
  - uvádějí se také jako slady bavorské;
  - obsahují více bílkovin, mají nižší extraktivnost a aktivitu enzymů;
  - projevují se hnědo-zlatavou barvou piva, karamelovou chutí a vůní;
- **pšeničné slady**
  - slouží pro výrobu převážně svrchně kvašených piv (např. pšeničných piv nebo piv typu Lambic);
  - slady z pšenice seté (*Triticum aestivum*, čeled' lipnicovité, *Poaceae*);
  - pšeničné bílkoviny vytváří typický zákal pro pšeničná piva, dále také typickou chuť a vůni piva, vyznačují se vyšší pěnivostí;
- **speciální slady**
  - karamelové slady – mají vysoký obsah barevných a aromatických látek, využívají se pro výrobu tmavých a speciálních piv, dle barvy jsou rozdělovány na světlé, střední, normální, tmavé a porterové, způsobují hnědou barvu piva, jeho vysokou plnost a typickou chuť (čokoládová nebo karamelová);
  - barevné slady – využívají se pro výrobu silně tmavých piv, u kterých nelze dosáhnout barvy pomocí běžného tmavého sladu (do této skupiny se řadí čokoládový slad, v pivu se projevuje velmi tmavě hnědou barvou a opět typickou chutí ⇒ pražené, kávové tóny s kyselou, suchou a svíravou chutí);

- nakuřované slady – slouží pro výrobu whisky skotského typu, vyrábí se ve specializovaných sladovnách z ječného sladu, který je sušený přímými spaliny rašeliny;
- další speciální slady – melanoidinové, diastické, proteolytické (kyselé), čirokové a triticalové slady [1, 14].

### 1.1.3.2 Náhražky sladu

Náhražky sladu neboli surogáty se používají hlavně z ekonomických důvodů, dále se užívali v dobách a místech s nedostatkem sladu pro výrobu piva, nebo pro docílení požadovaných vlastností konkrétních druhů piv. Také se využívají pro výrobu bezlepkového piva z rýže a čiroku. Jak již bylo výše zmíněno, využívají se škrobnaté a cukernaté náhražky. V přiměřeném množství nemění senzorický profil, ale dochází k poklesu barvy. Náhražky sladu se při výrobě piv ve světě používají až z 80-90 % (Amerika – kukuřice, Afrika – čirok nebo Asie – rýže). To ale neplatí u tradičních zemí střední Evropy, kde se tyto náhražky moc nepoužívají. Používání těchto náhražek je v jednotlivých státech omezeno legislativou [1, 14].

Škrobnaté náhražky sladu jsou suroviny, které mají vysoký obsah škrobu nebo polysacharidů. Mezi tyto náhražky se řadí rýže, kukuřice, nesladovaný ječmen a nesladovaná pšenice. Lze také použít čirok, triticales, pohanku a oves. Použitím rýže může docházet ke zvýšení pěnivosti piva.

Cukernaté náhražky sladu jsou směsi sacharidů rozpuštěných ve vodě (sacharóza – řepný a třtinový cukr, dále invertní cukr). Dodávají se ve formě sirupů. Přidávají se do mladiny. Jejich použitím se snižuje obsah polyfenolových, dusíkatých a růstových látek. Zvyšuje se obsah alkoholu v pivu a snižuje se jeho pěnivost. Při vyšším přídávku se snižuje i plnost piva [14].

### 1.1.3.3 Chmel

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) z čeledi Cannabinaceae se řadí mezi základní pivovarské suroviny. V pivovarství se ho ze všech surovin používá nejméně, ale podstatně ovlivňuje chuť a vůni piva. Tato rostlina je velmi náročná na světlo, vláhu, teplotu a roste v mírných klimatických podmínkách severní polokoule. V České republice se pěstuje na Žatecku, Tršicku a Ústecku. V pivovarství se využívají pouze samičí rostliny, samčí se používají ke šlechtění odrůd.



Hlavní části chmelové rostliny jsou:

- **kořenová soustava** – mohutně vyvinutá (kořeny zasahují až do hloubky 6 metrů), základem je zdřevnatělá babka, která má životnost cca 25 let;
- **réva s pazochy** – vyrůstá každý rok z babky a přežívá jedno vegetační období, réva se točí pravotočivě podle vodícího drátku, růst je velmi rychlý (až 30 cm za den v létě), dorůstá do výšky 7–8 metrů, z révy vyrůstají postranní větévky (pazochy), ze kterých se vyvíjí květenství;
- **listy** – mají velkou plochu, mohou dosahovat 7–22 m<sup>2</sup> na jednu rostlinu;
- **květenství** – to se vyvíjí během vegetace v **chmelové hlávky** (obrázek 2) [16–18].



**Obrázek 2:** Chmelové hlávky [19]

Chmelová rostlina se pěstuje zavěšená na speciální konstrukci (obrázek 3). Tato konstrukce obsahuje vodící drátek, podle něhož se rostlina pravotočivě pne. Začíná kvést po dosažení maximální výšky (konec června až začátek července). Květenství trvá 15 až 30 dnů, a to v závislosti na dané odrůdě. Květy se pak přeměňují na plody (= hlávky vejčitého tvaru), které se následně sklízí [16–18].



**Obrázek 3:** Chmel zavěšený na speciální konstrukci [19]

Chmelové odrůdy se rozdělují podle:

- **barvy chmelové révy**
  - červeňáky a zeleňáky;
  - červeňáky – jsou pěstované v Evropě (Česká republika, Německo, Slovinsko a Polsko);
  - zeleňáky – jsou pěstované v Anglii a v zámoří (USA a Austrálie);
- **délky vegetační doby zrání**
  - rané, polorané a pozdní;
- **obsahu chmelových pryskyřic a chmelového aroma**
  - jemné aromatické chmele – vyznačují se nižším obsahem chmelových pryskyřic a příjemným aroma;
  - vysokoobsažené hořké chmele – mají vysoký obsah chmelových pryskyřic a méně příjemné aroma;
- **obchodovatelných skupin**
  - tradiční aromatické chmele;
  - nové aromatické chmele;
  - šlechtěné aromatické chmele;
  - kvalitní hořké chmele;
  - hořké chmele [1].

Nejpodstatnějšími složkami chmele jsou chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly, které utvářejí organoleptické vlastnosti piva. Chmelové pryskyřice se skládají z různých látek, z nichž jsou nejdůležitější  $\alpha$ -hořké kyseliny (humulon, kohumulon a adhumulon) a  $\beta$ -hořké kyseliny (lupulon, kolupulon a adlupulon). Tyto kyseliny mají konzervační a baktericidní účinky, přispívají k charakteristickému aroma piva a ovlivňují pěnivost piva. Chmelové silice tvoří jemné chmelové aroma. Polyfenoly přispívají k plnosti a řízu piva [18].

V dnešní době se chmelové hlávky moc nepoužívají. Chmel se zpracovává na různé chmelové výrobky, jako jsou například chmelové prášky, granule, pelety a chmelové extrakty. Tyto výrobky se snáze skladují a mají poměrně vyšší stabilitu než klasické chmelové hlávky [1].

#### **1.1.3.4 Voda**

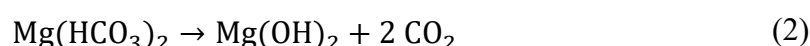
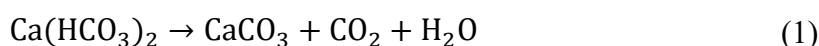
Voda patří mezi nejdůležitější suroviny jak v pivovarství, tak i ve sladařství. Přímo ovlivňuje kvalitu piva. Pivovarství se řadí mezi průmyslová odvětví, která spotřebovávají nejvíce vody.

V tomto odvětví se voda dělí podle účelu použití do třech skupin. První skupinou je varná voda, která se využívá pro přípravu piva. Musí splňovat požadavky na pitnou vodu (zdravotně a hygienicky nezávadnou). Její kvalita má vliv na průběh výroby, základní kvalitu a specifické vlastnosti určité značky piva. Druhou skupinou je mycí a sterilizační voda, ta nesmí obsahovat mikroorganismy. Tato voda se doporučuje chlorovat. Poslední třetí skupinou je provozní voda. Musí odpovídat standardům stanoveným pro jednotlivé operace a zařízení [14, 21–23].

V dřívějších dobách pivovary, a i sladovny, využívaly k zásobování vlastní studny. To ale v dnešní době není možné, kvůli stále se zvyšující spotřebě vody a také s ohledem na pokles hladin vody ve studních. Proto se využívají další zdroje, jako jsou například pramenité vody, povrchové vody a vody z městských vodovodních řádů [14, 21–23].

Přírodní vody obsahují tuhé látky, plyny a suspendované látky. Mezi nejpodstatnější rozpuštěné látky ve vodě patří vápenaté a hořečnaté soli, které tvoří tvrdost vody [22].

Tvrdost vody je v tomto průmyslu hlavním parametrem, určuje využití vody pro určité technologické aplikace. Dělí se na tvrdost stálou (nekarbonátová) a tvrdost přechodnou (karbonátová). Stálá tvrdost se skládá z hořečnatých a vápenatých solí, které jsou stálé (chloridy, křemičitany a sírany). Přechodná tvrdost se skládá z hydrogenuhličitanů, které lze varem částečně, nebo úplně rozložit (rovnice 1 a 2) [1, 22].



Celková tvrdost vody je pak tvořena součtem přechodné tvrdosti a stálé tvrdosti. Vyjadřuje se v milimolech (mmol) na litr (l) = mmol/l. Podle hodnoty celkové tvrdosti se voda v pivovarství dělí na (tabulka číslo 1) [22]:

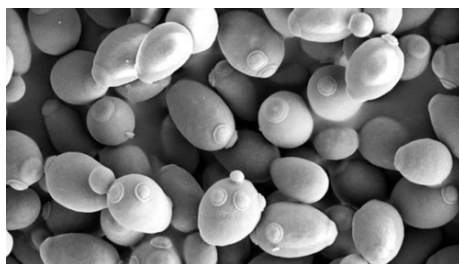
**Tabulka 1:** Dělení vody podle tvrdosti [22]

Voda	mmol/l
měkká	do 1,3
středně tvrdá	1,3–2,5
tvrdá	2,5–3,8
velmi tvrdá	> 3,8

### 1.1.3.5 Pivovarské kvasinky

Pivovarské kvasinky patří mezi důležité komponenty pro výrobu piva. Bez těchto mikroorganismů by se nikdy nevyrobil žádný kvašený nápoj. Pro výrobu piva se používají převážně kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* (obrázek 4). Tyto kvasinky se řadí mezi

jednobuněčné houby. Jsou mírně oválného tvaru a náleží k fakultativně anaerobním mikroorganismům (jejich hlavní činností je fermentace neboli kvašení). Pivovarské kvasinky jsou také definovány jako kulturní kvasinky, které jsou používány k produkci spodně, nebo svrchně kvašených piv. Kvasinky svrchního kvašení pracující při teplotách 15–20 °C se nazývají *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*. Používají se např. pro výrobu piv typu „porter“. Po dokončení kvašení jsou vzniklým oxidem uhličitým vynášeny na hladinu, kde tvoří tzv. deku. Kvasinky spodního kvašení se nazývají *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum*, nebo *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis*. Pracují při teplotách 5–10 °C. Používají se pro výrobu piva plzeňského typu a po ukončení kvašení usedají na dno kvasných nádob [3].



**Obrázek 4:** Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* [24]

Proces kvašení se skládá ze dvou fází (aerobní a anaerobní). Při první, aerobní fázi, (za přístupu kyslíku) se kvasinky hlavně rozmnožují. Při druhé, anaerobní fázi, kdy kvasinky již spotřebovaly kyslík, dochází za účasti enzymů k přeměně cukrů v mladině na alkohol a oxid uhličitý. Také vznikají další produkty (glycerol, acetaldehyd, kyselina octová, diacetyl) a uvolňuje se teplo (rovnice 3) [1, 3, 22].

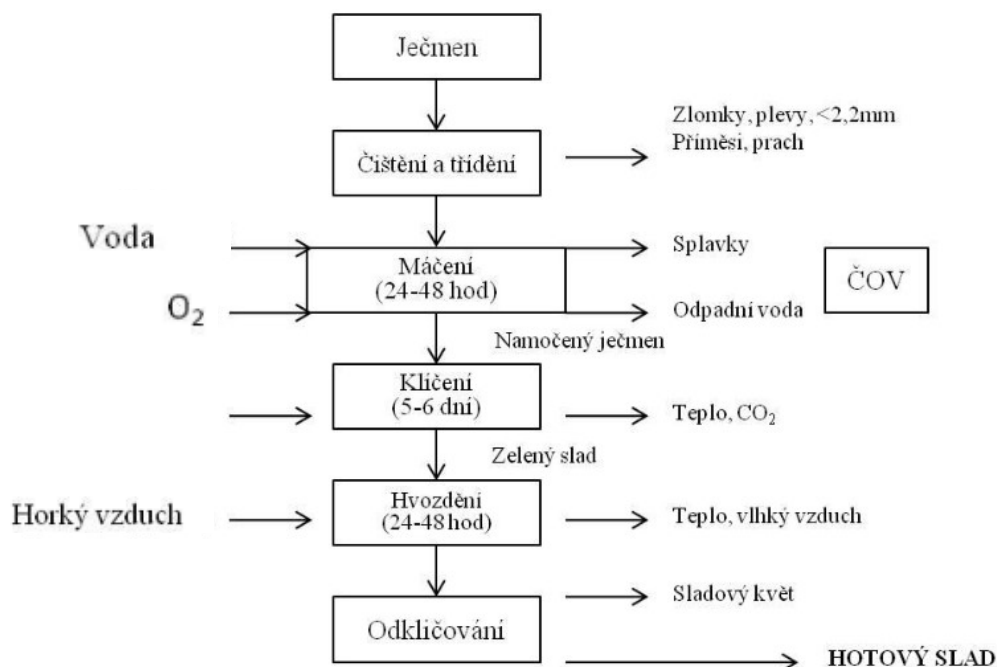


#### 1.1.3.6 Pomocné suroviny

V pivovarství se kromě základních surovin využívají také pomocné suroviny. Mezi tyto suroviny patří například enzymové přípravky, barvicí prostředky, přípravky snižující, nebo zvyšující pěnivost piva, sladidla a stabilizační přípravky. Tyto suroviny se používají ke zlepšení kvality vyráběného piva [1].

#### 1.1.4 Sladařství

Sladařství je odvětví potravinářského průmyslu, které se zabývá výrobou sladu pro pivovarské účely. Slad se vyrábí z ječmene řízeným procesem klíčení a hvozdění. Tento slad obsahuje potřebné enzymy, aromatické látky a barevné látky. Ty jsou potřebné pro výrobu určitého druhu piva. Ve sladařství se také vyrábějí sladové výtažky. Schéma celého procesu je znázorněno na obrázku 5 [18, 25].



**Obrázek 5:** Schéma výroby sladu [26]

#### 1.1.4.1 Čištění a třídění ječmene

Cílem čištění je zbavení se prachu, nečistot a příměsí. Ječmen se pak třídí dle velikosti a jakostních znaků. Mezi základní vybavení pro čištění a třídění patří: aspirátory, triéry, třídíče, magnety, jímače prachu, odklasňovače a přečišťovací triéry. Po vyčištění a roztrídění se ječmen uskládá v silech. Tato sila jsou vybavena nejen provzdušňovacím zařízením, ale i zaplynovacím zařízením, které hubí skladištní škůdce. Provzdušňovací zařízení jsou potřeba, protože zrna ječmene spotřebovávají intenzivním dýcháním část svých bezdušíkatých organických látek a dochází k tvoření oxidu uhličitého. Oxid uhličitý je nutné od zrn ječmene odvést pryč větráním. Zplodiny jsou pro klíčky velmi škodlivé. Při uskladnění v silech je nutné kontrolovat vlhkost a teplotu. Teplota a vlhkost mají značný vliv na dýchání. Optimální vlhkost při skladování je 15 % a optimální teplota je 20 °C. Při těchto parametrech je intenzita dýchání malá, díky tomu nedochází k značným ztrátám na zru ječmene [4].

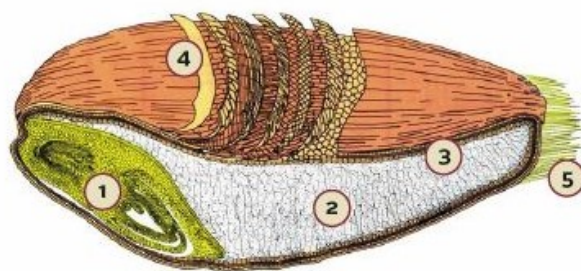
#### 1.1.4.2 Máčení ječmene

Máčení ječmene slouží ke zvýšení obsahu vody v zru. Díky tomu dochází k zahájení enzymových reakcí a ke klíčení ječného zrna. Tento krok se řadí mezi nejdůležitější kroky výroby sladu, který rozhoduje o jeho budoucí kvalitě. Při tomto úkonu dochází k odstranění splavek a lehkých nečistot. Ječné zru se řádně umyje a vyloučí se z něj nežádoucí látky. Celý tento krok probíhá v náduvnících. Náduvník je buď válcového, nebo čtyřhranného tvaru. Má spádový kónus dna 45°, a to z toho důvodu, aby mohla ječná zru samovolně vytékat ven.

Nesmí v něm být vysoká vrstva zrn, jelikož je třeba zachovat rovnoměrný průstup vzdušného kyslíku, jinak by docházelo k prodlužování doby máčení. Obsah vody během procesu máčení se zvýší z 12 % až na více než 40 %. Ječné zrnko zvýší svůj objem až 1,5krát. Tato voda je velmi důležitá pro klíčení a průběh enzymových reakcí [13, 18, 27, 28].

### 1.1.4.3 Klíčení ječmene

Klíčení ječmene je fyziologický proces, kterého se dosahuje umělým modelováním podmínek přirozeného klíčení vhodnou vláhou, teplotou a přístupem kyslíku. Při tomto procesu dochází k tomu, že se v zárodečné části ječného zrna vyvíjejí zárodky listů a kořínků. Využívají se k tomu zásobní látky z endospermu (obrázek 6). Dále dochází ke změnám vnitřních znaků ječného zrna [22, 29].



- 1) klíček
- 2) endosperm
- 3) aleuronová vrstva
- 4) obalové vrstvy
- 5) trichomy (chlupy)

**Obrázek 6:** Zrnko ječmene [30]

Cílem je aktivace a tvorba příslušných enzymů, dále pak dosažení požadovaného rozluštění (neboli vnitřního rozluštění). Zvýšení aktivity, respektive syntéza nových enzymů, je vyvolána činností fytohormonů. Tyto hormony putují přes endosperm do aleuronové vrstvy. V aleuronové vrstvě pak vznikají nové enzymy (fosfatázy, cytázy, proteázy a amylázy) a volné aminokyseliny. Působením enzymů dochází ke štěpení rezervních látek, zvyšuje se rozpustnost a lužitelnost endospermu. Všechny enzymové reakce jsou ovlivňovány stupněm domočení ječmene, přístupem kyslíku ke klíčkům (zajištění intenzivního dýchání zrna) a teplotou v hromadě [22, 29].

Je důležité znát optimální vlhkost při klíčení, neboť při nízké vlhkosti zrnko klíčí pomalu a zavadá. Nadbytkem vlhkosti zase dochází k přehřívání hromad, přelustění a zvyšují se sladovací ztráty. Optimální teplota pro klíčení ječmene je 14–18 °C v hromadě. Tato teplota se ovšem liší podle druhu vyráběného sladu. Hromady se musí často přehazovat, nebo provětrávat, aby byl oxid uhličitý vznikající při klíčení dostatečně odvětrán. Doba klíčení trvá 4–5 dní [4, 13].

Vzniklým produktem je zelený slad. Vyráběný slad by měl mít zdravou vůni, správně vyvinutou střílku, měl by být dobře rozluštěn a mít mírně zavadlé kořínky. Dle vyvinuté střílky se slady dále dělí na krátké (střílka do 1/3–1/2 délky zrna) a dlouhé slady (střílka nad 3/4 délky zrna) [22].

Celý proces klíčení se uskutečňuje buď na humnech, nebo v pneumatických sladovnách. Humna jsou obrovské větrané místnosti, zde je klíčící ječmen rozprostřen na zemi. Sladování na humnech má velké nevýhody, a to v malé kapacitě, ve značné potřebě lidské práce a velkou zastavěnou plochou. Pneumatické sladovny se rozdělují na bubnové, skříňové a věžové. Tyto sladovny jsou vysoce automatizované, mají větší kapacitu a není zde zapotřebí značné lidské práce. Ale dochází ke zvýšení spotřeby energie [13, 22].

#### **1.1.4.4 Hvozďení**

Hvozďení (= sušení) je posledním krokem při výrobě sladů. Při tomto ději dochází ke značnému snížení obsahu vody v zeleném sladu – pod 4 % u světlých sladů a na 2 % u tmavých sladů. Dochází k zastavení vegetačních pochodů, ale zůstává zachována enzymová aktivita. Vytváří se chuťové, oxidoredukční a barevné látky. Tyto látky tvoří charakter sladu [25, 31, 32].

Hvozďení lze rozdělit do dvou stupňů. Prvním stupněm je předsoušení. Při předsoušení se řízeným a šetrným sušením snižuje obsah vody v zeleném sladu. Probíhá v nadbytku vzduchu při teplotě 20–60 °C. Dobíhají zde biochemické procesy. V dalším stupni se zvyšují teploty a slad se dotahuje. Toto probíhá ve slabém proudu horkého vzduchu při teplotě 60–80 °C pro světlý slad, nebo při 60–105 °C pro tmavý slad [22, 32, 33].

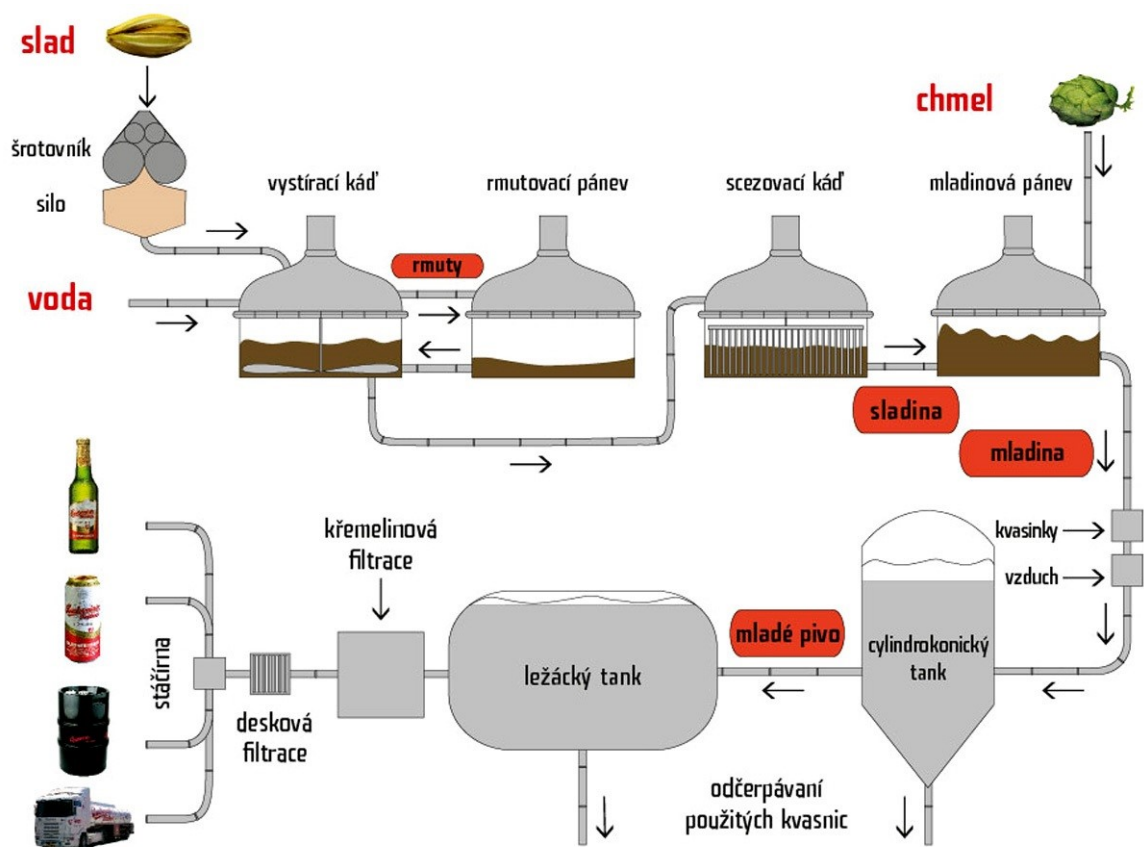
Při hvozďení se rozeznávají tři fáze, a to z hlediska biochemických a chemických změn. První fáze se nazývá růstová. Ta probíhá do teploty 40 °C. Obsah vody v zrně je větší než 20 %. Zrno je schopné ještě klíčit, rostou kořínky a střílka. Druhá fáze je enzymová. Enzymová fáze probíhá při teplotě 40–60 °C. Obsah vody v zrně je menší než 20 %. V této fázi dochází k zastavení vegetačních procesů, ale enzymové reakce dále pokračují. Poslední, třetí fáze, se nazývá chemická. Probíhá při teplotách větší než 60 °C. Obsah vody je menší než 10 %. Při chemické fázi jsou zastaveny veškeré enzymové reakce. Probíhají zde chemické reakce, které vedou ke tvorbě aromatických, chuťových a barevných látek [4, 31].

Proces hvozďení se upravuje dle: druhu vyráběného sladu, obsahu vody v zeleném sladu a typu hvozdu. Světlý a tmavý slad se tedy hvozdí rozdílným postupem [4].

Po ukončení hvozďení se slad třídí, zbavuje se kořínků (sladový květ), prachu a poškozených zrn. Tento slad je pak uskladněn v silech [4, 13, 33].

### 1.1.5 Pivovarství

Pivovarství se řadí mezi potravinářské biotechnologie. Finálním výrobkem je tedy pivo, které se vyrábí v pivovarech. Výroba piva se skládá ze tří úseků, které zahrnují složité mechanické, biochemické a fyzikálně-chemické procesy. První fází je výroba mladiny. Druhá fáze obsahuje kvašení mladiny a dokvašování mladého piva. A ve třetí fázi se provádí závěrečné úpravy a stáčí se zralé pivo. Schéma celého technologického postupu výroby piva je uvedeno na obrázku 7 [18, 25, 33–35].



Obrázek 7: Schéma výroby piva [36]

#### 1.1.5.1 Šrotování

Šrotování je technologická operace, jejímž úkolem je mechanické rozdrčení sladového zrna. Cílem je dokonale vymlít endosperm sladu na vhodný poměr hrubších a jemných částic. Musí se zachovat celistvost pluch, protože ty slouží jako filtrační materiál při scezování. Poměr částic ovlivňuje rychlost následujících procesů, jako je například rmutování, nebo scezování. Platí, že šrotování se musí přizpůsobit zařízení, které má pivovar pro scezování [14].



Ke šrotování se používají kladívkové mlýny a válcové šrotovníky obsahující dva, čtyři, pět, nebo šest válců. Slad se v tomto zařízení rozemele na šrot. Šrotování se provádí za sucha, za mokra nebo kondiciovaně (tzn. zvlhčený párou). Velikost částic také ovlivňuje činnost sladových enzymů. Jemný šrot má lepší přístup enzymů k jednotlivým částem sladu. Z toho vyplývá, že když je slad hůře rozluštěn, musí se šrotovat co nejjemněji. To není úplně vhodné, protože jemné částice způsobují problémy při scezování (ucpávání filtračních kanálků) [14, 33].

### **1.1.5.2 Vystírání**

Vystírání je proces, při kterém se smíchává sladový šrot (eventuelně náhražky sladu) s hlavním nálevem varné vody [1, 4].

Hlavním nálevem se rozumí množství vody použité na vystírání. Provádí se studená a teplá vystírka. Při studené vystírce má teplota vody méně než 20 °C a při teplé vystírce 35–38 °C. Hlavní nálev u obou vystírek se rozděluje do dvou podílů. První podíl nálevu se smíchá se sladovým šrotem. Nálev má teplotu příslušného postupu vystírky. Poté se přidá druhý podíl nálevu (= horká voda). Pomocí horké vody se provede zapárka. Dále se využívá následný nálev, což je voda potřebná pro vyslazení mláta v průběhu scezování a také pro naředění předku (= zfiltrovaný roztok extraktu sladu) na požadovanou koncentraci mladiny. Použité množství vody na várku (hlavní a následný nálev) je větší než množství vyráběné mladiny. Doba vystírání se pohybuje od 10 do 30 minut v závislosti na použitém postupu vystírání. Vzniklým produktem je tzv. vystírka [1, 4].

### **1.1.5.3 Rmutování**

Rmutování je proces sloužící k přípravě sladiny. Toho se dosahuje postupným vyhříváním vystírky na jednotlivé rmutovací teploty. Ty musí odpovídat optimálním teplotám pro činnost enzymů. Cílem je rozštěpit a převést optimální podíl extraktu surovin do roztoku. Při rmutování se uplatňují chemické, fyzikální, mechanické a enzymové děje. Rozhodující činností je činnost kyselinotvorných, amylolytických a proteolytických enzymů. Dochází ke štěpení škrobu a bílkovin [25, 31, 35].

Štěpení škrobu se uskutečňuje ve třech fázích:

- bobtnání a zmazovatění škrobu – teplota nad 50 °C;
- ztekucení škrobu – hlavní funkci má  $\alpha$ -amyláza;
- zcukření škrobu – hydrolytickým působením komplexu amyláz ( $\alpha$ -amyláza a  $\beta$ -amyláza).

Komplex amyláz štěpí sladový škrob na různé podíly jednotlivých cukrů ve výsledné sladince (sacharóza, hexózy, maltóza, nižší a vyšší dextriny). Mezi důležité faktory na činnost amyláz se řadí teplota a pH rmutu. Při teplotě  $>65$  °C se začíná inaktivovat  $\beta$ -amyláza a při teplotě 80 °C  $\alpha$ -amyláza. Optimální teplota je tedy mezi 60–65 °C, kdy se vytváří nejvyšší koncentrace zkvasitelných cukrů. Dále pH rmutu ovlivňuje zcukření. Při poklesu pH z 5,8 na 5,4 dochází k omezení činnosti  $\alpha$ -amylázy.

Štěpení bílkovin probíhá rychleji při sladování než při rmutování. Při rmutovacím procesu přechází přímo do roztoku rozpustné dusíkaté látky, které se štěpí proteolytickými enzymy. Optimální teplota štěpení je mezi 40–60 °C [25, 31, 35].

Důležité teploty při rmutování jsou:

- 35–38 °C = kyselinotvorná teplota;
- 45–55 °C = peptonizační teplota;
- 60–65 °C = nižší cukrotvorná teplota;
- 70–75 °C = vyšší cukrotvorná teplota;
- 78 °C = nejvyšší cukrotvorná teplota, odřmutovací teplota.

Pro rmutování se využívá buď dekokční postup, nebo infuzní postup. Dekokční postup rmutování je založen na povařování dílčích rmutů. Podle počtu rmutů se dělí na: jedno-, dvou- a třírmutové postupy. Nejčastěji využívaným postupem je dvourmutový postup. Při infuzním postupu rmutování dochází k rozpuštění a štěpení extraktu sladu s dlouhodobějším účinkem enzymů bez poškození rmutu [25, 31, 35].

#### **1.1.5.4 Scezování**

Scezování je proces následující pro rmutování a slouží k oddělení roztoku extraktu, tj. sladin. Sladina se odděluje od tuhého podílu zcukřeného rmutu, tj. mláta. K scezování se využívají scezovací kádě. Tyto kádě jsou vybaveny dvojitým dřevěným dnem a systémem odvodných trubek. Trubky jsou spojeny s kohouty scezovací baterie. V daleko menší míře se využívají sladinové filtry.

Během scezování ve scezovací kádě se přirozenou filtrací odděluje sladina od mláta. Finálním produktem je tzv. předek [33, 37].

#### **1.1.5.5 Vyslazování mláta**

Vyslazování mláta se provádí pomocí horké vody při teplotě 75 °C. Tento krok je zaveden proto, aby se z mláta vyloučily poslední zbytky rozpustného extraktu. Po ukončení tohoto kroku vznikne tzv. výstřelek. Většinou se vyslazují dva, nebo tři výstřelky, které se spolu s předkem

shromažďují v mladinové pánvi. V mladinové pánvi dochází k pozvolnému zahřívání tak, aby se po ukončení scezování sladina začala co nejdříve vařit [37].

#### 1.1.5.6 Chmelovar

Chmelovar je vaření mladiny s chmelem. Cílem tohoto děje je zakoncentrování mladiny (odpaření přebytečné vody), sterilizace, koagulace vysokomolekulárních dusíkatých látek, inaktivace enzymů, převod hořkých látek chmelu do roztoku, zvýšení acidity, tvorba chuťových, barevných, aromatických a redukujících produktů Maillardových a doprovodných reakcí. Chmel se přidává po dávkách (např. natřikrát) do mladiny kvůli dosažení příslušného aroma a hořkosti piva. Dávky chmele se řídí podle toho, jaké pivo se vyrábí [31, 38].

Postup chmelovaru se řídí určitými kritérii. Mezi ně patří druh vyráběného piva, vybavení varny a kvalita surovin. Chmelovar trvá 100–120 minut a finálním produktem je mladina. Ta musí svým složením odpovídat vyráběnému pivu.

Po dokončení chmelovaru se musí odstranit zbytky chmele cezením. Získaná mladina se pak dále musí ještě technologicky upravit, než se nechá zakvasit. Separují se hrubé kaly, chladí se mladina (na 5–7 °C), separují se jemné kaly, a nakonec se musí zchlazená mladina provzdušnit sterilním vzduchem [31, 38].

Chmelení je obohacení mladiny o hořké chmelové látky přidáním chmele, nebo chmelových výrobků. Dříve se většinou celé množství chmele přidávalo do sladiny na začátku chmelovaru, a to z toho důvodu, aby veškerá hořkost z něj přešla do vyráběného piva. Tento postup sice vedl k vyšší hořkosti, ale chmel ztratil hodně svého aromatu. Proto se začalo chmelit postupně, kdy se všechen chmel nepoužívá hned ze začátku chmelovaru, ale postupně se přidává. Část chmele se například přidává v polovině chmelovaru a další část těsně před koncem chmelovaru = tzv. *late-hopping* (pozdní chmelení), nebo se také přidává chmel za studena [1].

Suché chmelení piva, resp. chmelení za studena (= *dry-hopping*), patří v současnosti mezi populární výrobu piva. Tento postup napomáhá vnést do nápoje daleko vyšší množství aromatických látek chmele – zejména silic. Je to také jediný technologický proces umožňující připravit pivo tak, aby se výsledný sensorický profil blížil profilu použitého chmelového materiálu. Výroba těchto piv vychází z klasického připravení mladiny. Chmel se přidává do mladinové pánve v průběhu chmelovaru, někdy také do vířivé kádě a poslední dávka chmele se přidává během studené části výroby – nejčastěji po hlavním kvašení, nebo zrání. Aromatické látky z chmele přecházejí do piva při nízkých teplotách prostou macerací. Proces je velmi pomalý, ale při použití správného technologického postupu jsou ztráty silic i jejich transformace

minimální oproti klasickému chmelovaru. Dochází i k extrakci minoritního podílu hořkých kyselin a jiných látek od nich odvozených. Ty mají také vliv na charakter a intenzitu hořkosti vyrobeného piva. Studené chmelení je omezeno řadou faktorů, jako jsou například: složení mladiny, dávka a typ použitého chmele, způsob extrakce, doba kontaktu s pivem a přítomnost kvasinek. Dále je nutné uvést negativa tohoto způsobu chmelení, jako je přístup kyslíku k pivu, jež způsobuje oxidaci a stárnutí piva. Dalším rizikem je kontaminace piva přidaným chmelem. Tato metoda se hojně využívá v USA, Kanadě, Skandinávii, Austrálii a Velké Británii [39].

#### **1.1.5.7 Kvašení mladiny a dokvašování mladého piva**

Jak již v této práci bylo zmíněno, ke kvašení mladiny se využívají dva druhy kvasinek. Jsou to spodní pivovarské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum*), nebo svrchní pivovarské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*). Kvašení mladiny se rozděluje do dvou fází. První fází je hlavní kvašení, druhou fází je dokvašování a zrání mladého piva [38, 40, 41].

Hlavní kvašení se většinou v malých pivovarech v České republice provádí v otevřených kvasných kádích pomocí spodních pivovarských kvasinek. Ve větších pivovarech jsou využívány cylindrokónické tanky (CKT). Úkolem je neúplné zkvašení zkvasitelných cukernatých látek extraktu mladiny (maltóza, glukóza, ...) v anaerobním prostředí. Dochází ke tvorbě ethanolu, oxidu uhličitého a vedlejších metabolitů (např. mastné kyseliny, aldehydy, vyšší alkoholy, estery a diketony). Současně se pomnoží kvasničný zákvas. Všechny látky, které vznikají při kvašení, dávají pivu chuť a aroma. Kvašení v kvasných kádích probíhá ve větraných a chlazených místnostech (5–10 °C), kterým se říká spilka. Místnosti musí být větrané z toho důvodu, aby se nehromadil vznikající oxid uhličitý. Hlavní kvašení probíhá v pěti stádiích odlišujících se vzhledem:

- zaprašování – tvoří se bílá pěna na povrchu, cca po 12–24 hodinách od zakvašení;
- odrážení – pěna houstne, je vytlačována do středu kádě;
- nízké bílé kroužky – nejintenzivnější stádium kvašení, hustá bílá pěna;
- vysoké hnědé kroužky – dochází k poklesu pH, vysrážení kalů v pění;
- propadání – sedimentace kvasinek na dno kádě, na povrchu se tvoří tmavá hustá deka.

Tmavá hustá deka se z povrchu sbírá. Produktem hlavního kvašení je mladé pivo. To je pak přečerpáno do ležáckého tanku. Kvasinky usazené na dně kádě se seberou, properou vodou a mohou se znova použít.

Kvašení v CKT je pro větší pivovary mnohem výhodnější, kvašení i dozrávání piva probíhá v jednom tanku. Tanky nemusí být v chlazených prostorách, protože se chladí přímo CKT na potřebnou teplotu. Tyto tanky se nepřečerpávají, a tak se snižuje i riziko kontaminace, dále se pak snižují ztráty CO<sub>2</sub> a nedochází ke kontaktu piva se vzduchem. Tyto nádoby mají příznivý vliv na kvalitu piva tím, že řízeným procesem chlazení probíhá kvašení a zrání v optimálním teplotním režimu.

Hlavní kvašení trvá 6–10 dní. Záleží však na druhu vyráběného piva a na způsobu jeho výroby (otevřené nádoby nebo CKT) [18, 38, 40].

Úkolem dokvašování a zrání mladého piva je zkvašování zbylých zkvasitelných cukrů. To vede k nasycení piva vznikajícím oxidem uhličitým pod tlakem. Také zde probíhají biochemické děje vedoucí ke tvorbě sensorického charakteru piva, a fyzikálně-chemické děje, které směřují k vyčeření piva. Dokvašování a zrání mladého piva se uskutečňuje v ležáckých sklepích, a to v uzavřených ležáckých tancích při teplotě 1–3 °C. Doba dokvašování opět závisí na druhu vyráběného piva. Pohybuje se v rozmezí 1–10 týdnů [18, 38, 40].

#### **1.1.5.8 Závěrečné úpravy piva**

Mezi závěrečné úpravy vyzrálého piva se řadí filtrace, pasterace a stabilizace. Úpravy se provádí proto, aby pivo vyhovovalo spotřebitelským a komerčním požadavkům. Jako je například vzhled a trvanlivost.

Cílem filtrace je odstranění zbytků neusazených organismů a koloidních částic. Pivo musí získat jiskrnou čírost. Provádí se na deskových naplavovacích filtrech. V těchto filtrech se na filtrační přepážku naplaví křemelina (= jemný prášek oxidu křemičitého), který má filtrační účinek. Používají se také deskové filtry filtrující přes filtrační desky ze směsi křemeliny a celulózy. Nejmodernější je membránová vysokoúčinná filtrace, díky ní lze nahradit pasteraci.

Pasterace je tepelná inaktivaci mikroorganismů způsobující kažení piva. Slouží tedy pro zajištění biologické trvanlivosti piva. Nejčastěji se využívají tunelové pastery. Pivo se zde pasteruje přímo v lahvích nebo v plechovkách při teplotě 62 °C po dobu 5–6 minut. Dále se využívají průtokové pastery. V tomto případě se pivo krátkodobě zahřívá na 68–70 °C.

Úkolem stabilizace piva je zajištění dlouhodobé trvanlivosti (v řádech měsíců). Odstraňují se prekurzory zákalu piva (vysokomolekulárních dusíkatých látek, rozpuštěného kyslíku, kovových iontů a polyfenolů). Využívají se stabilizátory:

- srážecí = tanin
- adsorpční = silikagel
- enzymové = papain
- antioxidační = kyselina askorbová.

Do piva se přidávají před filtrací a jejich používání je řízeno platnou legislativou [4, 14].

### **1.1.5.9 Stáčení piva**

Stáčení piva do spotřebitelských a přepravních obalů je finální fází výroby. Při stáčení je nutné zamezit ztrátám oxidu uhličitého, a proto se stáčeční stroje konstruují na izobarickém principu. Pivo se v moderních linkách stáčí pod tlakem oxidu uhličitého do obalů předplněných oxidem uhličitým v láhvi, nebo při mírném tlakovém spádu. Protitlak zamezí vypěnění piva během plnění (obal tak bude skutečně naplněn pivem, a ne pouze pěnou) a mírný tlakový spád zvyšuje rychlost plnění. Dále se musí zamezit styku piva s kyslíkem (způsobuje oxidace, oxidační a starou chuť). Je důležité zajistit dokonalou sanitaci všech zařízení, s nimiž přichází pivo do styku. To vše má veliký vliv na kvalitu piva [14].

Pro maloobchod se pivo plní do skleněných a plastových lahví, do plechovek nebo do malých soudků. Pro restaurace se pivo dodává v sudech různé velikosti a v tancích [42].

### **1.1.6 Aromaprofil piva**

Těkavé sensoricky aktivní látky piva jsou látky s nízkým bodem varu. V pivu primárně pocházejí ze surovin, ze kterých je pivo vyrobeno (ze sladu a chmele), ale také vznikají v určitých fázích přípravy piva (chmelovar, kvašení a dokvašování v ležáckém sklepe). Tyto látky udělují pivu typickou chuť a aroma. Nejvýznamnější složky chmele jsou chmelové pryskyřice, polyfenoly a chmelové silice. Těkavé látky obsažené ještě v nezpracovaném ječmeni se zapracováním částečně odstraňují (v průběhu hvozdění působením vyšších teplot) a souběžně nastávají Maillardovy reakce, při nichž vznikají další aromatické látky [1].

#### **1.1.6.1 Chmelové silice**

Chmelové silice jsou směsí několika set látek, které mají různé chemické složení a různé fyzikální vlastnosti. Dělí se do tří základních skupin:

- uhlovodíková frakce;
- kyslíkatá frakce (oxidovaná);
- frakce sirných sloučenin.

Uhlovodíková frakce chmelových silic obsahuje:

- alifatické uhlovodíky – oktan, pentan, isopren, undekan až heptadekan;
- monoterpeny – myrcen,  $\alpha$ -pipen,  $\beta$ -pipen, limonen,  $\beta$ -ocimen atd.;
- seskviterpeny –  $\beta$ -farnesen,  $\alpha$ -humulen,  $\alpha$ -selinen,  $\beta$ -selinen,  $\beta$ -karyofylen,  $\gamma$ -kadinen,  $\delta$ -kadinen,  $\gamma$ -muurolen, ...;
- acyklické, mono-, di- a tricyklické seskviterpeny [1, 39, 43].

Kyslíkatá frakce je složitou směsí terpenových, seskviterpenových, aromatických a alifatických alkoholů, dále různých aldehydů, ketonů, kyselin, esterů a epoxidů. Z volných terpenových alkoholů jsou nejvíce zastoupeny: linalool, neridol a geriniol.

Frakce sirných sloučenin je tvořena terpenovými sulfidy, polysulfidy a thiostry, jako jsou například dimethylsulfidy, dimethyltetrasulfid, sulfan a myrcensulfid [1, 39, 43].

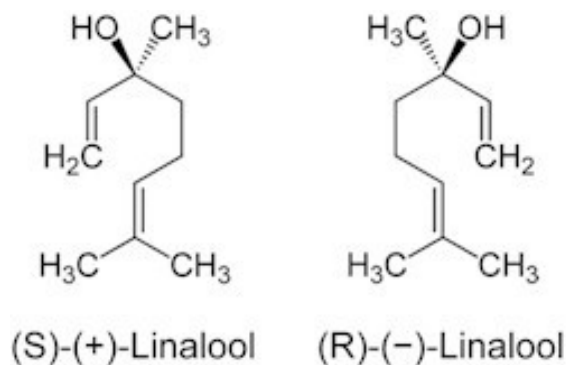
#### 1.1.6.1.1 Linalool

Linalool, jak již bylo uvedeno, je monoterpenový alkohol řadící se mezi chmelové silice. Systematický název tohoto monoterpenu je 3,7-dimethyl-1,6-oktadien-3-ol. Vyskytuje se ve dvou stereoizomerech, které jsou znázorněny na obrázku 8:

- (S)-(+)-linalool = likareol
- (R)-(-)-linalool = koriandrol.

Linalool je v přírodě produkován mnoha rostlinami, převážně z čeledi hluchavkovitých (vonné byliny, máta), routovitých (citrusy) a vavřínovitých (skořice, vavříny). Rostliny tuto látku produkují především kvůli antimikrobiálním účinkům, jež chrání rostlinu. Likareol, vonící dřevitou, nebo levandulovou vůní, se nejvíce vyskytuje ve vavřínu, v levanduli a v bazalce. Koriandrol, vyskytující se hlavně v koriandru, má výraznou vůni po květinách, citrusech a bylinách. Poměr S- a R- formy linaloolu se během pivovarského procesu a stárnutí mění ve prospěch S-formy. Hlavní roli hraje při výrobě piva pomocí studeného chmelení, kdy se v takto vyrobených pivech vyskytuje ve vyšších koncentracích a zodpovídá za citrusové aroma.

Linalool samovolně oxiduje na vzduchu při pokojové teplotě za vzniku primárních oxidačních produktů (nejméně dva hydroperoxydy) a většího množství sekundárních oxidačních produktů. Jako aditivní látka se přidává do nápojů a potravin. Je také hojně využíván v kosmetickém průmyslu (při výrobě různých šampónů, mýdel, antiperspirantů a parfémů), v medicíně (má sedativní a protizánětlivé účinky) a v zemědělství jako insekticid [43–45].



**Obrázek 8:** Stereoizomery linaloolu [46]

### 1.1.6.2 Aromatické látky sladu

Tvorba vonných a chuťových látek závisí na kvalitě pivovarských surovin, stejně tak prekurzorů aromatických látek, které se transformují až na aromatické látky. Většina těkavých aromatických látek ve sladu vzniká Maillardovými reakcemi (= neenzymatické reakce mezi redukcujícími sacharidy a aminosloučeninami). Proto se za primární prekurzory aromatických látek sladu považují volné aminokyseliny a redukcující sacharidy. Během procesu sladování dochází pomocí proteolytických enzymů (exo- a endopeptidáz) ke štěpení bílkovin. Dochází ke zvýšení rozpustnosti dusíkatých látek v zrnech ječmene. Obsah bílkovin ovlivňuje stabilitu pěny a její charakter. Také přispívají k plnosti piva. Během hvozdění sladu vznikají složitější směsi nízkomolekulárních látek zodpovídající za charakteristickou vůni a chuť sladu. Koncentrace aromatických složek ve sladu závisí na:

- rychlostech jejich vzniku
- transformaci
- odpaření během hvozdění [32].

Látky přispívající k vůni a chuti sladu jsou: kyseliny, aldehydy, ketony, alkoholy, estery a heterocyklické sloučeniny, které obsahují síru, dusík nebo kyslík.

Na aroma sladu se podílí i další produkty jiných reakcí. Řadí se sem vonné  $\beta$ -dioxopiperaziny a apokarotenoidy s nízkými podnětovými prahy ((E)- $\beta$ -2,4-damascenon).  $\beta$ -dioxopiperaziny mají hořko-kovovou, nebo hořkou chuť a vznikají z aminokyselin a z lineárních dipeptidů.

Lipidová frakce se také podílí na výsledném aroma. Během hvozdění se mastné kyseliny lipidů oxidují a degradují za současného vzniku mnoha látek, jako jsou například: nižší mastné kyseliny, nenasycené aldehydy a ketony [32].



Nejvíce aromatických látek se nachází ve speciálních sladech (barevný a karamelový), které se používají hlavně pro výrobu speciálních piv a piv tmavých [32].

### **1.1.6.3 Aromatické látky vznikající během procesu výroby piva**

Během procesu výroby piva dochází ke ztrátám a ke vzniku aromatických těkavých látek. Prvním procesem, který má vliv na obsah aromatických těkavých látek, je chmelovar, dále pak kvašení, dokvašování v ležáckém sklepě, skladování a nakonec transport hotového piva.

V průběhu chmelovaru vyššími teplotami dochází ke ztrátám těkavých látek majících nižší bod varu (hlavně sensoricky nežádoucí látky), tvoří se produkty Maillardových reakcí. Sladina se během varu obohacuje o chmelové silice, které jsou žádoucí (linalool, myrcen a oxidační produkty chmelových silic – způsobují travnaté aroma) [47, 48].

Jak již bylo v této práci uvedeno, kvašením dochází ke vzniku ethanolu, oxidu uhličitého, a i dalších vedlejších metabolitů (vyšší alkoholy, mastné kyseliny, aldehydy, estery a diketony). Vyšší alkoholy vznikají hlavně na začátku kvašení. Jejich tvorba je závislá na teplotě a na použitém kmeni kvasinek. Vzniká hlavně: propan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol, fenylethanol, 2-methylbutan a 2-methylpropan-1-ol. Aroma těchto vyšších alkoholů se popisuje jako alkoholové, nebo květinové. Estery jsou produkty reakcí mastných kyselin a alkoholů. Vznik těchto esterů je limitován mastnými kyselinami, vyššími alkoholy, enzymovou aktivitou a opět teplotou. V pivu vznikají následující estery: ethylacetát, ethylbutyrát, ethylhexanoát, ethyldodekanoát, isobutylacetát a isoamylacetát. Avšak nejvýznamnější je vznikající ethylacetát, který je ve vyšších koncentracích nežádoucí. Estery obecně udělují pivu ovocné aroma. Aldehydy vznikají stejně jako vyšší alkoholy, na začátku kvašení. Jejich produkce je závislá na množství kvasinek, obsahu kyslíku a na teplotě. Čím je více kvasinek a čím je méně kyslíku v mladině, tím dochází k vyšší tvorbě aldehydů. Vzniká například: acetaldehyd, furfural, methylglyoxal, glyoxal, benzaldehyd a fenylacetaldehyd. Nejpodstatnějším vznikajícím aldehydem je acetaldehyd, který je při vyšších koncentracích nežádoucí. Způsobuje zatuchlé, nebo zeleninové aroma [49–53].

Dokvašováním v ležáckém sklepě dochází k upravení nepříjemné hořkosti a kvasničné chuti zeleného piva a vytváří se typický buket a chuť zralého piva. Zároveň dochází ke změně obsahu rozpuštěných látek i těkavých složek v závislosti na použitých surovinách, kmenu kvasinek a technologii. Mění se obsah sirných sloučenin, které dotvářejí optimální organoleptické vlastnosti piva. Ty se mohou i při nízké koncentraci projevit sensorickým zhoršením piva. Důležitým ukazatelem při dokvašování a zrání je obsah dimethylsulfidu, jenž je nežádoucí

a dává pivu aroma po vařené zelenině. Také může docházet ke zvyšování obsahu acetaldehydu, který při vyšších koncentracích způsobuje, že pivo voní po jablkách. Dochází ke zvyšování koncentrace esterů. Ty jsou vedle vyšších alkoholů hlavními složkami buketu a mají pozitivní vliv na senzoryckou charakteristiku piva. V pivu převažuje z vicinálních diketonů biacetyl a jeho prekuzory. Jejich obsah však během dokvašování a zrání klesá v závislosti na teplotě [1].

Během skladování a transportu piva k zákazníkům dochází k tzv. stárnutí piva. Nastávají senzorycké změny, které se projevují nepříznivým aroma a nepříznivou chutí. Tyto změny jsou způsobeny karbonylovými sloučeninami, respektive nenasycenými aldehydy (*trans*-2-nonenal). Z toho důvodu se do piva přidávají antioxidanty, které mají za úkol oddalovat stárnutí piva (kyselina askorbová, oxid siřičitý, nebo polyfenolové látky) [54].

Aromatické látky vznikající během procesu výroby piva (kvašení, chmelovar) nemusí být jen pozitivní. Vznikají také látky s nežádoucím aroma [49–53].

### 1.1.7 Druhy piv

Piva se v České republice dělí dvojím způsobem:

- dle barvy
- dle obsahu alkoholu, původního extraktu a způsobu konečné úpravy.

Dle barvy se piva dělí na světlá, tmavá, polotmavá a řezaná. Světlá piva jsou vyráběna hlavně ze světlých sladů a v zahraničí se označují jako *pale*. Tmavá piva označována ve světě jako *dark* se vyrábějí z tmavých, karamelových, nebo ze světlých sladů v kombinaci s barevnými slady. Z ekonomických důvodů se ke zvýšení barvy v pivovarství využívá tzv. kulér (= roztok zkaramelizovaného cukru). Polotmavá piva jsou opět vyráběna z tmavých, karamelových, nebo ze světlých sladů v kombinaci s barevnými slady. Tato piva jsou mezistupněm mezi světlými a tmavými pivy. Vyrábí se tak, že se vaří mladina do požadované barvy. V zahraničí se označují jako *amber*, *red*, nebo *semi-dark*. Řezaná piva vznikají mícháním světlého a tmavého piva při stáčení/výčepu [2, 42].

Mezi piva, která se rozdělují dle obsahu alkoholu, původního extraktu a způsobu konečné úpravy patří:

- stolní piva;
- výčepní piva;
- ležáky (*lager*);
- speciální piva;
- portery;
- piva s nižším obsahem alkoholu;
- nealkoholická piva;
- piva z jiných obilovin;
- pšeničná piva;
- kvasnicová piva;

- ochucená piva;
- kvašené sladové nápoje;
- míchané nápoje z piva.

Stolní piva se vyrábí převážně z ječných sladů, stejně tak ostatní piva, jako například: piva výčepní, ležáky, portery a speciální piva. Jsou však rozdílná v extraktu původní mladiny. Stolní piva mají extrakt původní mladiny do 6 % hm, výčepní piva 7–10 % hm., ležáky 11–12 % hm., speciální 13 % hm. (i vyšší) a portery 18 % hm. (i vyšší).

Piva s nižším obsahem alkoholu obsahují nejvýše 1,2 % obj. (= 1,0 % hm.) alkoholu. Nealkoholická piva nesmí obsahovat více než 0,5 % obj. (= 0,4 % hm.) alkoholu. Ochucené pivo se vyrábí s přidavkem určitých látek sloužících k aromatizaci potravin nebo surovin s vlastním aromatem, potravinových doplňků, lihovin nebo ostatních alkoholických nápojů. Obsah alkoholu z přidaných lihovin, nebo jiných alkoholických nápojů nesmí překročit obsah alkoholu v původním pivu.

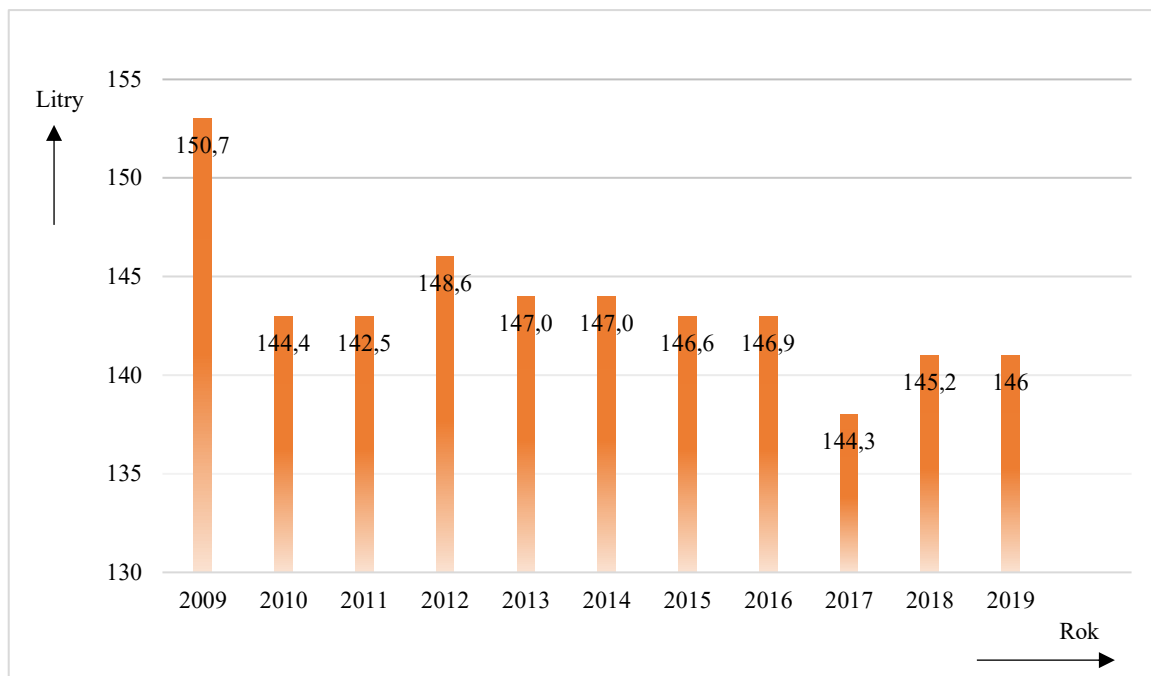
Piva vyráběná z jiných obilovin jsou piva, u kterých více než 1/3 extraktu z použitého sladu pochází z jiného sladu než ječného. Pšeničná piva musí být vyráběna s podílem extraktu z použitého pšeničného sladu větším než 1/3 hmotnosti celkově dodaného extraktu. Kvasnicové pivo se vyrábí tak, že se do hotového piva dodatečně přidá čistá kvasničná kultura nebo podíl prokvašení mladiny. Kvašené sladové nápoje se vyrábí ze sladiny stejnou pivovarskou technologií jako klasické pivo.

Míchané nápoje z piva (*Beercooler*) se vyrábí smícháním nealkoholického nápoje s pivem a se sodovou vodou. Díky tomu mají tyto nápoje nižší obsah alkoholu [2, 42].

### **1.1.8 Konzumace piva v České republice**

Pivo vyráběné v České republice (ČR) má dlouholetou tradici a řadí se mezi nejznámější piva na celém světě. České pivo má chráněné zeměpisné označení CHZO. Účelem označení CHZO je zachování dobrého jména a kvality piva vyráběného v ČR. Toto označení deklaruje, že pivo bylo vyrobené na území ČR z definovaných surovin a definovaným způsobem [2, 42].

V ČR se v dnešní době vyrábí více než 21,3 milionů hektolitrů piva za rok. Dochází také k větší konzumaci tohoto nápoje. Obrázek 9 znázorňuje spotřebu piva na osobu a rok. Tyto údaje pocházejí z Českého statistického úřadu z roku 2020 [55].



**Obrázek 9:** Graf spotřeby piva v ČR v litrech na osobu a rok [55]

## 1.2 Klasické postupy vs. mikroextrakční metody

Analytické metody zahrnují procesy, jako je odběr vzorků, přípravu těchto vzorků k analýze (destilace s vodní parou nebo extrakce vhodným rozpouštědlem) a analýzu. Mezi kritické kroky celého analytického procesu se řadí příprava vzorku, a to z toho důvodu, že při použití nevhodné metody může dojít k jeho znehodnocení. Klasické postupy k přípravě vzorku jsou často časově náročné, zdlouhavé, vícestupňové, potřebují velký objem rozpouštědel a tím pádem vedou ke ztrátě analytu. V dnešní době nabízejí různé inovativní techniky (mikroextrakční) mnohé výhody, jako jsou: vyšší účinnost extrakce, časová nenáročnost, vyšší selektivita, citlivost, automatizovatelnost, finanční dostupnost, nízká spotřeba rozpouštědel a šetrnost k životnímu prostředí. Tyto mikroextrakční techniky jsou obecně založeny na miniaturizaci základních režimů extrakce. Analyty jsou z velkých objemů vzorků extrahovány do malých objemů (dochází k zakoncentrování analytu) [56].

### 1.2.1 Mikroextrakce tuhou fází

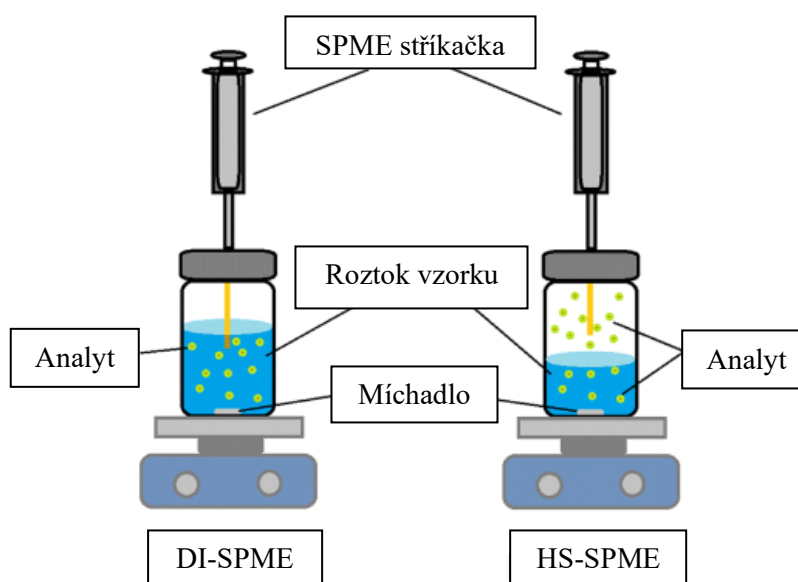
Mikroextrakce tuhou fází (SPME = *Solid Phase Microextraction*) je jednoduchá bezrozpouštědlová izolační metoda vyvinuta profesorem Januszem Pawliszynem a poprvé publikována v roce 1990 na univerzitě Waterloo v Ontariu v Kanadě [57]. SPME využívá proces sorpce a desorpce na speciální vlákno (křemenné nebo ocelové) potažené vhodnou stacionární fází (SF) umístěné v duté jehle. SPME slouží k izolaci a k zakoncentrování analytu. Tato metoda umožňuje získání analytu v dostatečném množství a bez nežádoucích příměsí. Není náročná na instrumentaci. Využívá se v různých oborech, a to od zemědělství až po medicínu. V kombinaci s vhodnou analytickou metodou, která následuje po SPME, slouží jak pro kvantitativní, tak i kvalitativní analýzu. Umožňuje též získání lineární kalibrační křivky v širokém koncentračním rozmezí. Nejčastěji se využívá ve spojení s plynovou chromatografií (GC = *Gas Chromatography*) a s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*) [57–60].

Mikroextrakce se provádí dvěma způsoby (obrázek 10):

- headspace (HS-SPME = *Headspace Solid Phase Microextraction*)
- přímým ponořením (DI-SPME = *Direct Immersion Solid Phase Microextraction*).

U DI-SPME je vlákno ponořeno do vodného roztoku. Tato mikroextrakce je vhodná pro netěkavé látky v kapalném, nebo tuhém skupenství. Dochází k ustanovování rovnováhy ve dvoufázovém systému (vzorek - SF na vlákne). U HS-SPME je vlákno vystaveno parní fázi nad vzorkem obsahujícím těkavý analyt (snadněji přecházející do plynné fáze). Analyt se sorbuje na povrch vlákna, dokud není dosažena rovnováha třífázového systému

(vzorek - plynná fáze nacházející se nad vzorkem - SF na vlákne). Molekuly přecházejí nejprve do plynné fáze, ve které se pohybují rychleji než na počátku ve vzorku, a dále pak se sorbují z headspace (HS) prostoru na SF vlákna. Je důležité tuto metodu optimalizovat, protože zvyšováním teplot sice může docházet k lepšímu zakoncentrování v HS prostoru, ale současně se může více uplatňovat desorpce z vlákna do HS. Rychlost sorpce lze ovlivnit zvýšením teploty, vysolením, kdy dochází ke zvýšení iontové síly vzorku, nebo úpravou pH. HS-SPME se využívá častěji než DI-SPME, jelikož sorpce z HS prostoru na vlákno je rychlejší (molekuly se pohybují rychleji v plynném prostředí než v kapalném a dochází k rychlejšímu ustanovování rovnováhy). Rovněž je vlákno chráněno před škodlivým složením vzorku [58–60].

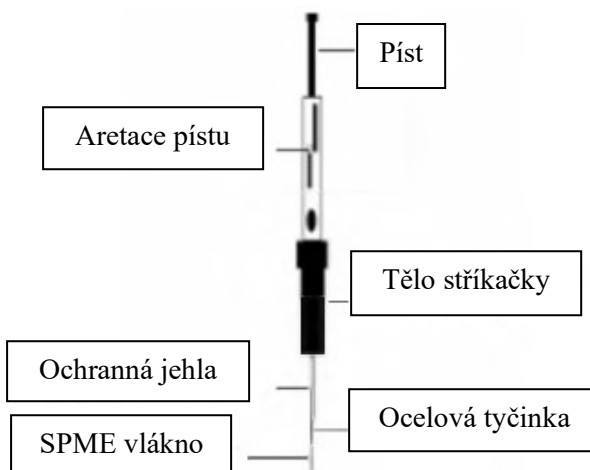


Obrázek 10: DI-SPME a HS-SPME [61]

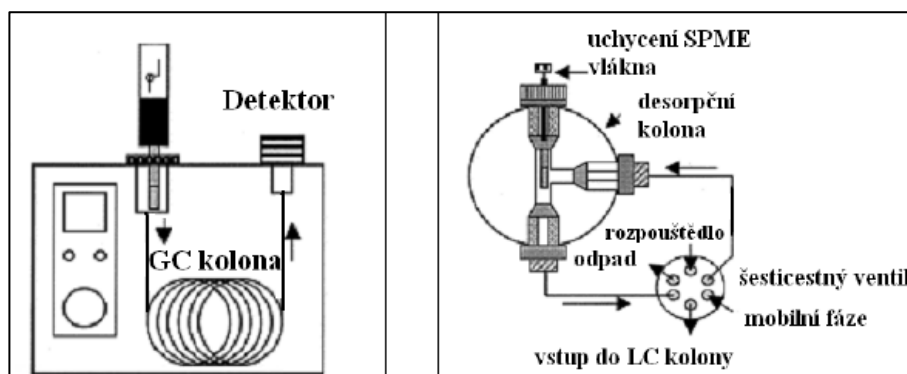
### 1.2.1.1 Postup mikroextrakce tuhou fází

SPME je principiálně velice jednoduchá metoda. Její hlavní součástí je tenké křemenné vlákno pokryté vhodnou stacionární fází (obrázek 11). Toto vlákno se před extrakcí ukrývá uvnitř duté kovové jehly sloužící jako ochrana před mechanickým poškozením vlákna a k propíchnutí septa zátky nádoby, ve které se nachází vzorek. Vlákno má délku 1–2 cm. Celý postup lze rozdělit do dvou po sobě jdoucích fází. V první fázi je propíchnuto dutou jehlou septum nádoby se vzorkem a pomocí pístu je vysunuto vlákno z jehly přímo do vzorku, nebo do prostoru nad hladinou vzorku. Po vysunutí vlákna dochází k sorpci analytů ze vzorku na stacionární fázi vlákna. Sorpce probíhá do dosažení rovnováhy, což je individuální (2–90 min). V další fázi se po dosažení sorpční rovnováhy vlákno opět pomocí pístu zasune zpět do duté jehly. Celá jehla se následně přesune do nástřikového prostoru zařízení (GC nebo HPLC), kde proběhne desorpce, separace a kvantifikace analytů [58–63].

Desorpce analytů u GC probíhá tak, že se vlákno přeneso do nástřikového portu plynového chromatografu. Analyt se desorbuje z vlákna zahřátím a přenáší se na kolonu, kde probíhá separace. Optimální teplota desorpce je rovna bodu varu nejméně těkavé látky. Účinnost desorpce je závislá na několika parametrech: tlaku par analytu, typu vlákna, teplotě desorpce, době expozice atd. Desorpce u HPLC se neprovádí jako u GC termálně, ale rozpouštědlem, nejčastěji mobilní fází (MF). Je zapotřebí speciální adaptér a k uvolnění analytů dochází v desorpční komoře. Desorpce se dělí na dynamickou a statickou, a to podle síly sorpce analytů. U statické desorpce se desorpční komora plní desorpčním činidlem (MF), do kterého se vlákno ponoří. Zde probíhá desorpce určitou dobu. Poté je desorbovaný materiál unášen mobilní fází na kolonu. U dynamické desorpce jsou analyty vymývány přímo v proudu MF a unášeny na kolonu. Tepelná desorpce u GC a desorpce rozpouštědlem u HPLC jsou znázorněny na obrázku 12 [58–63].



**Obrázek 11:** Manuální uspořádání SPME [64]



**Obrázek 12:** Tepelná desorpce u GC a desorpce rozpouštědlem u HPLC [65]

Optimalizace SPME metody je důležitým krokem, díky tomu se získají dostatečně přesné a spolehlivé výsledky. To je ovšem ovlivněno určitými faktory: polarita a tloušťka SF (platí Liebigovo pravidlo podobné se rozpouští v podobném), způsob vzorkování, pH a iontová síla roztoku, míchání, teplota a doba sorpce.

Optimální doba sorpce se volí tak, aby bylo dosaženo co možná nejúčinnější extrakce analytu (dosažení rovnováhy → nevyšší citlivost a dobrá opakovatelnost). Tato doba se nejlépe zjistí proměřením závislosti výtěžnosti na době sorpce.

Vzorek je možné také zahřívat, nebo míchat. Záhřevem dochází ke zkrácování času k dosažení sorpční rovnováhy. Zvyšuje se totiž koncentrace analytů v headspace prostoru. Teplota se tedy volí dle složení vzorku, pro těkavé látky nižší teplota a pro málo těkavé látky, nebo složité vzorky vyšší teplota. Mícháním opět dochází ke zkrácování času k dosažení sorpční rovnováhy. Je důležité, aby míchání probíhalo konstantně, neboť proměnlivé míchání snižuje opakovatelnost stanovení [58–63].

Úpravou pH se zvyšuje iontová síla roztoku. Toho se využívá při extrakci bazických a kyselých složek, a to z toho důvodu, aby se potlačila disociace látek. Znamená to, že bazické složky se extrahují v bazickém prostředí a kyselé složky v kyselém prostředí [58–63].

### **1.2.1.2 Stacionární fáze při mikroextrakci tuhou fází**

Volba stacionární fáze představuje první krok SPME. Volí se s ohledem na stanovovaný analyt, který se stanovuje a platí opět Liebigovo pravidlo (podobné se rozpouští v podobném). To znamená, že pro polární látky se volí polární SF a pro nepolární látky nepolární SF. Dále je nutné brát v úvahu tloušťku vrstvy SF, neboť silnější vrstva SF je schopna extrahovat větší množství analytu (extrakce bude trvat delší dobu) a naopak. Z tohoto důvodu se pro zachycení více těkavých látek používá silnější vrstva. Slabší vrstva se využívá k zachycení středně těkavých látek. Slabší vrstva nemá ovšem tak dobré vlastnosti jako vrstva silná, ale desorpce u silnější vrstvy trvá delší dobu. Jak již bylo výše uvedeno, podstatou SPME je křemenné vlákno pokryté vhodnou SF. Nejčastěji používané SF, jejich tloušťka, polarita, pro jakou chromatografii a pro jaké analyty jsou vhodné, jsou uvedeny v tabulce 2 [59, 65, 66].



**Tabulka 2:** Nejčastěji používané stacionární fáze [65,66]

Druh SF	Tloušťka SF [μm]	Polarita SF	Určeno pro	Analyty
Polydimethylsiloxan (PDMS)	7 30 100	nepolární	GC/HPLC GC/HPLC GC/HPLC	těkavé, středně těkavé, středně těkavé
Polyakrylát (PA)	85	polární	GC/HPLC	středně polární, těkavé
Carbowax/divinylbenzen (CW/DWB)	65	polární	GC	polární
Polydimethylsiloxan/Carboxen (PDMS/CAR)	75	bipolární	GC	stopové množství těkavých látek
Polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB)	65 60	bipolární	GC HPLC	polární těkavé látky obecné užití (pouze pro HPLC)
Polydimethylsiloxan/Carboxen/divinylbenzen (PDMS/CAR/DVB)	30/50	bipolární	GC	těkavé, středně těkavé látky C3–C20

### 1.2.2 Vícenásobná headspace extrakce

V roce 1977 Kolb a Pospisil představili metodu kvantitativní analýzy těkavých látek v tuhých vzorcích pomocí headspace extrakce a GC detekce. Metoda byla nazvána diskontinuální plynová extrakce. Byla založena na postupné extrakci plynu, po které následovala analýza extrahovaných těkavých látek. Diskontinuální plynová extrakce byla v roce 1981 přejmenována na vícenásobnou headspace extrakci (= *Multiple Headspace Extraction*, MHE), která je kombinována s SPME (MHS-SPME, *Multiple Headspace Solid Phase Microextraction*) a SDME (MHS-SDME, *Multiple Headspace Single Drop Microextraction*, mikroextrakce jednou kapkou). MHE odstraňuje matricové efekty a umožňuje přímé stanovení analytů v tuhých a složitých vodných maticích technikami headspace. Teoreticky se vypočítá celkové množství analytu ve vzorku po několika postupných extrakcích ve stejných časových intervalech. Je-li při první extrakci odstraněna část horního (headspace) prostoru, dojde k narušení rovnováhy mezi analytem v roztoku vzorku a headspace prostorem. Protože se vzorek může znovu ekvilibrovat, může migrovat více analytu z vodného vzorku do headspace prostoru. Koncentrace v roztoku vzorku a v prostoru nad exponenciálně klesají a budou nyní menší než při první extrakci, ale poměr mezi koncentrací analytu v roztoku vzorku a nad ním bude stejný. Druhá extrakce a analýza vede tedy k tomu, že ve výsledném záznamu (chromatogramu) se získají menší plochy píků. V každém kroku dochází tedy k opakovanému ustanovování rovnováh. Pokračováním tímto postupem je možné ze vzorku odstranit všechny těkavé látky. Jednotlivé plochy píků se pak sečtou a získá se celková plocha píku, která odpovídá celkovému množství analytu ve vzorku. Vliv matrice je tak eliminován vyčerpávající extrakcí. Protože postup MHE sleduje logaritmickou funkci, není požadováno,

aby se extrakce prováděly, dokud není veškerý analyt z matrice odstraněn. Místo toho jsou logaritmy různých hodnot plochy z následných analýz vyneseny proti počtu analýz v lineárním měřítku a celková hodnota plochy je získána regresivním výpočtem z ploch získaných pouze v několika extrakčních krocích [67, 68].

MHS-SPME je postupná metoda HS-SPME. Každý krok této metody se stává ze dvou dílčích kroků:

- rozdělení analytů do třífázového systému (potah vlákna / headspace prostor / matrice vzorku);
- desorpce analytu z vlákna do plynového chromatografu.

K provedení MHS-SPME musí být splněny tři podmínky:

- vztah mezi plochou píku a množstvím analytu zachycené na SF vlákna (množství analytu zavedeného do GC) musí být lineární v celém zkoumaném rozsahu;
- během všech extrakčních kroků musí být distribuční konstanty analytu mezi vzorkem a headspace prostorem / mezi headspace prostorem a vláknem / mezi vzorkem a vláknem konstantní;
- pro každý krok extrakce musí být stanovena celková rovnováha analytu v třífázovém systému.

Hmotnost analytu extrahovaného SF vlákna ( $m_f$ ) souvisí s celkovou rovnováhou analytu v třífázovém systému a může být vyjádřena, jakmile je rovnováhy dosaženo jako (rovnice 4):

$$m_f = \frac{K_{fs} V_f}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \cdot m_0, \quad (4)$$

kde  $m_0$  je počáteční hmotnost analytu třífázového systému,  $K_{fs}$  a  $K_{hs}$  jsou distribuční konstanty (SF / matrice vzorku a plyn / matrice vzorku).  $V_f$ ,  $V_h$  a  $V_s$  jsou objemy (SF, plynné fáze a vzorku). Bylo shrnuto, že koncentrace a aktivita jsou přibližně stejné, poněvadž analyt je ve fázích ve stopových množstvích. Pokud jsou distribuční konstanty a fázové objemy konstantní, je hmotnost analytu absorbovaného SF úměrná počáteční hmotnosti analytu (rovnice 5) a rovnici lze přepsat jako (rovnice 6):

$$m_f = \alpha m_0, \quad (5)$$

kde  $\alpha$  ( $0 < \alpha \leq 1$ ) je konstanta zahrnující následující konstanty (rovnice 6) [69]:

$$\alpha = \frac{K_{fs} V_f}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (6)$$

MHS-SPME je prováděná v postupném počtu extrakcí ( $N$ ) na stejném vzorku, dokud není ze systému odstraněn celý analyt  $\Rightarrow m_{fN} =$  hmotnost analytu ve SF na konci první extrakce (rovnice 7):

$$m_{f1} = \alpha m_0, \quad (7)$$

po druhé a třetí extrakci (rovnice 8 a 9):

$$m_{f2} = m_{f1} (1 - \alpha), \quad (8)$$

$$m_{f3} = m_{f1} (1 - \alpha)^2, \quad (9)$$

a po  $i$ -té extrakci (rovnice 10):

$$m_{fi} = m_{f1} (1 - \alpha)^{i-1}. \quad (10)$$

Plocha píku souvisí s množstvím analytu zavedeného do plynového chromatografu = hmotnost analytu absorbovaného SF vlákna (rovnice 11): ( $k$  je instrumentální konstanta)

$$A_i = k m_{fi}. \quad (11)$$

Rovnici 11 lze přepsat jako (rovnice 12):

$$A_i = k m_{f1} (1 - \alpha)^{i-1} = A_1 (1 - \alpha)^{i-1} = A_1 \beta^{i-1}, \quad (12)$$

kde  $\beta$  je  $(1 - \alpha)$  a  $0 \leq \beta < 1$ , a součet všech dílčích ploch píků lze vypočítat jako (rovnice 13 a 14):

$$A_T = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_N \quad (13)$$

$$A_T = A_1 [1 + \beta + \beta^2 + \dots + \beta^{N-1}] \quad (14)$$

Rovnice 14 je geometrická posloupnost, jejíž součet je (rovnice 15):

$$A_T = \sum_{i=1}^N A_i = \frac{A_1}{1 - \beta} \quad (15)$$

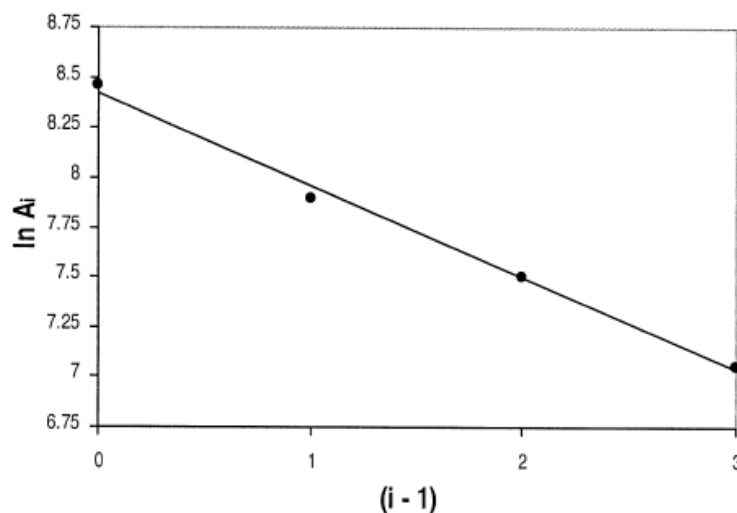
Podle rovnice 15 lze celkovou plochu píku vypočítat pouze ze dvou hodnot:

- první plochy píku  $A_1$ ;
- konstanty  $\beta$ .

První je naměřená hodnota, zatímco druhou hodnotu lze získat z lineární regresní analýzy (rovnice 16):

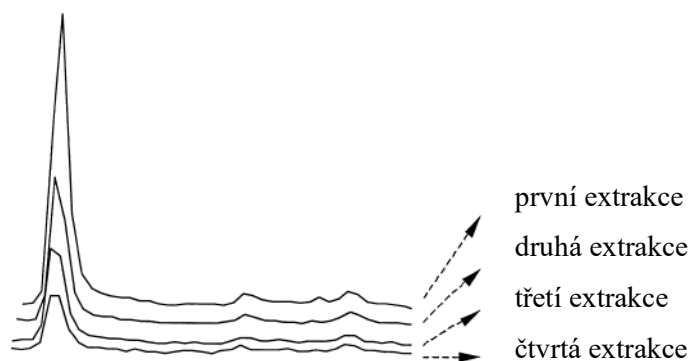
$$\ln A_i = (i - 1) \ln \beta + \ln A_1, \quad (16)$$

což je logaritmická forma rovnice 12. Hodnotu  $\beta$  lze vypočítat ze sklonu lineárního grafu (obrázek 13) získaného z několika (tří nebo čtyř) stanovení HS-SPME-GC [69].



**Obrázek 13:** Lineární graf závislosti  $\ln A$  vs.  $(i - 1)$  [69]

Obrázek 14 představuje chromatografické píky získané ze čtyř stanovení HS-SPME-GC. Nakonec lze počáteční hmotnost analytu ze vzorku  $m_0$  vypočítat z celkové plochy píku  $A_T$  a kalibračního faktoru  $k$ , který lze určit pomocí standardního roztoku analytu [67–69].



**Obrázek 14:** Chromatografické píky získané ze čtyř stanovení HS-SPME-GC [69]

### 1.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (= GC, *Gas Chromatography*) je analytická, eluční a separační technika využívaná k analýze těkavých látek v plynné fázi. Slouží jak pro kvalitativní, tak i pro kvantitativní analýzu.

V této technice dochází k dělení složek vzorku mezi dvě nemísitelné fáze – stacionární (SF) a mobilní (MF). Vzorkem může být kapalina, nebo plyn. Podmínkou ale je, že kapalné vzorky musí být snadno zplynitelné a vzorky se nesmí při teplotách separace rozkládat. Vzorek je nejdříve nastříknut do vyhřívané nástřikové komory neboli injektoru, kde dochází k jeho odpaření. Odpařený vzorek je unášen proudem MF (= nosný plyn – argon, helium, dusík, nebo vodík) na kolonu. Složky vzorku jsou pak zachytávány na koloně obsahující stacionární fázi. Stacionární fázi je:

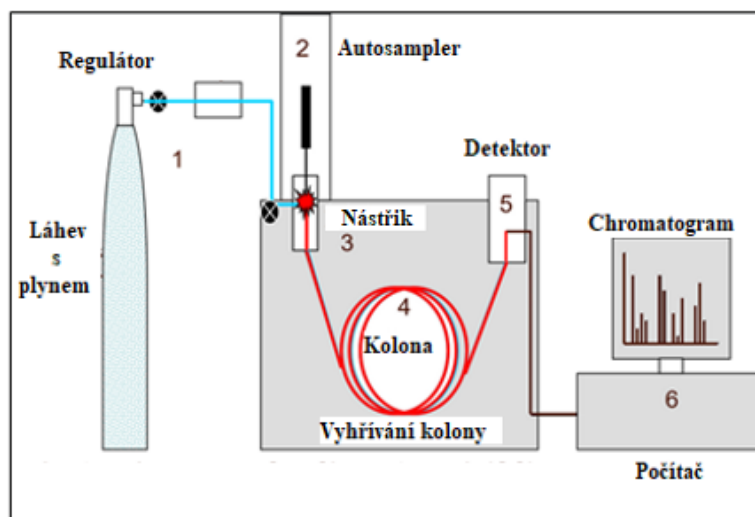
- kapalina adsorbována na inertním nosiči, nebo imobilizována na stěnách kapiláry (*Gas Liquid Chromatography*, GLC – plynová rozdělovací chromatografie);
- tuhý adsorbent (*Gas Solid Chromatography*, GSC – plynová adsorpční chromatografie).

Jednotlivé složky odpařeného vzorku (plynu) se zachytávají na začátku chromatografické kolony, ty jsou pak desorbovány čerstvou MF. MF unáší odpařený vzorek postupně směrem ke konci kolony. Separací proces se tak neustále dokola opakuje. Jednotlivé složky odpařeného vzorku postupují kolonou svou vlastní rychlostí. Rychlost postupu chromatografickou kolonou je závislá na distribuční konstantě složky  $K_D$  (rovnice 3) [70–72].

$$K_D = c_s/c_m \quad (17)$$

$c_s, c_m$  = rovnovážná koncentrace složky ve SF a MF

Separované látky z kolony vycházejí postupně s rostoucími hodnotami distribučních konstant. Různé složky mají různou afinitu ke SF, z toho důvodu se budou na SF zdržovat různou dobu. Z kolony pak následně vstupují do detektoru, který ihned indikuje koncentrace separovaných látek. Signál z detektoru se vhodně upravuje a registruje. Na úplném konci chromatografického procesu vznikne chromatografický záznam (= chromatogram). To je závislost signálu daného detektoru na čase. Záznam má podobu píků. Pro každou separovanou složku je jeden pík. Následně lze dle polohy jednotlivých píků identifikovat látku a pomocí výšky píků lze zjistit množství látky ve vzorku, protože plocha jednotlivých píků je úměrná množství této látky. Schéma plynového chromatografu je zobrazeno na obrázku 13 [70–72].

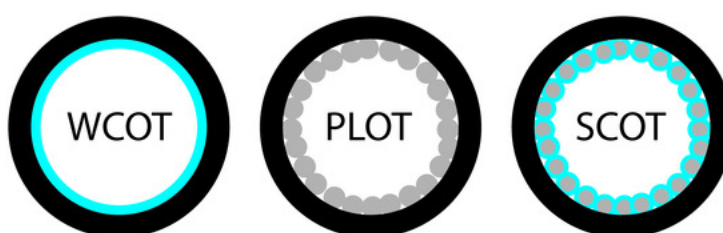


Obrázek 14: Schéma plynového chromatografu [70]

### 1.3.1 Kolony

V plynové chromatografii se uplatňují dva druhy kolon, a to náplňové a kapilární. Náplňové kolony mají tvar trubice o průměru 2–5 milimetrů a délky desítek centimetrů až 400 centimetrů. Nejčastěji jsou vyráběny ze skla, nebo nerezové oceli. Kolony obsahují vhodný nosič se zakotvenou SF, nebo vhodný adsorbent. Náplňové kolony se vyznačují vyšší kapacitou, než je u kapilárních kolon. Kapilární kolony jsou zhotoveny z křemenného skla. Potahují se filmem polyimidu kvůli zajištění jejich pevnosti. Jejich vnitřní průměr je v rozmezí 0,1–0,75 mm a mohou být dlouhé 5–150 m. V GC se používají tři různé typy kapilárních kolon, které se dělí dle uložení SF uvnitř kapiláry (obrázek 14) [73–76]:

- SCOT (= *Support Coated Open Tubular*) – stacionární fáze je kapalina zakotvená na nosiči, který je ukotven na stěně kapiláry;
- PLOT (= *Porous Layer Open Tubular*) – stacionární fáze je pórovitý adsorbent zachycený na stěnách kapiláry;
- WCOT (= *Wall Coated Open Tubular*) – stacionární fáze je tenký film kapaliny, která je zakotvená na stěnách kapiláry.



Obrázek 15: Umístění stacionární fáze uvnitř kapiláry [77]

Stacionární fáze se vybírá dle analyzovaného vzorku (dle jeho charakteru a bodů varů jednotlivých složek). SF pro plynovou chromatografii jsou: polydimethylsiloxan, poly(fenylmethyldimetyl)siloxan, polyethylenglykol, poly(dikyanoallyldimethyl)siloxan a poly(trifluoropropyldimethyl)siloxan. GC chromatograf je také vybaven termostaty, které mají zajišťovat dostatečnou teplotu v koloně, v dávkovači, a i v detektoru (plyny vycházející z kolony nesmí kondenzovat na stěnách detektoru). Využívá se z toho důvodu, aby vzorek po celou dobu zůstal v plynném skupenství [73–76].

### 1.3.2 Detektor

Detektor je speciální součást plynového chromatografu, má za úkol detekovat v mobilní fázi (nosném plynu) složky opouštějící kolonu. Fyzikálně-chemická vlastnost vzorku se zde převádí na měřitelný signál (většinou na elektrický signál). Signál je pak zaznamenáván v závislosti na čase.

V GC chromatografii se nejčastěji využívají dva typy detektorů, a to plamenový ionizační detektor a hmotnostní detektor. Detektor je spojen s hardwarovým zařízením. Toto zařízení umožňuje zobrazení signálu pro různé analyty [73, 78].

#### 1.3.2.1 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Plynová chromatografie se v současnosti běžně spojuje s hmotnostní spektrometrií (= MS, *Mass Spectrometry*), protože samotná GC nedovede sloučeniny, které rozseparovala, identifikovat. Pomocí MS je možné identifikovat rozseparované látky na GC. Pro obě tyto techniky se musí vzorek nacházet v plynné fázi. Po provedení GC separace se analyt převede do prostoru hmotnostního (MS) spektrometru. To se uskutečňuje pomocí tzv. „*interface*“. Jejím úkolem je kvantitativně převést analyt z prostoru s atmosférickým tlakem do prostoru s vakuem ( $1,333 \cdot 10^{-4}$ – $0,001$  Pa) a odstranit přebytečný nosný plyn. Nejčastěji se jako interface používá přímé spojení GC s iontovým zdrojem MS spektrometru. V iontovém zdroji se ionizací převádějí látky na ionty. Analyzátor pak separuje jednotlivé ionty dle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Detektor následně detekuje separované ionty a určuje jejich intenzitu. Výsledkem je záznam - MS spektrum, které lze porovnávat s knihovnou spekter a díky tomu lze identifikovat látky obsažené ve vzorku [73, 78].

#### 1.3.2.2 Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem

Plamenový ionizační detektor (= FID, *Flame Ionization Detector*) se řadí mezi nejvíce využívané detektory v plynové chromatografii. Dokáže detekovat v širokém rozmezí koncentrací většinu organických látek. Detektor se skládá z hořáku, ze dvou elektrod (na ně je

vkládáno stejnosměrné napětí), z přívodu nosného plynu s analyzovanou látkou z kolony, z přívodu vzduchu a vodíku. Princip FID spočívá v měření změny elektrické vodivosti vodíko-vzduchového plamene. Změna je způsobena přítomností eluované látky. Plyny se před vstupem do hořáku smísí a dochází ke spalování látky (ionizaci) za vzniku iontů a elektronů. Ty zvyšují elektrickou vodivost plamene, také dojde ke zvýšení ionizačního proudu. Odezva FID detektoru je přímo úměrná koncentraci stanovované látky, která je přítomná v nosném plynu [79].

### 1.3.3 Metody kvantifikace

Kvantifikaci (= určování množství) lze provést za pomoci různých metod, jako jsou například:

- kalibrační přímka;
- metoda přímého srovnání;
- metoda standardního přídatku;
- metoda vnitřního standardu;
- metoda vnitřní normalizace.

Metodou vnitřní normalizace se určuje obsah látek ve směsích. Využívá se tehdy, je-li počet komponent nízký a jsou-li všechny komponenty známy. Množství dané komponenty se vyjadřuje jako relativní frakce celku (v dané směsi je  $x$  % látky A,  $y$  % látky B,  $z$  % látky C, ...). Tato metoda není závislá na přesnosti objemu při nástřiku vzorku.

Metoda přímého srovnání spočívá v přidání definovaného množství standardu o dané koncentraci ke vzorku o známém objemu, ale neznámé koncentraci za definovaných podmínek. Následně se pak vyhodnotí jejich plochy.

Metoda vnitřního standardu je založená na přidání určitého množství látky ke vzorku. Vnitřní standard nesmí být přítomen v analyzovaném vzorku, dále pak nesmí reagovat se složkami vzorku. Měl by být snadno oddělitelný od složek vzorku a měl by se eluovat v blízkosti stanovované složky.

Metoda standardního přídatku spočívá v přidání daného množství stanovované látky ke vzorku. Z plochy píku stanovované látky, která je obsažená ve vzorku, a z plochy píku po přidání přídatku látky ke vzorku se vypočítá množství látky v původním vzorku.

Kalibrační přímka je nejčastěji využívaná metoda kvantifikace. K této metodě je nutné připravit kalibrační roztoky s různou koncentrací se stanovovanou látkou. Vzorky se analyzují za stejných podmínek a koncentrace dané látky ve vzorku se vypočítá dosazením do kalibrační rovnice. Kalibrační rovnice má tvar  $y = kx + q$  ( $x$  = je nezávislá proměnná,  $y$  = závislá proměnná,  $k$  = směrnice přímky,  $q$  = úsek na ose  $y$ ) [80].



## 1.4 Stanovení těkavých složek potravin – příklady

Metoda MHS-SPME dosud nebyla využívána pro extrakci těkavých látek piva, proto byly vybrány druhy potravin, pro které již byla tato metoda využita. Byla použita například pro stanovení těkavých složek v kořeni a v bylinách, v sýrech, v rajčatech, v kyselých okurkách nebo ve víně.

### 1.4.1 Stanovení těkavých složek v kořeni a v bylinách

Kořeni a byliny se na celém světě používají jako aroma pro potraviny. Z toho důvodu je nutné zajistit jejich bezpečnost při lidské spotřebě. Určuje se identita, původ a kvalita. Sgorbini a kol. [81] se zabývali strategií pro analýzu těkavé frakce bylin a kořeni. Pro tento účel použili metodu separační (MHS-SPME-GC-MS = vícenásobná headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií) a metodu neseparační (MHS-SPME-MS = vícenásobná mikroextrakce tuhou fází ve spojení s hmotnostní spektrometrií). Tyto metody sloužily ke kontrole kvality a kvantifikaci aromatických markerů s analýzou rostlinného materiálu jako takového. Ke stanovení bylo použito 8-10 šarží každé z následujících kořeni a bylin: hřebíček, americký pepř, černý pepř, bílý pepř, rozmarýn, šalvěj a tymián. Charakterizace (homogenita, původ a chemotypy) zkoumaných šarží každého vzorku byly provedeny analýzou těkavé frakce, separačními a neseparačními metodami v kombinaci s analýzou hlavních komponent (PCA = *Principal Component Analysis*). Charakterizující aromatické markery zodpovědné za aroma byly kvantifikovány na pevné matici vícenásobnou headspace extrakcí (MHS-SPME). Spolehlivé výsledky byly získány jak separačními, tak neseparačními metodami [81].

Hlavním cílem této studie bylo prozkoumat možnosti použití výše uvedených dvou přístupů k rutinní kontrole kvality a zároveň zkrácení celkové doby analýzy. V maticích byly identifikovány následující těkavé složky: thymol, karvakrol,  $\alpha$ -pinen,  $\Delta$ -3-karen,  $\alpha$ -felandren, limonen,  $\alpha$ -humulen, eugenol, linalool, bornylacetát,  $\alpha$ -terpineol, borneol,  $\beta$ -karyofyllen,  $\alpha$ -thujon a  $\beta$ -thujon [81].

Pro tuto analýzu byla použita různá vlákna:

- polydimethylsiloxan (PDMS);
- carboxen/divinylbenzen/polydimethylsiloxan (CAR/DVB/PDMS).

PDMS vlákno bylo použito pro tymián a CAR/DVB/PDMS pro všechny ostatní matrice. Byla provedena optimalizace podmínek vzorkování MHS-SPME:

- doba vzorkování – 15, 30, 45 a 60 minut;
- teplota – 30 °C, 50 °C a 60 °C.

Odpovídající množství (v závislosti na matrici – 1–20 mg) hřebíčku, amerického pepře, černého pepře, bílého pepře, rozmarýnu, šalvěje nebo tymiánu bylo umístěno ve 20ml headspace nádobce. Matrice se zde podrobily vzorkování MHS-SPME po dobu 30 minut při 60 °C. Každý vzorek byl podroben MHS-SPME třikrát. Celkem proběhlo devět extrakcí pro každou matrici. Byly též provedeny slepé pokusy. Po odběru vzorků bylo vlákno vloženo do nástřikového portu GC chromatografu k tepelné desorpci a k následné analýze. Pro neseparační analýzy byl nástřikový port GC připojen přímo k systému MS. Neseparační analýza probíhala takto:

- teplota nástřikového portu – 250 °C;
- režim vstřikování – split, poměr 1:20;
- nosný plyn (MF) – helium o průtokové rychlosti 0,4 ml/min;
- doba desorpce a rekondicionace vlákna – 5 minut;
- přenosová kolona – deaktivovaná trubice z taveného křemene (6,70 m × 0,10 mm);
- udržovaná teplota v GC termostatu – 250 °C [81].

Separční metoda GC-MS probíhala následovně:

- teplota nástřikového portu – 230 °C;
- režim vstřikování – split, poměr 1:20;
- nosný plyn (MF) – helium o průtokové rychlosti 1 ml/min;
- doba desorpce a rekondicionace vlákna – 5 minut;
- kolona – MEGAWAX 20M (50 m × 0,20 mm × 0,20 μm);
- teplotní program pro: **tymián a hřebíček** od 100 °C (udržována 0 min) do 230 °C (udržována 5 min) rychlostí 3 °C/min, **bílý pepř, černý pepř, americký pepř, rozmarýn a šalvěj** od 50 °C (udržována 1 min) do 230 °C (udržována 5 min) rychlostí 3 °C/min [81].

Markery byly identifikovány porovnáváním hmotnostních spekter a retenčních indexů s indexy autentických standardů nebo dostupnými knihovny a literaturou. Podmínky pro hmotnostně spektrometrický detektor (MSD = *Mass Spectrometry Detector*) byly:

- režim elektronové ionizace EI (= *Electron Ionization*) (70 eV);
- rozsah skenování – 35–350 A.M.U. (= *Atomic Mass Unit* = atomová hmotnostní jednotka ⇒ 1 Da, 1 g/mol = 1 A.M.U.);
- teplota iontového zdroje – 230 °C [81].

Výsledkem této studie bylo, že MHS-SPME v kombinaci se separačními (GC-MS) a neseparačními (MS) metodami je účinným systémem pro spolehlivou kvantitativní charakterizaci koření a bylin. Separační i neseparační metody umožňují v jednom kroku: rozlišení mezi kvalitou, původem a chemotypem byliny a kvantifikaci aromatických markerů, které jsou charakteristické pro chuť rostliny přímo na původní matici pomocí MHS-SPME. Bylo také potvrzeno, že MHE je časově kompetitivní pro rutinní analýzu. MHS-SPME lze úspěšně kombinovat i s neseparačními metodami (MHS-SPME-MS) pro urychlení kontrolní analýzy, když musí být kvantifikován jeden, nebo více markerů z matic za předpokladu, že představují specifické diagnostické ionty v celkovém MS profilu. Separační a neseparační metody se úzce doplňují, mohou se provádět za pomoci stejného přístrojového vybavení a poskytují srovnatelné kvalitativní výsledky. Touto studií se prokázalo, že metodu MHS-SPME-GC nebo MHS-SPME-MS lze přijmout jako rutinní strategii charakterizace aromatického koření a bylin přímo jako takového v jednom analytickém kroku [81].

#### 1.4.2 Stanovení těkavých volných mastných kyselin v sýrech

Rinón a kol. [82] se zabývali se ve své studii volnými mastnými kyselinami (FFA, *Free Fatty Acids*), které jsou sloučeninami přispívajícími k aroma sýrů. Působí také jako prekurzory dalších důležitých složek, jako jsou např.: alkoholy, aldehydy, methylketony a estery. V sýrech většina těkavých sloučenin včetně těkavých volných mastných kyselin vzniká během zrání. Bylo prokázáno, že na chuti přispívají hlavně FFA s krátkým a středním řetězcem (v této studii FFA s C<sub>2</sub>–C<sub>7</sub>). Ke kvantifikaci těkavých látek byla použita HS-SPME a MHS-SPME v kombinaci s GC a FID detekcí (GC-FID). Studie se zaměřovala hlavně na skupinu devíti těkavých FFA, a to na: kyselinu propionovou (C<sub>3</sub>), octovou (C<sub>2</sub>), *n*-máselnou (*n*-C<sub>4</sub>), *izo*-máselnou (*i*-C<sub>4</sub>), *n*-valerovou (*n*-C<sub>5</sub>), *izo*-valerovou (*i*-C<sub>5</sub>), *n*-hexanovou (*n*-C<sub>6</sub>), *izo*-hexanovou (*i*-C<sub>6</sub>) a *n*-heptanovou (*n*-C<sub>7</sub>) [82].

V této studii bylo použito pět vzorků sýrů:

- kozí sýr ze supermarketu (Tenerife, Španělsko);
- čtyři vzorky sýra z Výzkumné jednotky pro živočišnou výrobu a pícniny *Canary Agronomic Research Institute* (Tenerife, Španělsko).

Vzorky od firmy *Canary Agronomic Research Institute* byly vybrány tak, aby byly identické. Množství kozího mléka na výrobu sýra, přidané soli, teplota srážení, lisování a skladování byly tedy stejné. Zrály však různou dobu: první vzorek zrál 7 dní, další dva vzorky zrály 45 dní a poslední čtvrtý zrál 90 dní. Všechny vzorky sýrů (5 vzorků) byly až do analýzy skladovány při –18 °C [82].

K analýze byl využit GC-FID – systém Varian model CP-3800 Varian 450 s kapilární kolonou FFAP-CP (25 m × 0,32 mm × 0,3 μm). Součástí vybavení byl autosampler Combi-Pal. Dále byly využity dva druhy SPME vláken: CAR/DVB/PDMS a CAR/PDMS.

Analýza probíhala podle následujících podmínek:

- teplota nástřikového portu – 290 °C;
- režim vstřikování – splitless;
- nosný plyn (MF) – dusík o průtokové rychlosti 2 ml/min;
- doba desorpce – 6 minut;
- teplotní program: 40 °C (udržováno po dobu 2 minut) do 100 °C (udržováno po dobu 2 minut) rychlostí 25 °C/min, následně 240 °C (udržováno po dobu 8 minut) rychlostí 10 °C/min;
- vstřikovaný objem – 2 μl;
- teplota FID – 280 °C.

Jak již bylo výše napsáno, ke kvantifikaci těkavých látek byla použita HS-SPME a MHS-SPME. Tyto metody musely být optimalizovány (navážka vzorku, doba vzorkování a teplota), aby se docílilo adekvátní citlivosti a správného použití obou metod. K analýze byly také využity standardní roztoky těkavých FFA, ze kterých se připravily pracovní vodné standardní roztoky, k nimž bylo přidáno určité množství nasyceného roztoku NaCl [82].

Po optimalizaci podmínek bylo zjištěno, že MHS-SPME metoda byla úspěšná při použití 0,3 g sýra smíchaného s 1 ml NaCl (nasycený roztok). Připravená směs (sýr smíchaný s NaCl) byla vložena do 20ml skleněné nádoby a několik sekund byla směs míchána. Poté byla nádoba umístěna do autosampleru GC chromatografu. Při konvenční HS-SPME metodě proběhla pro každý vzorek pouze jedna extrakce a zbývající analytické postupy byly stejné jako u MHS-SPME. U MHS-SPME byla extrakce provedena čtyřikrát po sobě ze stejného vzorku při teplotě 45 °C po dobu 40 minut s využitím vlákna CAR/PDMS. Po každé extrakci byla vlákna podrobena desorpci v GC chromatografu s následným stanovením sledovaných FFA.

Tato studie poprvé použila MHS-SPME při kvantifikaci těkavých FFA v sýrech. Při této metodě se minimalizovaly účinky matrice. Metoda zahrnovala značné výhody, jako jsou: automatizace, malá spotřeba vzorku, eliminace spotřeby organického rozpouštědla a eliminace zdoluhavých úprav vzorků během extrakčního kroku. Optimalizovaná metoda MHS-SPME-GC-FID (= vícenásobná headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení

s plynovou chromatografií a s plamenovým ionizačním detektorem) byla adekvátně validována a prezentovala reprodukovatelnost (jako RSD = *Relative Standard Deviation*, relativní směrodatná odchylka v %) nižší než 13 % a limity detekce méně než 7 µg/kg [82].

### 1.4.3 Stanovení aromatických složek v rajčatech

Těkavé složky obsažené v ovoci a zelenině přispívají k aroma a chuti. Tyto látky jsou široce studovány, zejména s ohledem na aroma. Bylo identifikováno více než 400 těkavých sloučenin, ale pouze malý počet z těchto sloučenin přispívá na aromatický profil těchto potravin. Za aroma potravin jsou zodpovědné: aldehydy, ketony, estery, alkoholy, terpeny a fenoly [83].

Ve své studii se Serrano a kol. [83] zabývali stanovením přibližně 21 těkavých sloučenin v rajčatech, které dávají rajčatům jejich přirozenou rajčatovou příchut' a aroma. Těkavé sloučeniny byly stanovovány pomocí MHS-SPME-GC-MS. Pro studii přesnosti porovnávali kvantitativní výsledky s výsledky získanými pomocí standardních postupů opakovanými analýzami. Ve vzorcích rajčat byly stanovovány následující sloučeniny: Z-3-hexanal, hexanal, E,E-2,4-hexadienal, 6-methyl-5-hepten-2-on, 6-methyl-5-hepten-2-ol, E,E-2,4-heptadienal, R-limonen, 2-isobutylthiazol, guaiacol, E-2-octenal, linalool, 2-fenylethanol, methylsalicylát,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -cyklocytral, Z-citral, E-citral, E,E-2,4-dekadial, difenylether, geranylaceton a  $\beta$ -ionon [83].

Vzorky rajčat pro tuto studii byly získány komerčně (Španělsko, počet vzorků rajčat v této studii nebyl uveden). Referenční standardy byly získány od Supelco (Sigma-Aldrich a Fluka). K identifikaci a kvantifikaci těkavých látek v rajčatech byl využit plynový chromatograf spojený s MS spektrometrem Varian 4000 MS (analyzátor iontová past). Byla použita kapilární kolona VF-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25 µm). Vlákná pro MHS-SPME byla CAR/PDMS. Před samotnou analýzou byly vzorky rajčat rozmixovány a homogenizovány za pomoci mixéru (UltraTurrax) po dobu 1 minuty. Dále byla provedena optimalizace celého procesu extrakce. V prvním kroku optimalizace bylo provedeno několik po sobě jdoucích extrakcí za použití různých hmotností vzorků: 0,1 g, 0,5 g a 2 g. SPME extrakce se prováděly pětkrát při 40 °C, 60 °C, 70 °C a 80 °C po dobu 50 minut. Optimalizací podmínek se zjistilo, že optimální navážka vzorku bylo 0,1 g. Toto množství vzorku se navážilo do 10ml nádoby a podrobilo se extrakci při 70 °C po dobu 50 minut pomocí vlákna CAR/PDMS. Po ukončení extrakce, bylo vlákno vloženo do GC nástřikového portu, kde došlo k jeho desorpci. Analýza v GC chromatografu probíhala dle následujících podmínek:

- teplota nástřikového portu – 300 °C;
- nosný plyn (MF) – helium při průtokové rychlosti 1 ml/min;
- doba desorpce – 5 min;
- teplotní program: 40 °C (udržováno po dobu 5 minut) do 141 °C rychlostí 3 °C/min, zvýšení na 300 °C rychlostí 30 °C/min;
- doba chromatografické analýzy – 45 min.

Sloučeniny byly identifikovány porovnáváním hmotnostních spekter autentických standardů nebo s dostupnými knihovny a literaturou. Podmínky pro hmotnostně spektrometrický detektor (MSD) byly:

- režim elektronové ionizace EI (70 eV);
- rozsah skenování – 60–200 Da;
- teplota iontového zdroje – 200 °C.

Metoda MHS-SPME-GC-MS byla validována. Bylo ověřeno, že tato metoda je velice přesná. Prokázalo se, že MHS-SPME je adekvátní technikou k zabránění účinkům matrice u komplexních vzorků [83].

#### **1.4.4 Stanovení ethylkarbamátu v kyselých okurkách**

Kyselé okurky se řadí mezi tradiční produkty fermentované kyselinou mléčnou. Zachovávají si dobré sensorické vlastnosti a živiny, protože fermentace kyselinou mléčnou je „studený proces“. Tato úprava okurek se stává velice populární, a to kvůli své zvláštní chuti. Díky tomu se zvyšuje poptávka po tomto produktu a výroba i spotřeba neustále rostou. Spotřebitelé čím dál tím více řeší potenciální rizika pro potraviny. Z tohoto důvodu nemusí stačit hlídání dusičnanů, dusitanů, sekundárních a biogenních aminů, ale je třeba věnovat zvláštní pozornost ethylkarbamátu v kyselých okurkách [84].

Ethylkarbamát se hlavně vyskytuje ve fermentovaných potravinách a na lidský organismus může působit jako karcinogen. Byl nalezen také v chlebu, lihovinách, vínech, saké, sójové omáčce, kimči a vánočním pudinku. Největší pozornost na sebe přilákaly lihoviny, pro které jsou již v dnešní době stanoveny maximální limity obsahu ethylkarbamátu. Jeho stanovení ve fermentovaných potravinách není vůbec snadné, protože matrice jsou extrémně komplikované a navzájem se liší [84].

Tato studie (Lei Fen-Fen a kol. [84]) se zabývala stanovením ethylkarbamátu pomocí MHS-SPME-GC-FID. Byl použit kapilární GC systém SP – 6890A vybavený kapilárním splitless systémem. Součástí byla kapilární kolona AE-FFAP (30 m × 0,32 mm × 0,33 μm).

K MHS-SPME bylo používáno nově vyvinuté vlákno potažené fází AMTEOS-MA/OH-TSO (= anilino-methyl triethoxy křemičitan-methakrylová kyselina/hydroxylym terminovaný silikonový olej). Před započítím analýzy proběhla příprava vzorku (pět druhů nejčastěji konzumovaných okurek) a optimalizace procesu. Byl navážen jeden gram homogenizovaného vzorku okurky, ten se smíchal s 10 g bezvodého síranu sodného. Po smíchání se odvážilo 55 mg této směsi do 10ml nádoby. Optimalizací se zkoumal vliv teploty extrakce, doby extrakce vzorku a přídavku bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Testovalo se pět extrakčních teplot, a to: 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C. Extrakce byla provedena třikrát a extrahované množství se snižovalo se zvyšující se teplotou. Jako vhodná extrakční teplota bylo zvoleno 30 °C. Doba extrakce vzorku měla také vliv na účinnost extrakce ethylkarbamátu. Plocha píku se zvyšovala relativně rychle s prodloužením doby z 10 na 20 minut. Po 20 minutách se ale zvyšovala nižší rychlostí, proto se z důvodu úspory času zvolila doba 20 minut. Přidáním 10 g bezvodého síranu sodného se zlepšila účinnost extrakce vysušením vzorku. Obsah vody se v testovaných vzorcích lišil, proto se přidávalo vždy 10 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Následně se provedla extrakce vzorku, kdy se provedly tři po sobě jdoucí extrakce při teplotě 30 °C po dobu 20 minut a analýza pak probíhala dle následně uvedených podmínek:

- teplota injektoru – 240 °C;
- nosný plyn (MF) – dusík, který proudil lineární rychlostí 12–15 cm/s
- teplotní program: počáteční teplota 70 °C, zahřáto na 120 °C rychlostí 3 °C/min; a poté teplota zvýšena na 180 °C rychlostí 8 °C/min;
- teplota FID detektoru – 250 °C [84].

Touto studií se získaly uspokojivé výsledky. Výsledky ukazovaly na potencionální použití MHS-SPME při analýze komplexních vzorků. Došlo k odstranění matricového efektu, zjednodušila se kvantifikace sloučeniny, snížila se pracnost a náklady na analýzu. Metoda prokázala uspokojivou linearitu (0,1–100 mg/kg), přesnost (RSD = 4,25 %) a detekční limit (0,038 mg/kg). Studie připomíná, že je nutné monitorování ethylkarbamátu v okurkách [84].

#### **1.4.5 Stanovení sloučenin odpovědných za Brettův znak ve vínech**

Těkavé fenolické látky obsažené ve víně pozitivně ovlivňují jeho aroma. Ve vysokých koncentracích mohou způsobovat nepříjemnou vůni, která negativně ovlivňuje kvalitu vína. Kvasinky rodu *Brettanomyces* (zkráceně Brett) nebo *Dekkera* dekarboxylují kyseliny *trans*-kumarové za vzniku vinylfenolů, které se později transformují redukčními reakcemi na ethylfenoly (4-ethylfenol, 4-ethylguaikol, 4-vinylguaikol a 4-vinylfenol). Tyto sloučeniny jsou spojeny se známým Brettovým charakterem a s velkým spektrem chutí a aroma

(farmaceutické aroma, dále pak aroma po hřebíčku, chlebu, šafránu, kouři a koňském sedle). Nové trendy ve vinařství vedou ke zvyšování koncentrace kvasinek a tím i ke zhoršování kvality vína. Z toho důvodu je pro vinaře důležité koncentrace vznikajících fenolů kontrolovat [85].

Pizarro a kol. [85] se ve své studii zabývali vícenásobnou headspace mikroextrakcí tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií pro kvantitativní analýzu 4-ethylfenolu, 4-ethylguaikolu, 4-vinylguaikolu a 4-vinylfenolu. MHS-SPME je modifikace SPME, která zahrnuje několik po sobě jdoucích extrakcí ze stejného vzorku a vyhýbá se možným matricovým efektům. Zároveň tato studie demonstruje existenci matricového efektu při analýze sloučenin odpovědných za Brettovy znaky ve víně za použití metody headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a tandemovou spektrometrií [85].

Pro tuto studii bylo zakoupeno osm různých vín (čtyři červená, dvě bílá a dvě růžová). Původ vín byl různý (značka, místo původu ani místo zakoupení vín nebyli v této studii uvedeny).

Roztoky syntetického vína byly připraveny rozpuštěním kyseliny L-(+)-vinné v hydro-alkoholovém roztoku (13%, v/v ethanolu):

- 5 g/l pro červená vína;
- 6 g/l pro bílá a růžová vína.

pH těchto výsledných roztoků bylo upraveno pomocí NaOH:

- pH syntetického červeného vína bylo 3,5;
- pH syntetického bílého a růžového vína bylo 3 [85].

Skutečné a syntetické vzorky byly obohaceny různým množstvím pracovních roztoků obsahující cílové analyty [85].

Podmínky spojené s postupem HS-SPME aplikovaným na analýzu 4-ethylfenolu, 4-ethylguaikolu, 4-vinylguaikolu a 4-vinylfenolu ve skutečném víně a syntetických vzorcích byly vyvinuty v dřívějším výzkumu, který se zabýval různými parametry, jako je povlak vláken, doba a teplota extrakce, objem vzorku a iontová síla (byla studována doba extrakce v rozmezí od 0 do 90 minut při 60 °C s vláknem CW/DVB) [86]. S ohledem na dřívější výzkum bylo pro každou SPME 5 ml vzorku vloženo do 20ml nádoby s headspace prostorem. Bylo přidáno 1,17 g chloridu sodného a poté byla nádoba těsně uzavřena. Vzorky byly inkubovány při teplotě 60 °C po dobu 5 minut, poté byla třikrát provedena extrakce z headspace prostoru po dobu 50 minut za pomoci vlákna CW/DVB. Během extrakce byl vzorek míchán. Po dokončení extrakce bylo vlákno vyjmuto a vloženo do nástřikového portu GC-MS. Pro



kalibraci MHS-SPME bylo použito 50 µl vodných roztoků analytů. Postup byl zcela stejný, jak je popsán výše, jediným rozdílem byla doba extrakce. V tomto případě trvala 40 minut [85].

Analýzy byly provedeny plynovým chromatografem Varian 3800 vybaveným autosamplerem Combi-Pal (CTC Analytics) a připojeným k hmotnostnímu spektrometru s iontovou pastí. Sloučeniny byly separovány pomocí kolony CP-WAX 52-CB (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm).

Analýza pak probíhala následovně:

- teplota nástřikového portu – 220 °C;
- režim vstřikování – nejdříve splitless;
- nosný plyn (MF) – hélium o průtokové rychlosti 1 ml/min;
- doba desorpce – 5 minut;
- teplotní program: 35 °C (udržováno po dobu 2 minut) do 170 °C (udržováno po dobu 2 minut) rychlostí 20 °C/min, následně 210 °C (udržováno po dobu 15 minut) rychlostí 3 °C/min.

Podmínky pro hmotnostně spektrometrický detektor (MSD) byly:

- režim elektronové ionizace EI (70 eV);
- rozsah skenování – 30–450 A.M.U.;
- teplota iontového zdroje – 200 °C.

Jak již bylo výše uvedeno, HS-SPME demonstrovala existenci matricového efektu při analýze sloučenin odpovědných za Brettovy znaky ve víně. Z toho důvodu byla MHS-SPME navržena jako alternativní technika s ohledem na HS-SPME. MHS-SPME byla validována a získané detekční limity byly:

- 0,06 µg/l pro 4-ethylguaiakol a 4-ethylfenol;
- 0,20 µg/l pro 4-vinylguaiakol;
- 0,12 µg/l pro 4-vinylfenol.




Tyto detekční limity byly pod prahovými hodnotami pro detekci sloučenin způsobující zápach ve vinných matricích. Získaná opakovatelnost (RDS) byla v rozmezí 1–12 %. Pro vyhodnocení použitelnosti MHS-SPME byly porovnávány koncentrace s výsledky získanými metodou standardního přídatku a výsledky byly u obou metod podobné. Z toho důvodu lze MHS-SPME používat za alternativu, aby se zabránilo matricovému efektu ve vzorcích vína [85].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



### 2.1 Vzorky

Vzorky pív byly zakoupeny v hypermarketech nacházejících se na území ČR (Kaufland, Albert Hypermarket, Makro, Tesco a Billa). Pro tuto diplomovou práci byla použita piva chmelená za studena i chmelená klasickým způsobem (tabulka 3). Byly použity vždy dva vzorky od jedné značky. Výjimkou byla piva Muflon a Sedmý schod – jen jeden vzorek. Piva značky Bakalář byla zakoupena ve trojici – chmelené za studena, chmelené klasickým způsobem a nealko chmelené za studena. Vzorky byly záměrně zakoupeny do dvojic z toho důvodu, aby se obsah linaloolu mohl porovnat.

Tabulka 3: Vzorky pív

Pivo - balení	Název	Druh	Výrobce	Obsah alkoholu	Typ chmelení
	Muflon	Světlý ležák	Pivovar Kunratice (Praha-Kunratice, ČR)	5,5 % obj.	Studené
	Sedmý schod	Světlé	Žatecký pivovar (Žatec, ČR)	5,5 % obj.	Studené
	Bakalář NEALKO	Nealko		max. % obj.	Studené
	Bakalář	Světlý ležák	Pivovar Bakalář (Rakovník, ČR)	5,2 % obj.	Studené
	Bakalář	Světlá desítka		4,0 % obj.	Klasické

**Tabulka 3:** Vzorčky piv – pokračování

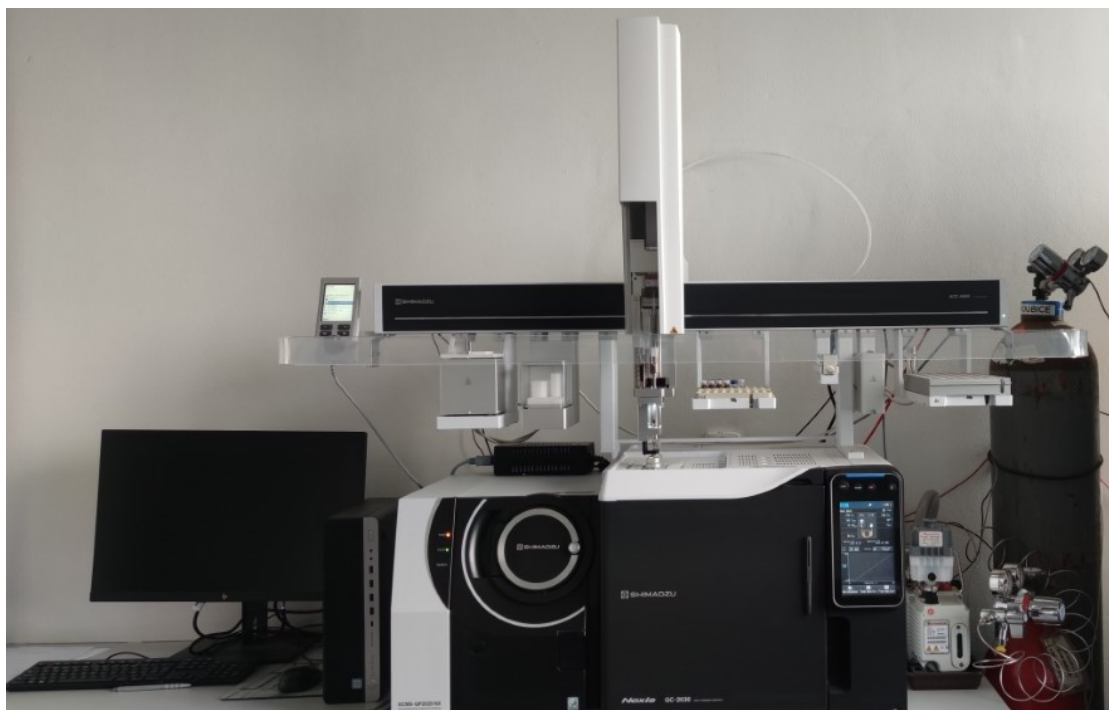
Pivo - balení	Název	Druh	Výrobce	Obsah alkoholu	Typ chmelení
	Svijany	Světlý ležák	Pivovar Svijany	4,8 % obj.	Studené
	Svijanský rytíř	Světlý ležák	(Svijany, ČR)	5,0 % obj.	Klasické
	Lobkowicz	Světlý ležák	Pivovary Lobkowicz (Hlinsko, ČR)	4,7 % obj.	Klasické
	Lobkowicz ALE	Světlé		4,4 % obj.	Studené
	Radegast	Světlé	Plzeňský Prazdroj (Plzeň, ČR)	4,1 % obj.	Klasické
	Radegast Ratar	Světlé		4,3 % obj.	Studené
	Primátor exkluziv	Světlý ležák	Primátor (Náchod, ČR)	7,5 % obj.	Klasické
	Primátor IPA	Polotmavé		6,5 % obj.	Klasické
	Primátor tchyně	Světlý ležák		4,7 % obj.	Klasické + Studené
	Birell	Světlé	Plzeňský Prazdroj (Plzeň, ČR)	max. 0,5 % obj.	Klasické
	Birell	Světlé		max. 0,5 % obj.	Studené

## 2.2 Chemikálie

- destilovaná voda – centrální rozvod Univerzity Pardubice, ČR
- 99,9% methanol – Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha, ČR
- 97% linalool – Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha, ČR

## 2.3 Použité přístroje a zařízení

- automatická pipeta (0,5-10  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l a 100-1000  $\mu$ l) – Biohit Oyj, Helsinky, Finsko
- mikrostříkačka Hamilton (10  $\mu$ l) – HAMILTON Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko
- kádinky (100 ml, 250 ml a 1000 ml) – Fischer Scientific, Pardubice, ČR
- extrakční nádobky pro měření (20 ml) se zátkami – Fischer Scientific, Pardubice, ČR
- septa polytetrafluorethylen/silikon – Fischer Scientific, Pardubice, ČR
- odměrné baňky se zátkami (10 ml, 50 ml, 100 ml a 250 ml) – Fischer Scientific, Pardubice, ČR
- plynový chromatograf GC-2030 s MS-QP2020 NX detekcí v kombinaci s FID detekcí (obrázek 16) – Shimadzu, Kyoto, Japonsko
- autosampler AOC-6000 Plus – Shimadzu, Kyoto, Japonsko
- tlaková láhev s heliem (čistota 5,0) – Linde Gas, Praha, ČR
- tlaková láhev s dusíkem (čistota 4,0) – centrální rozvod Univerzity Pardubice, ČR
- tlaková láhev s vodíkem (čistota 5,0) – Linde Gas, Praha, ČR
- nepolární kapilární kolona SLB-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m) – Supelco Bellefonte, PA, USA
- držák SPME – Supelco Bellefonte, PA, USA
- mikroextrakční vlákna 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS – Supelco Bellefonte, PA, USA
- sběr dat – GC Solution a GCMS Solution 4.20 – Shimadzu, Kyoto, Japonsko
- software Statistica 12 – StatSoft, Inc., Praha, ČR
- horkovzdušná sušárna – Memmert UM 300, Swabach, Německo
- ultrazvuková lázeň Sonorex TK 52 – Bandelin electronic, Berlín, Německo
- analytické váhy Sartorius – Fischer Scientific, Pardubice, ČR



**Obrázek 16:** Plynový chromatograf GC-2030 s MS-QP2020 NX detekcí v kombinaci s FID

## **2.4 Podmínky separace na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem**

Všechny roztoky standardů a vzorků piv byly dávkovány pomocí autosampleru AOC-6000 Plus. Desorpce analytů probíhala v nástřikovém portu GC s MS detekcí (MS-QP2020 NX) při teplotě 250 °C po dobu 1 minuty. Separace analytů probíhala na nepolární kapilární koloně SLB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Před každou analýzou bylo SPME vlákno čištěno při teplotě 200 °C po dobu 2 minut, aby se zabránilo nežádoucím interferencím.

Režim dávkování vzorků se odehrával ve splitovacím poměru 1:10. Programovatelný teplotní režim analýzy pomocí GC-MS byl: od 55 °C (udržováno po dobu 3 minut) do 160 °C (udržováno po dobu 1 minutu) rychlostí 6 °C/min. Teplota GC-MS převodníku byla 200 °C.

Ionizační energie byla 70 eV. Pro měření byl použit SIM mód, ve kterém byly sledovány tři ionty charakteristické pro linalool (iont m/z 55, 71 a 93). Hlavním iontem byl iont m/z 71, podle kterého byly vyhodnocovány veškeré chromatogramy. Nosným plynem použitým pro tuto práci bylo helium s konstantní lineární rychlostí 30 cm/s.

## **2.5 Optimalizace metody opakované headspace mikroextrakce tuhou fází**

Před prvním použitím bylo mikroextrační vlákno 50/30 μm DVB/CAR/PDMS podrobena kondicionaci při 270 °C po dobu 30 minut, poté mohly být provedeny optimalizace. Jako první

byly optimalizovány objemy pro MHS-SPME u vzorku piva (Bakalář). Do třech 20 ml extrakčních baněk byl odměřen 1  $\mu$ l vzorku piva a následně byla provedena MHS-SPME-GC-MS. Extrakce probíhala při teplotě 70 °C po dobu 30 minut. MHS-SPME byla uskutečněna z jedné extrakční baňky čtyřikrát. Následně při stejných podmínkách byly proměřeny a analyzovány ještě objemy 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 7  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 250  $\mu$ l a 500  $\mu$ l.

Byl také optimalizován počet extrakcí při MHS-SPME. Nejdříve bylo prováděno MHS-SPME s 10 extrakcemi, ve finále pak byly prováděny MHS-SPME experimenty pouze se 4 extrakcemi.

Dalšími optimalizovanými parametry byly doba inkubace a teplota a doba extrakce (tři nezávislé proměnné – tabulka 4). Podmínky jednotlivých experimentů byly sestaveny na základě centrálního kompozitního plánování experimentů.

**Tabulka 4:** Podmínky MHS-SPME s inkubací

Měření číslo	Doba inkubace [min]	Teplota extrakce [°C]	Doba extrakce [min]
1	10	50	25
2	4	58	13
3	16	58	37
4	4	58	37
5	16	58	13
6	0	70	25
7	10	70	5
8	10	70	25
9	10	70	25
10	10	70	25
11	10	70	45
12	20	70	25
13	4	82	37
14	16	82	13
15	4	82	13
16	16	82	37
17	10	90	25

Do extrakčních nádobek bylo nejdříve odměřeno 100  $\mu$ l roztoku standardu Linaloolu o koncentraci 6,56 mg/l v 99,9% methanolu, který byl následně podroben MHS-SPME dle tabulky 5 a analýze. MHS-SPME proběhla vždy čtyřikrát po sobě. Stejným způsobem pak proběhly MHS-SPME a analýza u vzorku odplyněného piva (100  $\mu$ l piva Bakalář studeně chmeleného) kvůli prověření vlivu matrice na podmínky extrakce.

Posledními optimalizovanými parametry byly teplota a doba extrakce, tentokrát bez inkubace (dvě nezávislé proměnné – tabulka 5). Celý postup měření byl zcela shodný s MHS-SPME-GC-MS postupem s inkubací, jen se lišily teploty a doby extrakce a nebyla provedena žádná inkubace.

**Tabulka 5:** Podmínky MHS-SPME bez inkubace

Měření číslo	Teplota extrakce [°C]	Doba extrakce [min]
1	50	25
2	56	11
3	56	39
4	70	25
5	70	25
6	70	5
7	70	45
8	84	11
9	84	39
10	90	25

## 2.6 Kalibrace pro metodu opakovaná headspace mikroextrakce tuhou fází

Do odměrné baňky 50 ml byl připraven zásobní roztok linaloolu o koncentraci 164,0 mg/l. Ze zásobního roztoku bylo pak přichystáno do 10 ml odměrných baněk 5 kalibračních roztoků v rozmezí koncentrací od 1,64 mg/l až 13,12 mg/l v 99,9% methanolu. Z takto připravených kalibračních roztoků bylo vždy odměřeno 100 µl do 20 ml extrakčních nádobek. Následně byla provedena MHS-SPME-GC-MS. MHS-SPME byla uskutečněna pokaždé čtyřikrát při teplotě 60 °C po dobu 30 minut, a to pro každý kalibrační roztok. Všechny kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát.

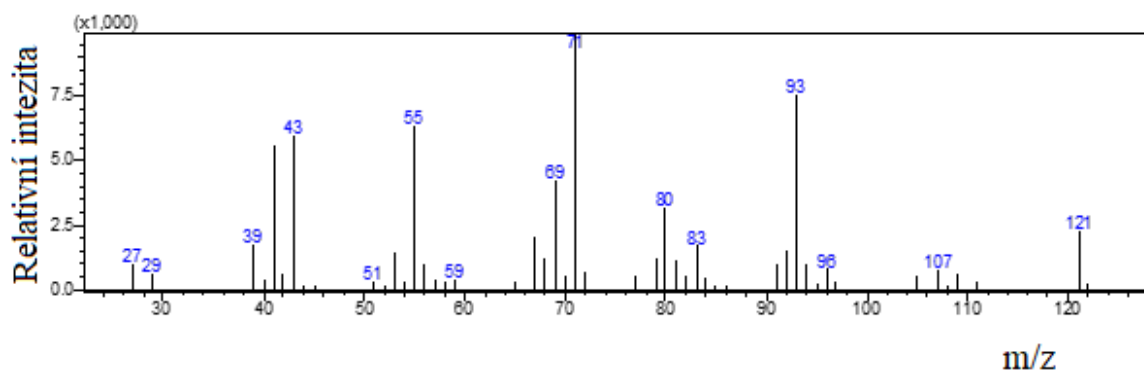
## 2.7 Analýza reálných vzorků pív

Veškeré vzorky piva byly nejprve před MHS-SPME odplyněny na ultrazvukové lázni Sonorex TK 52 po dobu 20 minut. Dále pak bylo odměřeno do 20 ml extrakčních nádobek 100 µl vzorku piva a byla uskutečněna MHS-SPME-GC-MS. MHS-SPME byla provedena čtyřikrát při teplotě 60 °C po dobu 30 minut s následnou analýzou. Všechna měření reálných vzorků pív byla opakována třikrát.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 3.1 Volba separačních a detekčních podmínek

Podmínky separace byly voleny na základě diplomové práce L. Jiroutkové [87] s tím, že v případě reálných vzorků piv proběhl vždy celý teplotní program, v případě experimentů se standardem linaloolu byl tento program ukončen po 20 minutách. Jako vhodný splitovací poměr byl zvolen 1:10 a při tomto poměru byly prováděny všechny experimenty jak během optimalizace, tak i při aplikaci metody na reálné vzorky. Pro detekci linaloolu byl zvolen SIM mód, který umožňuje potlačit šum tím, že nebudou sledovány všechny fragmenty, ale pouze fragmenty charakteristické pro danou sloučeninu. Na základě MS spektra (obrázek 17) linaloolu byly vybrány  $m/z$  ionty 55, 71 a 93, přičemž iont 71 byl použit jako kvantifikátor a zbylé 2 ionty pro potvrzení identity.



Obrázek 17: MS spektrum linaloolu

### 3.2 Vyhodnocení optimalizace metody opakované headspace mikroextrakce tuhou fází

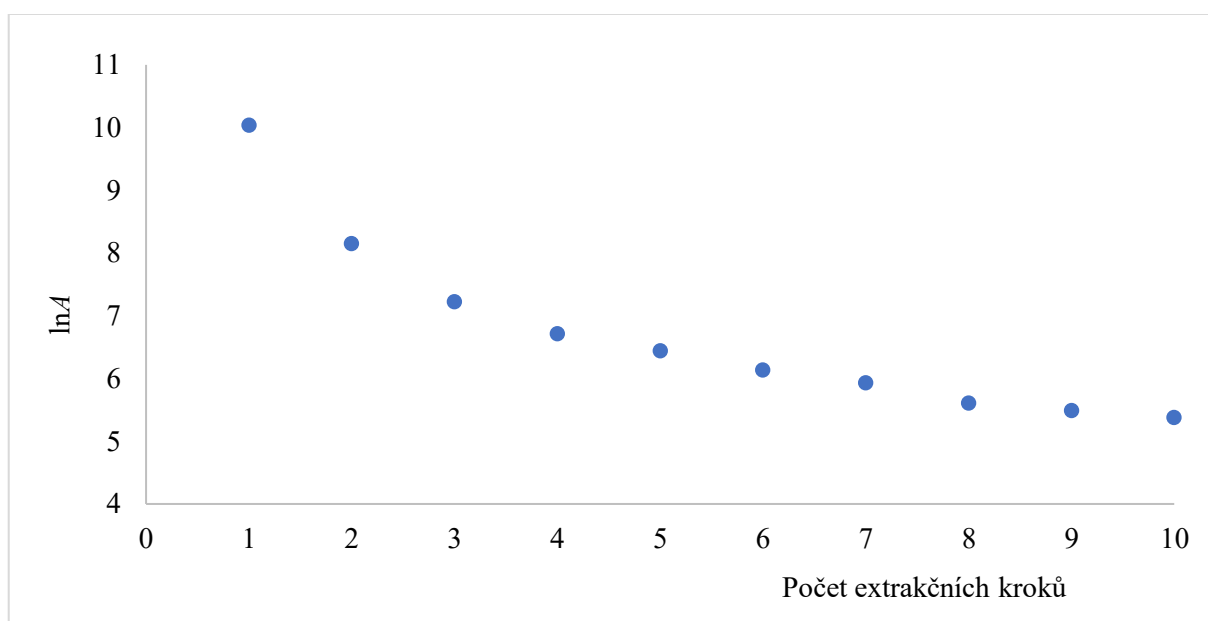
První optimalizovanou veličinou byl objem vzorku piva pro MHS-SPME, kdy byl nejdříve zkoušen objem 1  $\mu\text{l}$ , dále pak 2  $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$ , 7  $\mu\text{l}$  a 10  $\mu\text{l}$ . Jednotlivá měření se mezi sebou významně lišila. Výsledky pro zkoušené objemy vzorku vykazovaly špatnou odezvu. Píky linalolu při těchto experimentech byly poměrně malé a nedostačující byla i reprodukovatelnost výsledků, kdy se hodnoty RSD pohybovaly vysoko přes 20 %. Výsledky se nezlepšily ani v případě, že bylo pro každý experiment použito úplně nové, tj. dosud nepropíchnuté septum.

Kvůli zlepšení výsledků byly následně experimenty provedeny s větším množstvím vzorku, a to konkrétně se 100  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$  a 500  $\mu\text{l}$ . Při těchto experimentech došlo k významnému zlepšení reprodukovatelnosti výsledků, kdy hodnoty RSD pro 3 opakované experimenty se pohybovaly v rozmezí 2–4 %. Výsledky jsou dokumentovány v příloze I, kde obrázky I/1 až



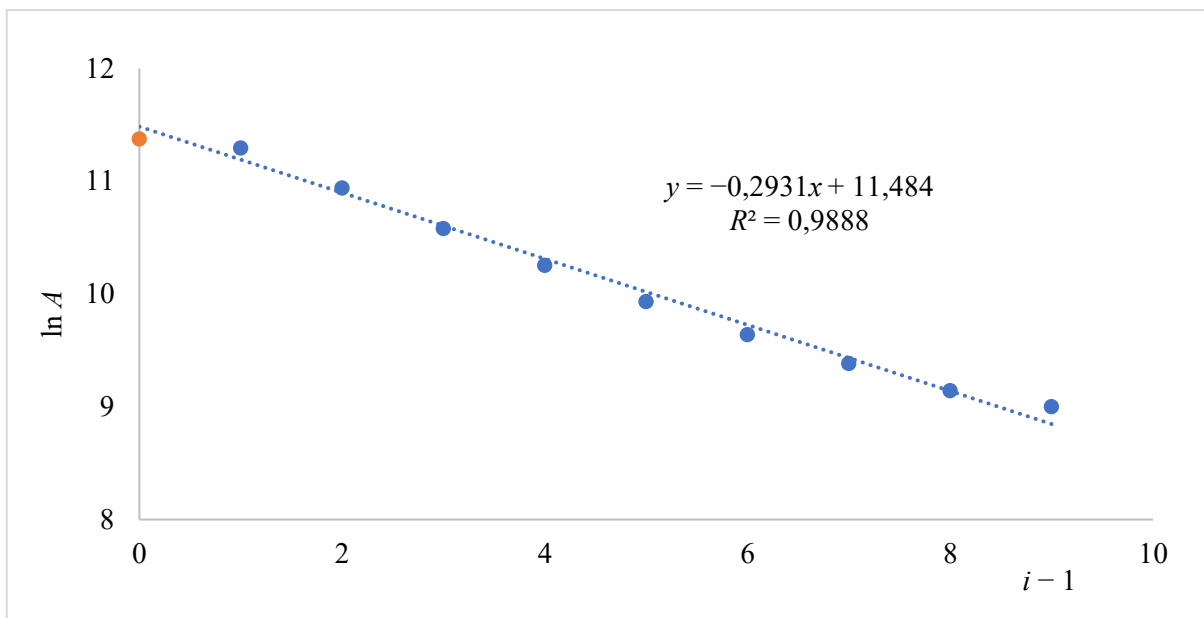
I/3 ilustrují chromatogramy z měření zmíněných zkoušených objemů (100  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$  a 500  $\mu\text{l}$ ) vzorku piva (Bakalář) pro MHS-SMPE-GC-MS. Obrázky I/4 až I/6 ilustrují grafy (závislosti ploch píků na počtu měření) představující opakovatelnost MHS-SPME-GC-MS metody pro vzorek piva (Bakalář). Z obrázků v příloze I lze vyčíst, že všechny tři použité objemy (100  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$  a 500  $\mu\text{l}$ ) vykazovaly příznivou odezvu (píky byly dostatečně veliké a snadno se integrovaly) a opakovatelnost. Nakonec pro měření reálných vzorků piv byl vybrán objem 100  $\mu\text{l}$ .

Při volbě počtu extrakčních kroků pro MHE postup bylo nejprve prováděno 10 po sobě jdoucích extrakcí ze stejné nádoby. Plochy jednotlivých extrakcí postupně dle očekávání klesaly – viz obrázek 18. Pro tyto experimenty byl použit standardní roztok linaloolu o koncentraci 13,12 mg/l.



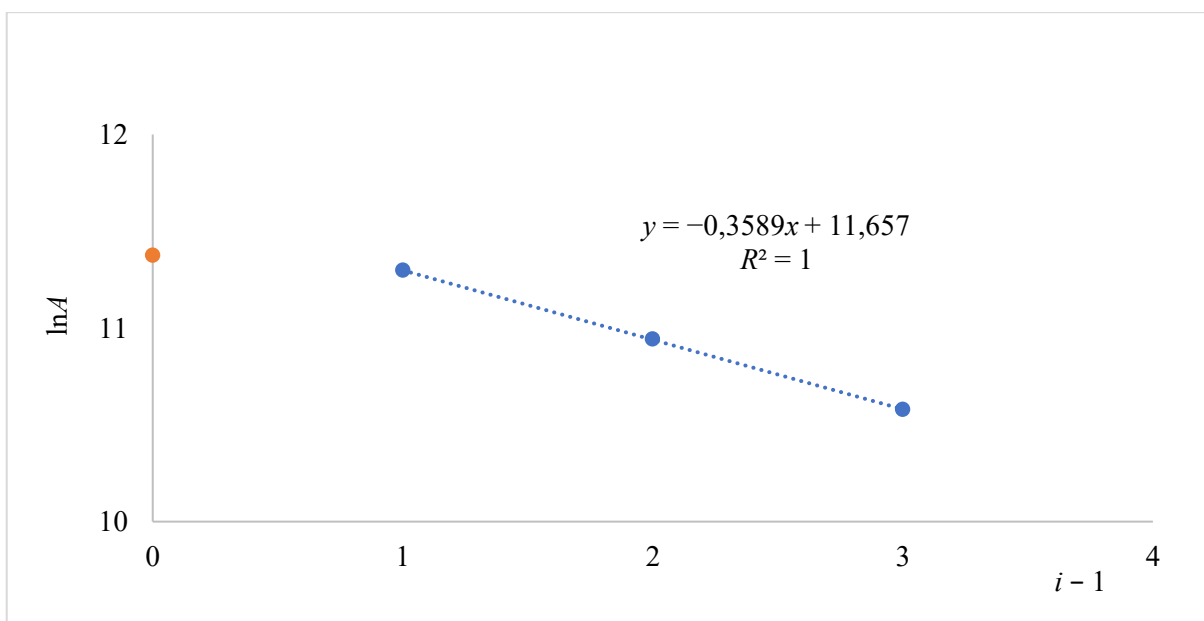
**Obrázek 18:** Závislost  $\ln A$  na počtu extrakčních kroků (10 extrakčních kroků pro MHE)

Pro vyhodnocení celkové plochy dle postupu popsaného v kapitole 1.2.2 bylo třeba sestavit závislost  $\ln A$  na hodnotě  $i - 1$ . Tímto postupem byla získána závislost prezentovaná na obrázku 19.



**Obrázek 19:** Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$

Při MHE postupu se doporučuje provádět 3–4 extrakční kroky. V tomto případě, jak je vidět z uvedeného obrázku, jsou 4 postupné extrakce nezbytné minimum vzhledem k barevně odlišenému bodu, který představuje první extrakční krok. Zde je však vidět, že tento krok není součástí lineární závislosti tak, jako následující kroky. Upravený graf, tj. graf s prvními čtyřmi extrakčními kroky, je dokumentován na obrázku 20.



**Obrázek 20:** Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro 4 kroky MHE

Na základě uvedené regrese byly dle rovnic v kapitole 1.2.2 vypočítány klíčové parametry pro MHE postup, a to včetně celkové plochy  $A_T$ . Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

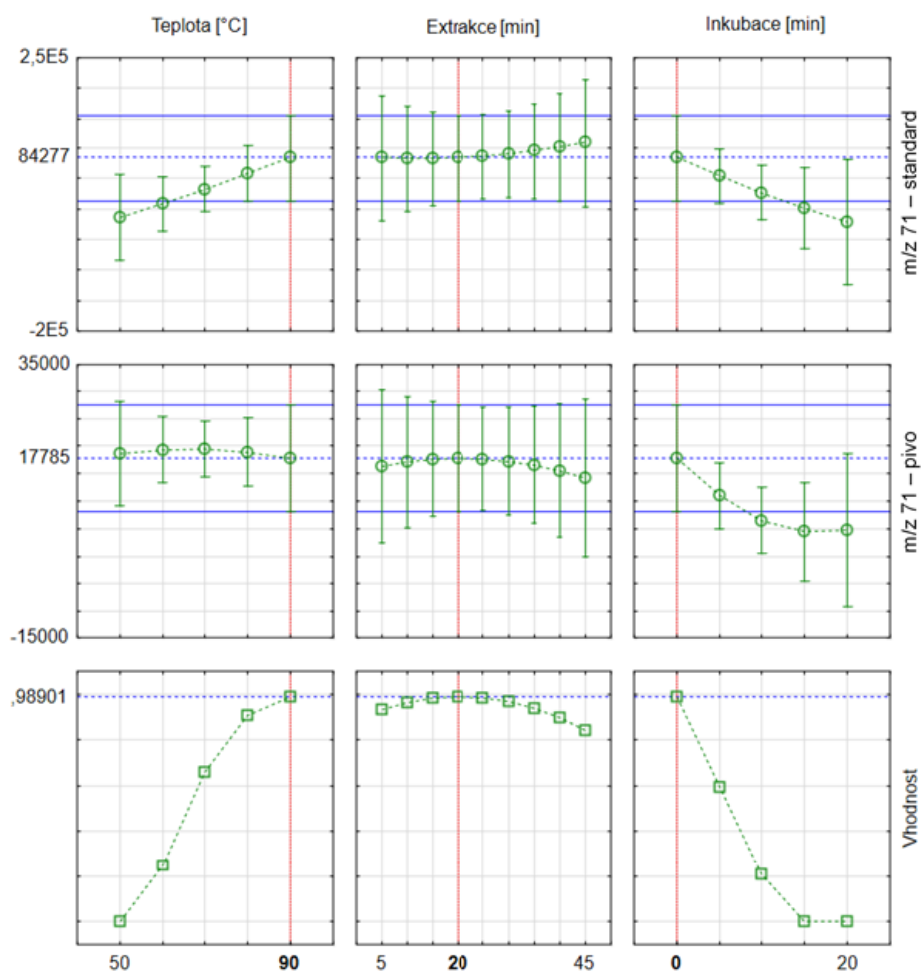
**Tabulka 6:** Klíčové parametry pro MHE postup spolu s  $A_T$

směrnice	-0,3589
úsek	11,6571
$A_1$ ( $e^{\text{úsek}}$ )	115506,08
$e^{-q}$	0,6984
$1 - e^{-q}$	0,3016
$A_T = A_1 / (1 - e^{-q})$	<b>383038,48</b>

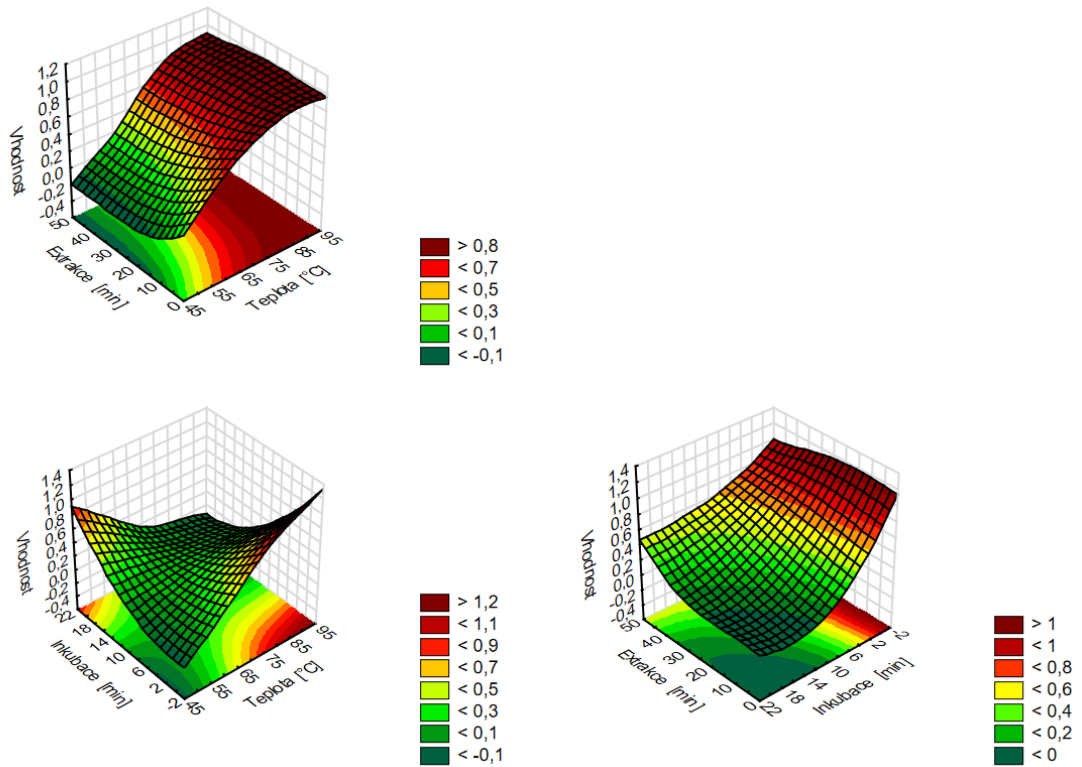
$q$  ... směrnice;  $A_1$  ... dopočítaná plocha prvního píku;  $A_T$  ... celková plocha píku

Dalšími optimalizovanými parametry byly doba inkubace, teplota a doba extrakce (tabulka 4). Po vyhodnocení programem Statistica 12 metodou odezvy plochy (obrázek 21 a 22) byly jako optimální podmínky určeny:

- doba inkubace: 0 minut;
- teplota extrakce: 90 °C;
- doba extrakce: 20 min.



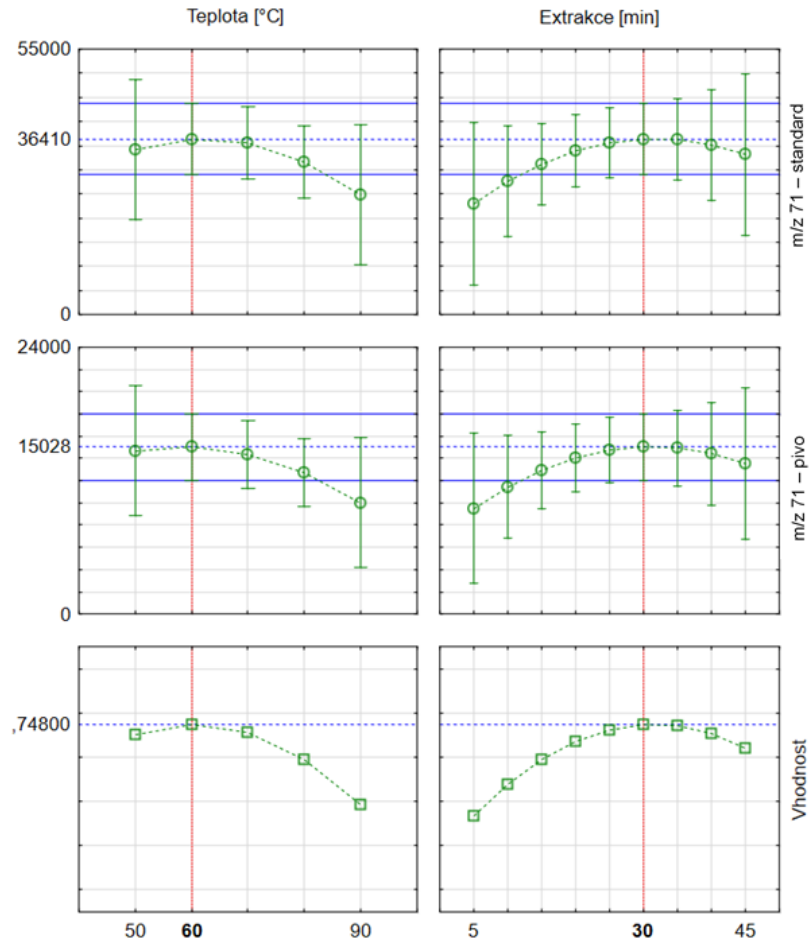
**Obrázek 21:** Vyhodnocení podmínek MHS-SPME s inkubací



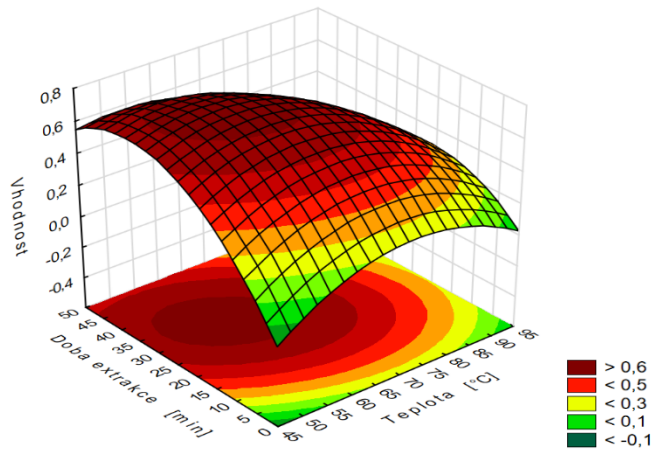
**Obrázek 22:** Odezvové vhodnostní profily podmínek MHS-SPME

Vyhodnocením obrázku 21 byla získaná podstatná a statisticky významná informace o inkubaci, kdy byla jako optimální vyhodnocena hodnota 0 minut. Z tohoto důvodu byla provedena další optimalizace, kdy byla optimalizována pouze doba a teplota extrakce, tentokrát již bez inkubace (tabulka 5). Naměřené hodnoty byly opět vyhodnoceny programem Statistica 12 metodou odezvové plochy (obrázek 23 a 24). Optimální podmínky byly určeny:

- teplota extrakce: 60 °C;
- doba extrakce: 30 min.



**Obrázek 23:** Vyhodnocení podmínek MHS-SPME bez inkubace



**Obrázek 24:** Odezvový vhodnotsní profil MHS-SPME

### 3.3 Vyhodnocení kalibrace, meze detekce a meze stanovitelnosti

Zjištěné optimální podmínky byly následně využity při měření kalibrační řady. Bylo proměřeno 5 kalibračních roztoků. Rozsah koncentrací byl od 1,64 mg/l až 13,12 mg/l v 99,9% methanolu (tabulka 7). Každý kalibrační bod byl podroben 4 krokům MHS-SPME a celé měření bylo třikrát opakováno. Z vyhodnocených ploch byl získán kalibrační graf – závislost průměrných ploch píků na koncentraci linaloolu (obrázek 25).

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly zjišťovány pomocí proměření jednotlivých kalibračních bodů (tabulka 7a obrázek 25). LOD pak byla následně vyhodnocena dle vzorce (18) a LOQ dle vzorce (19), kde  $k$  je směrnice kalibrační závislosti a  $s_a$  směrodatná odchylka úseku. Na obrázku 25 je znázorněna kalibrační přímka – závislost průměrné plochy píků ( $A_T$ ) na koncentraci ( $c$ ) linaloolu.

$$\text{LOD} = \frac{(3 \cdot s_a)}{k} \quad (18)$$

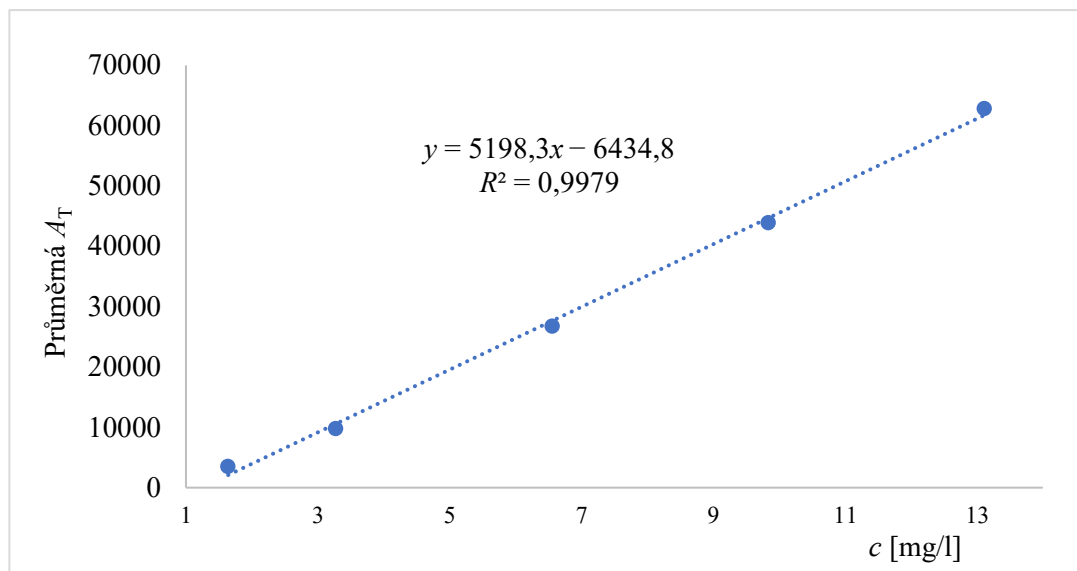
$$\text{LOQ} = \frac{(10 \cdot s_a)}{k} \quad (19)$$

**Tabulka 7:** Kalibrace metody MHS-SPME

Koncentrace $c$ [mg/l]	Průměrná celková plocha píku $A_T$
1,64	3485,84
3,28	9838,31
6,56	26781,30
9,84	43934,75
13,12	62815,87

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly:

- LOD: 0,4948 mg/l;
- LOQ: 1,6492 mg/l.



**Obrázek 25:** Závislost průměrných celkových ploch píků na koncentraci linaloolu ( $n = 3$ )

### 3.4 Zjištění koncentrace linaloolu v reálných vzorcích pív

Reálné vzorky pív byly rovněž podrobeny čtyřem po sobě jdoucím MHS-SPME při optimálních podmínkách (teplota extrakce 60 °C a doba extrakce 30 minut). Výjimkou byla piva: Radegast chmelený klasickým způsobem, Birell chmelený klasicky i za studena a Bakalář Nealko chmelený za studena. U těchto zmíněných pív byla provedena třikrát a u piva Bakalář Nealko dokonce jen dvakrát, z toho důvodu že došlo k vyčerpání analytu. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Vyhodnocením naměřených dat, na základě, kterých byla spočítána celková plocha, byly zjištěny koncentrace linaloolu v jednotlivých reálných vzorcích pív. V tabulce 8 jsou uvedeny průměrné celkové plochy vzorků pív, koncentrace linaloolu a RSD pro každý vzorek piva. Na obrázku 26 je graf porovnávající koncentrace linaloolu ve vzorcích piva. Chromatogramy vzorků jsou uvedeny v příloze II (obrázek II/1 až II/16).

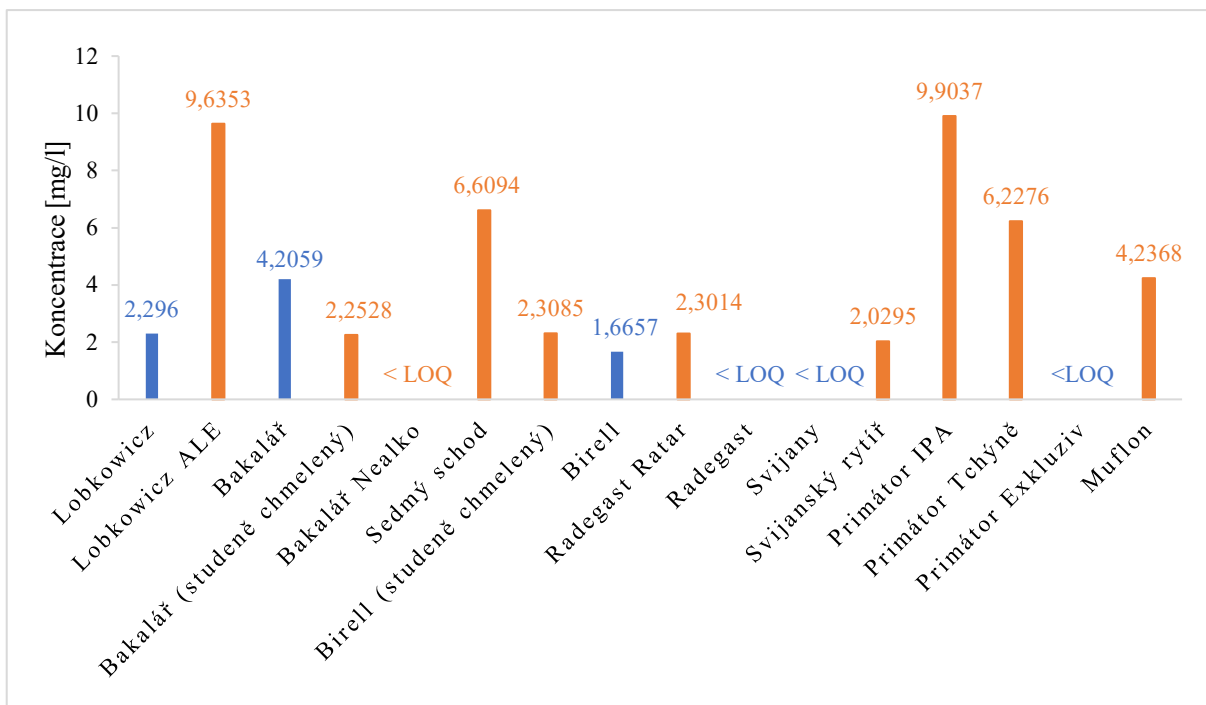
**Tabulka 8:** Průměrné celkové plochy píků a koncentrace linaloolu

Druh piva	Průměrná celková plocha píků	Koncentrace linaloolu [mg/l]	RSD [%]
Lobkowicz	5500,45	2,2960	3,34
Lobkowicz ALE	43652,51	9,6353	7,65
Bakalář klasický	15428,97	4,2059	14,83
Bakalář	5276,14	2,2528	14,19
Bakalář nealko	2027,09	< LOQ	9,9
Sedmý schod	27922,68	6,6094	10,62
Birell	5565,31	2,3085	11,55
Birell	2224,25	1,6657	3,85
Radegast Ratar	5528,41	2,3014	16,60
Radegast	1745,46	< LOQ	14,22
Svijany	1460,54	< LOQ	4,58
Svijanský rytíř	4114,96	2,0295	3,29
Primátor IPA	45047,50	9,9037	5,37
Primátor Tchyně	25938,34	6,2276	2,86
Primátor Exkluziv	2137,07	< LOQ	7,14
Muflon	15589,59	4,2368	4,25

vzorky piv v oranžových řádcích jsou chmelená za studena a v bílých řádcích chmelená klasickým způsobem

Z vyhodnocených výsledků je patrné (tabulka 8 a obrázek 26), že piva chmelená za studena měla vyšší koncentraci linaloolu než piva chmelená klasickým způsobem. Výjimkou bylo pivo Bakalář chmelené za studena, které mělo koncentraci nižší než pivo Bakalář chmelené klasickým způsobem. To mohlo být způsobeno použitím menšího množství chmele při výrobě tohoto piva. Obsah linaloolu v pivu lze tedy používat k rozlišení piv chmelených za studena od piv chmelených klasickým způsobem, ale ukazuje se, že spolehlivěji lze tyto 2 způsoby chmelení odlišit pouze u piv dané značky (např. Birell od Birell za studena chmelený nebo Svijany a Svijanský rytíř). Zobecnit tento postup na všechna piva však možné není.



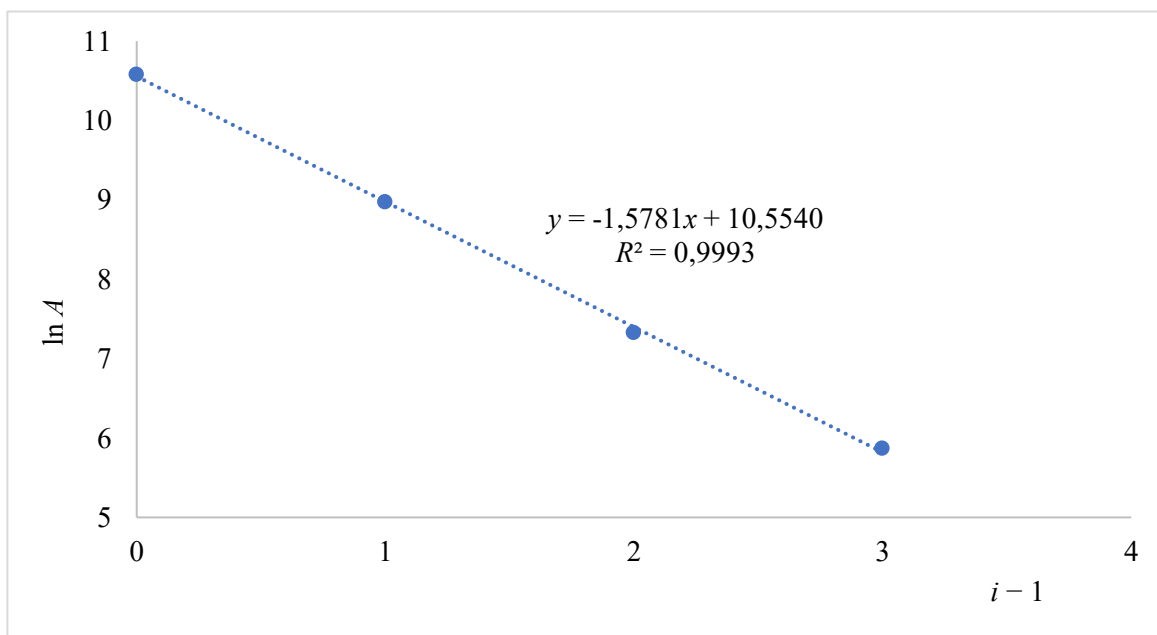


**Obrázek 26:** Porovnání koncentrace linaloolu v reálných vzorcích piv ( $n = 3$ )

chmelení za studena – oranžové hodnoty

chmelení klasickým způsobem – modré hodnoty

V následujícím výpočtu je uveden příklad výpočtu celkové plochy pro reálný vzorek piva (pivo Lobkowicz ALE). Tabulka 9 a 10 obsahuje potřebné hodnoty k výpočtu celkové plochy. Na obrázku 23 je znázorněna závislost  $\ln A$  na  $i - 1$ . V příloze III jsou uvedeny závislosti  $\ln A$  na  $i - 1$  pro reálné vzorky piv.



**Obrázek 27:** Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$

**Tabulka 9:** Naměřené hodnoty + hodnoty potřebné k výpočtu

Počet měření $i$	$i - 1$	Plocha píku $A$	$\ln A$
1	0	39353	10,5803
2	1	7886	8,9728
3	2	1518	7,3251
4	3	354	5,8693

**Tabulka 10:** Vypočtené hodnoty potřebné ke zjištění celkové plochy

směrnice	-1,5781
úsek	10,5540
$A_1 (e^{\text{úsek}})$	38331,32
$e^{-q}$	0,2064
$1 - e^{-q}$	0,7936
$A_T = A_1 / (1 - e^{-q})$	<b>48298,80</b>

$q$  ... směrnice;  $A_1$  ... dopočítaná plocha prvního píku;  $A_T$  ... celková plocha píku

## 4 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá stanovením obsahu linaloolu v reálných vzorcích piva pomocí metody vícenásobné headspace mikroextrakce tuhou fází v kombinaci s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

Teoretická část se zabývá historií výroby, dále jsou zde uvedeny suroviny potřebné pro výrobu piva, technologie výroby a vše o pivu, mikroextrakční techniky, plynová chromatografie a příklady použití vícenásobné headspace mikroextrakce tuhou fází.

V experimentální části proběhla nejdříve optimalizace vícenásobné headspace mikroextrakce tuhou fází. Optimalizovanými parametry byly objem použitého vzorku, doba extrakce, teplota extrakce a doba inkubace. Bylo zjištěno, že optimální podmínky jsou: teplota extrakce 60 °C, doba extrakce 30 minut a doba inkubace 0 minut. Tyto podmínky pak byly použity na 16 reálných vzorků piva.

K analýze byly využity vzorky piva od osmi různých značek (Lobkowicz, Muflon, Bakalář, Sedmý schod, Radegast, Primátor a Svijany). K porovnání koncentrace linaloolu bylo vždy vybráno alespoň jedno pivo chmelené za studena a k tomu pivo chmelené klasickým způsobem. Výjimkou byla piva Muflon a Sedmý schod, která byla jen chmelená za studena. Nejvyšší koncentraci linaloolu z řad piva chmelených klasickým způsobem vykazovalo pivo značky Bakalář a nejnižší piva Radegast, Svijany a Primátor. V těchto pivech se koncentrace pohybovala pod mezí stanovitelnosti. Nejvyšší koncentraci linaloolu z řad piva chmelených za studena vykazovalo pivo značky Primátor IPA a nejnižší pivo značky Bakalář (nealko). Jeho koncentrace se pohybovala pod mezí stanovitelnosti. Důvodem tak nízké koncentrace v tomto pivu mohlo být, že se k výrobě použilo menší množství chmele, než u ostatních studeně chmelených piva. Naměřené hodnoty prokázaly, že piva chmelená za studena obsahovala více linaloolu než piva od stejného výrobce chmelená klasickým způsobem. Výjimkou bylo pivo značky Bakalář (chmelené za studena). Toto pivo mělo nižší obsah linaloolu než pivo téže značky chmelených klasickým způsobem. Důvodem mohlo opět být množství použitého chmele při výrobě.

Touto prací se prokázalo, že metoda vícenásobné headspace mikroextrakce tuhou fází v kombinaci s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí ke stanovení linaloolu ve vzorcích piva může být využívána. Prokázalo se, že lze sledovat rozdíl v koncentraci linaloolu u piva chmelených klasickým způsobem a chmelených za studena.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [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] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC a kol. *Potravinářské zbožíznalství: Technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2014. ISBN 978-80-7418-208-2.
- [3] CHLÁDEK, Ladislav. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [4] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH, Michal VOLDŘICH a kol. *Přehled tradičních potravinářských výrob: Technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [5] Naše pivo. In: *Gambrinus* [online]. 2020. [cit. 2021-4-6]. Dostupné z: <https://www.gambrinus.cz/nase-pivo>
- [6] Vyhláška č. 248/2018 Sb.: Vyhláška o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: *Zákony pro lidi* [online]. 2018. [cit. 2021-4-6]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248#cast4>
- [7] *České pivo: Klenot České republiky*. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2014. ISBN 978-80-7434-168-7.
- [8] VESELÝ, Martin. *Orosené dějiny*. Ustí nad Labem, 2019. ISBN 978-80-7561-168-0.
- [9] HORNSEY, Ian Spencer. *A History of Beer and Brewing*. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 2003. ISBN 0-85404-630-5.
- [10] *Břenovský klášterní pivovar sv. Vojtěcha: Historie pivovaru* [online]. [cit. 2021-4-6]. 2011. Dostupné z: <http://www.brevnovskypivovar.cz/index.php/2013-11-09-20-20-10/demo-layouts/historie-pivovaru>
- [11] Kynšperský pivovar: Suroviny na výrobu. In: *Kynšperský pivovar* [online]. [cit. 2021-4-6]. Kynšperk nad Ohří. 2021. Dostupné z: <http://www.pivovar-kynšperk.cz/index.php/cz/hlavni-stranka>
- [12] Budějovický Budvar: Jak vaříme pivo. In: *Budějovický Budvar* [online]. [cit. 2021-4-6]. České Budějovice. 2019. Dostupné z: <https://www.budejovickybudvar.cz/pivovar/jak-varime-pivo>

- [13] BASAŘOVÁ, Gabriela a kol. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [14] OLŠOVSKÁ, Jana, Pavel ČEJKA, Karel ŠTĚRBA, Martin SLABÝ a František FRANTÍK. *Senzorická analýza piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2017. ISBN 978-80-86576-74-9.
- [15] FREEMAN, Gary, Bruno de MEO, Ombretta MARCONI, Chris BOOER, Giuseppe PEREETTI a Paolo FANTOZZI. Behaviour of Malted Cereals and Pseudo-Cereals for Gluten-Free Beer Production. *Journal of the Institute of Brewing*. **117**: 541–546, (2012).
- [16] EDWARDS, Sarah Elizabeth., Inês da Costa ROCHA, Elizabeth M. WILLIAMSON a Michael HEINRICH. Hops - Humulus lupulus L. *Phytopharmacy: An Evidence-Based Guide to Herbal Medicinal Products*. United Kingdom: John Wiley & Sons, 2015. ISBN: 978-1-118-54343-6.
- [17] ATTOKARAN, Mathew. Hops - Humulus lupulus L (Urticaceae). In: *Natural Food Flavors and Colorants*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2017. ISBN: 978-1-119-11476-5.
- [18] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH, Michal VOLDŘICH a kol. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: Technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [19] KOVAŘÍK, Michal (Ed.). Český chmel. *Český chmel: Czech hops = Der tschechische Hopfen*. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky ve spolupráci se Svazem pěstitelů chmele České republiky, 2015. ISBN 978-80-7434-246-2.
- [20] ŠIMÍČKOVÁ, Adéla. *Posouzení vlivu filtrace a pasterizace na obsah vybraných vitaminů v pivu – Diplomová práce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2018.
- [21] STEWART, Graham G. a Fergus G. PRIEST. Handbook of Brewing (2nd ed.). *Handbook of Brewing*. Boca Raton: CRC Press, 2006. ISBN 0-8247-2657-X.
- [22] KADLEC, Pavel a kol. *Technologie potravin II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-510-2.
- [23] BARTH, Roger. *The Chemistry of Beer: The Science in the Suds: Water*. New York: John Wiley & Sons, 2013. ISBN: 978-1-118-67497-0

- [24] OBERHAUS, Daniel. *Chinesische Forscher haben mit Gentechnik ein neues Lebewesen erschaffen* [online]. [cit. 2021-4-6]. 2018. Dostupné z: <https://www.vice.com/de/article/a3qy7k/crispr-hefepilz-neue-spezies-mit-nur-einem-chromosom-china>
- [25] LEWIS, Michael J. a Tom W. YOUNG. *Brewing*. New York: Springer Science + Business Media, 2001. ISBN 978-0-306-47274-9.
- [26] RÜLL, Tomáš. *Využití mladinových koncentrátů a extraktů sladu v procesu výroby piva – Bakalářská práce*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2016.
- [27] KOK, Yee Jiun., Lijuan YE, Jeroen MULLER, Dave Siak-Wei OW a Xuezhi BI. Brewing with malted barley or raw barley: what makes the difference in the processes?. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **103**: 1059–1067 (2019).
- [28] BROOKES, P. A., D. A. LOVETT a I. C. MACWILLIAM. The steeping of barley. A review of the metabolic consequences of water uptake, and their practical implications. *Journal of The Institute of Brewing*. **82**: 14–26, (1976).
- [29] DE KEUKELEIRE, Denis. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química nova*. **23**: 108–112, (2000).
- [30] ADÁMKOVÁ, Pavla. *Využití obilovin pro výrobu nápojů – Bakalářská práce*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2019.
- [31] DRDÁK, M., J. STUDNICKÝ, E. MÓROVÁ a J. KAROVIČOVÁ. Spracovanie rastlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín. *Základy potravinárskych technológií*. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [32] CEJPEK, Karel. Vonné a chuťové složky sladů. *Chemické listy*. **108**: 426–435, (2014).
- [33] HORNSEY, Ian Spencer. *Brewing*. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 2013. ISBN 978-1-84973-602-2.
- [34] BAMFORTH, C. W. *Brewing: New technologies*. England: CRC Press, 2006. ISBN 978-1-84569-003-8.
- [35] BRIGGS, Dennis E., Chris A. BOULTON, Peter A. BROOKES a Roger STEVENS. *Brewing Science and Practice*. England: CRC Press, 2004. ISBN 978-1-85573-490-6.

- [36] Schéma procesu výroby piva. In: *České pivo: České zlato* [online]. [cit. 2021-4-6]. 2020. Dostupné z: <http://ceskepivo-ceskezlato.cz/data/piva/vareni-22.jpg>
- [37] Výroba mladiny. In: *Pivovarství* [online]. [cit. 2021-4-6]. Praha: VŠCHT. 2012. Dostupné z: <https://ub.vscht.cz/files/uzel/0015847/pivovarstvi.pdf?redirected>
- [38] WILLAERT Ronnie. The Beer Brewing Porcess: Wort Production and Beer Fermentation. In: *Handbook of Food, Products Manufacturing*. Brussel, John Wiley, 2006. ISBN 978-0-470-04964-8.
- [39] JELÍNEK, Lukáš, Jana MÜLLEROVÁ, Marcel KARABÍN a Pavel DOSTÁLEK DOSTÁLEK. The secret of dry hopped beers. *Kvasný průmysl*. **64**: 287–296, (2018).
- [40] WHITE, Chris a Jamil ZAINASHEFF. *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Boulder, 2010. ISBN 0-937-381-96-9.
- [41] KLIMOVITZ, Ray. *The Oxford Companion to Beer*. USA: Oxford University Press, 2011. ISBN 978-0-19-536713-3.
- [42] MEZEROVÁ, Michaela. *Pivo: Jak poznáme kvalitu?* Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú., 2017. ISBN 978-80-87719-56-5.
- [43] KLEINOVÁ, Jana. *Studium těkavých látek v pivovarských surovinách, v meziproduktech při výrobě piva a v pivu: Disertační práce*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014.
- [44] CASABIANCA, Herve a Jean-Bernard GRAFF. Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. *Journal of High Resolution Chromatography*. **21**: 107–112, (1998).
- [45] 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*. **29**: 193–219, (2014).
- [46] JUNQUERA, P. Linalool [online]. [cit. 2021-4-6]. 2018. Dostupné z: [https://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3673&Itemid=4070](https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=3673&Itemid=4070)
- [47] PRAET, Tatiana, Filip OPSTAELE, Barbara JASKULA-GOIRIS, Guido AERTS a Luc COOMAN. Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation. *Cerevisia*. **36**: 125–132 (2012).
- [48] HEUBERGER, Adam L., Corey D. BORECKLING, Matthew R. LEWIS, Lauren SALAZAR, Peter BOUCKAERT a Jessica E. PRENNI. Metabolomic profiling of

- beer reveals effect of temperature on non-volatile small molecules during short-term storage. *Food chemistry* **135**: 1284–1289, (2012).
- [49] ZHU, Liang, Zhong HU, Gerardo GAMEZ, Wai Siang LAW, Huanwen CHEN, ShuiPing YANG, Konstantin CHIGNIN, Roman BALABIN, Rui WANG, Tingting ZHANG a Renato ZENOBI. Simultaneous sampling of volatile and non-volatile analytes in beer for fast fingerprinting by extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **398**: 405–413, (2010).
- [50] PROCOPIO, Susanne, F. QIAN a T. BECKER. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology*. **233**: 721–729, (2011).
- [51] DONG, Jian-Jun, Qing-Liang LI, Hua YIN, Cheng ZHONG, Jung-Guang HAO, Pan-Fei YANG, Yu-Hong TIAN a Shi-Ru JIA. Predictive analysis of beer quality by correlating sensory evaluation with higher alcohol and ester production using multivariate statistics methods. *Food Chemistry*. **161**: 376–382, (2014).
- [52] BRANDÃO, Tiago, Nathalie E. MOREIRA, Sónia MEIRELES a Paula GUEDES DE PINHO. Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. *Talanta*. **117**: 523–531, (2013).
- [53] ZAPATA, Julián, Laura MATEO-VIVARACHO, Ricardo LOPEZ a Vicente FERREIRA. Automated and quantitative headspace in-tube extraction for the accurate determination of highly volatile compounds from wines and beers. *Journal of chromatography A*. **1230**: 1–7, (2012).
- [54] RODRIGUES, João E., Antonio S. BARROS, Beatriz CARVALHO a Tiago BRANDÃO. Evaluation of beer deterioration by gas chromatography-mass spectrometry/multivariate analysis: A rapid tool for assessing beer composition. In: *Journal of chromatography A*. **1218**: 990–996, (2011).
- [55] Spotřeba alkoholických nápojů na 1 obyvatele v České republice. In: *Český statistický úřad* [online]. [cit. 2021-4-6]. 2020. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/graf-spotreba-alkoholickyh-napoju-na-1-obyvatele-v-ceske-republicev>
- [56] PAWLISZYN, Janusz (Ed.). *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Waterloo, Elsevier, 2012. Chemistry 2011. ISBN 978-0-12-416017-0.



- [57] PAWLISZYN, Janusz a Catherine L. ARTHUR. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. In: *ACS Publications* [online]. United States: American Chemical Society, 1990. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac00218a019>
- [58] JALILI, Vahid, Abdullah BARKHORDARI a Alireza GHIASVAND. A comprehensive look at solid-phase microextraction technique. *Microchemical Journal*. **152**: 104–319, (2020).
- [59] POOLE, Colin F., Salvatore FANALI, Paul R. HADDAD a Marja-Liisa RIEKKOLA. *Liquid Chromatography - Applications*. Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-12-805392-8.
- [60] ANDERSON, Jared L., Alain BERTHOD, Verónica PINO a Apryll M. STALCUP. Solid-Phase Microextraction. In: *Analytical Separation Science*. John Wiley, 2015. ISBN: 978-3-527-33374-5.
- [61] SERESHTI, Hassan, Osman DUMAN, Sibel TUNÇ, Nina NOURI a Parisa KHORRAM. Nanosorbent-based solid phase microextraction techniques for the monitoring of emerging organic contaminants in water and wastewater samples. *Microchimica Acta*. **187**: 541, (2020).
- [62] FUSEK, Martin. Nový vstříkový ventil kombinující Solid Phase Microextraction (SPME) s HPLC: *Chemické listy*. **67**: 2530, (2008).
- [63] PROSEN, Helena a Lucija ZUPANČIČ-KRALJ. Solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **18**: 272–282, (1999).
- [64] MEYERS, Robert A. Applications, Theory and Instrumentation: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. San Diego, John Wiley & Sons, 2000. ISBN 978-0470973332.
- [65] Mikroextrakce tuhou fází. In: *Web VŠCHT* [online]. [cit. 2021-4-6]. Praha: Vydavatelství VŠCHT. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-2%20SPME\\_SBSE\\_MEPS-JP2018.pdf](https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-2%20SPME_SBSE_MEPS-JP2018.pdf)
- [66] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy*. **96**: 827–852, (2002).
- [67] ALBERTSSON, Ann-Christine a Minna HAKKARAINEN. *Chromatography for Sustainable Polymeric Materials*. Springer, 2008. ISBN 978-3-540-78762-4.

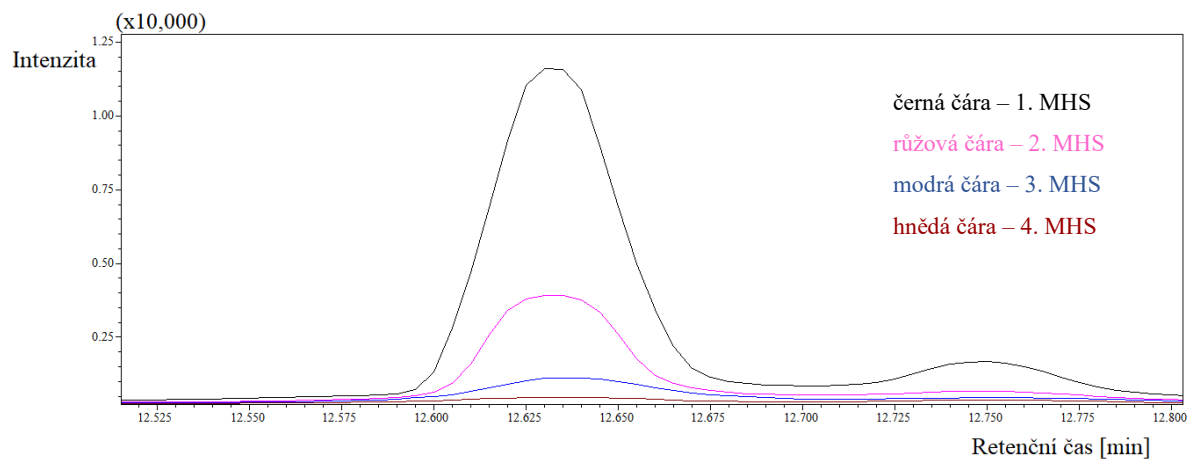
- [68] HAKKARAINEN, Minna. Developments in multiple headspace extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **70**: 229–230, (2007).
- [69] EZQUERRO, Óscar, Begoña PONS a María Teresa TENA. Multiple headspace solid-phase microextraction for the quantitative determination of volatile organic compounds in multilayer packagings. *Journal of Chromatography A*. **999**: 155–164, (2003).
- [70] TURNER, Diane. Gas Chromatography – How a Gas Chromatography Machine Works, How To Read a Chromatograph and GCxGC. In: *Analysis & Separations from Technology Networks* [online]. [cit. 2021-4-6]. Anthias Consulting, 2020. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxc-335168>
- [71] THET, Kyaw a Nancy WOO. In: *Chemistry LibreTexts: Gas Chromatography* [online]. [cit. 2021-4-6]. 2020. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Gas\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)
- [72] ZACHAŘ, Pavel a David SÝKORA. *Plynová chromatografie* [online]. [cit. 2021-4-6]. Vydavatelství VŠCHT. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/an/lach2/GC.pdf>
- [73] BARTOVSKÝ, Tomáš. *Provozní plynové chromatografy* [online] [cit. 2021-4-6]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2017. Dostupné z: [https://automa.cz/Aton/FileRepository/pdf\\_articles/10151.pdf](https://automa.cz/Aton/FileRepository/pdf_articles/10151.pdf)
- [74] BLOMBERG, L. Current aspects of the stationary phase in gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*. **5**: 520–533, (1982).
- [75] Gas Chromatography Columns. In: *Schimidzu excellence in Science* [online]. [cit. 2021-4-6]. Dostupné z: [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis\\_basics/fundamentals/columns.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis_basics/fundamentals/columns.html)
- [76] RAHMAN, Md. Musfiqur, A.M. Abd EL-ATY, Jeong-Heui CHOI, Ho-Chul SHIN, Sung Chul SHIN a Jae-Han SHIM. Basic Overview on Gas Chromatography Columns. *Analytical Separation Science*. **3**: 823–834, (2015).
- [77] Capillary Column Gas Chromatography. In: *Delloyd's chemistry resources, reagents and Instrumentation*. [online]. [cit. 2021-4-6]. Dostupné z: <http://delloyd.50megs.com/MOBILE/GC.html>

- [78] SMITH, Philip A., David KOCH, Gary L. HOOK, Richard P. ERICKSON, Carmela R. JACKSON LEPAGE, Haley D.M. WYATT, Geoffrey BETSINGER a Brian A. ECKENRODE. Detection of gas-phase chemical warfare agents using field-portable gas chromatography – mass spectrometry systems: instrument and sampling strategy considerations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **23**: 296–306 (2004).
- [79] HAGE, David S. Flame Ionization Detector. *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*. Elsevier, 2018. ISBN: 978-0-12-816063-3
- [80] Metody analýzy potravin. In: *Kvantitativní vyhodnocovací metody v plynové chromatografii* [online]. [cit. 2021-4-6]. Brno: Mendelova univerzita. Dostupné z: <https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/index.pl?cast=52966>
- [81] SGORBINI, Barbara, Carlo BICCHI, Cecilia CAGLIERO, Chiara CORDERO, Erica LIBERTO a Patrizia RUBIOLO. Herbs and spices: Characterization and quantitation of biologically-active markers for routine quality control by multiple headspace solid-phase microextraction combined with separative or non-separative analysis. *Journal of Chromatography A*. **1376**: 9–17, (2015).
- [82] RINCÓN, Arturo A., Verónica PINO, Juan H. AYALA a Ana M. AFONSO. Multiple headspace solid-phase microextraction for quantifying volatile free fatty acids in cheeses: *Talanta*. **129**: 183–190, (2014).
- [83] SERRANO, Elena, Joaquin BELTRÁN a Félix HERNÁNDEZ. Application of multiple headspace-solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry to quantitative analysis of tomato aroma components. *Journal of Chromatography A*. **1216**: 127–133, (2009).
- [84] LEI, Fen-Fen, Xue-Na ZHANG, Yuan-Li GAO, Ya-Hong HAN, Xiu-Juan LI a Si-Yi PAN. Multiple headspace solid-phase microextraction using a new fiber for avoiding matrix interferences in the quantitative determination of ethyl carbamate in pickles. *Journal of Separation Science*. **35**: 1152–1159, (2012).
- [85] PIZARRO, Millán C., Nuria PÉREZ-DEL-NOTARIO a José María GONZÁLEZ SÁIZ. Determination of Brett character responsible compounds in wines by using multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. **1143**: 176–181, (2006).

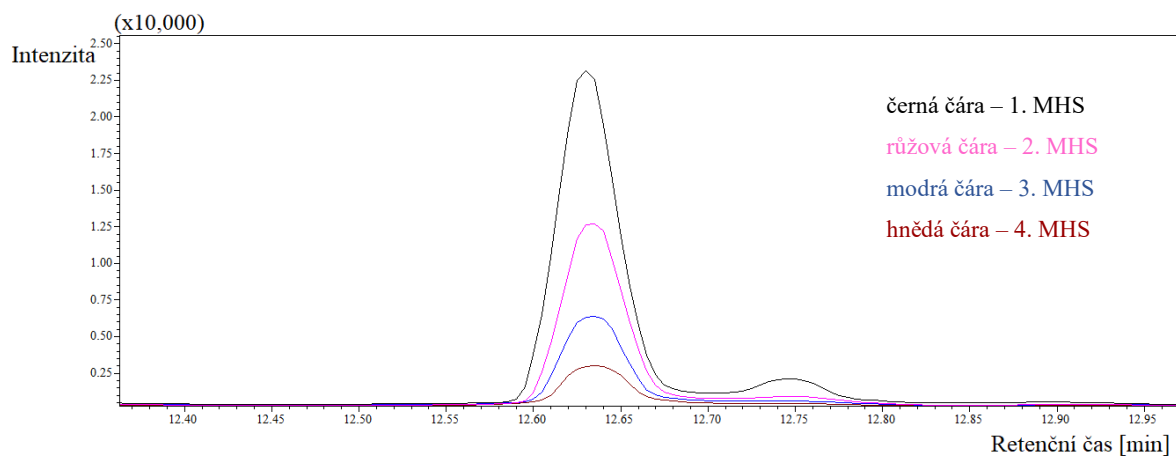
- [86] CASTRO-MEJÍAS, Remedios, Ramón NATERA-MARÍN, M. Valme GARCÍA-MORENO a Carmelo García BARROSO. Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. *Journal of Chromatography A*. **995**: 11–20, (2003).
- [87] JIROUTKOVÁ, Lucie. *Analýza profilu těkavých látek pivovarských sladů s využitím vakuem asistované mikroextrakce tuhou fází – Diplomová práce*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2020.

# PŘÍLOHY

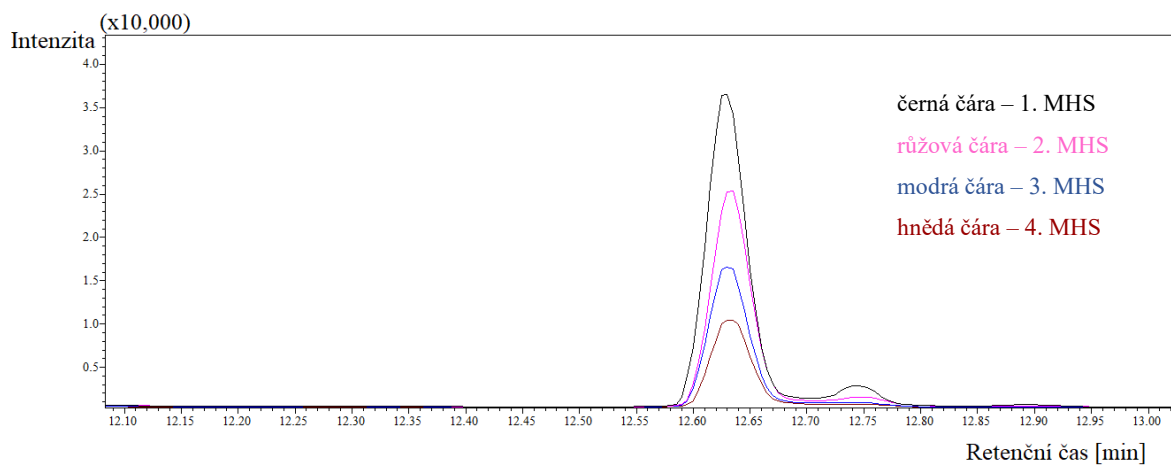
## Příloha I: Optimalizace metody MHS-SPME-GC-MS



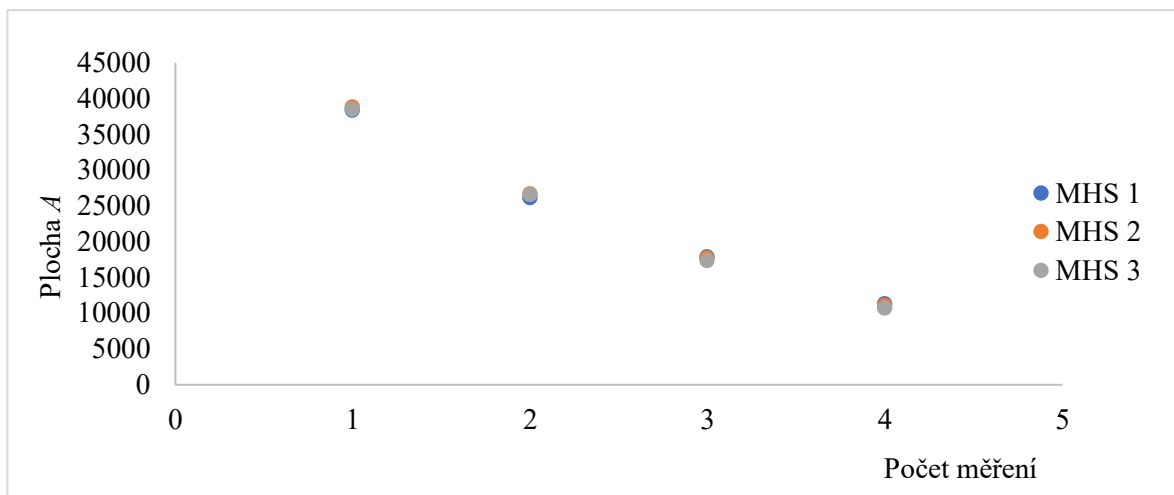
Obrázek I/1 Optimalizace – použitý objem 100 µl vzorku piva (Bakalář)



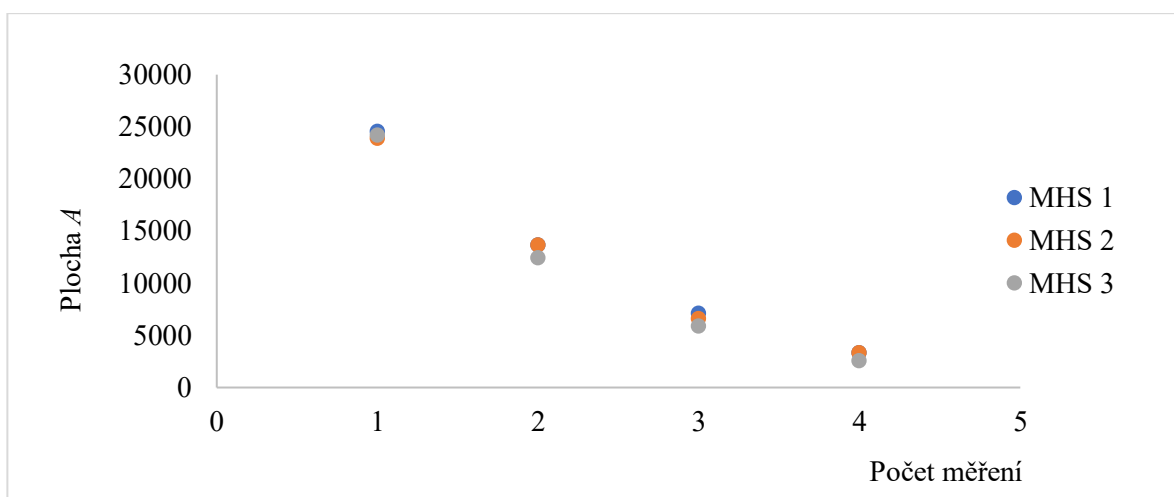
Obrázek I/2 Optimalizace – použitý objem 250 µl vzorku piva (Bakalář)



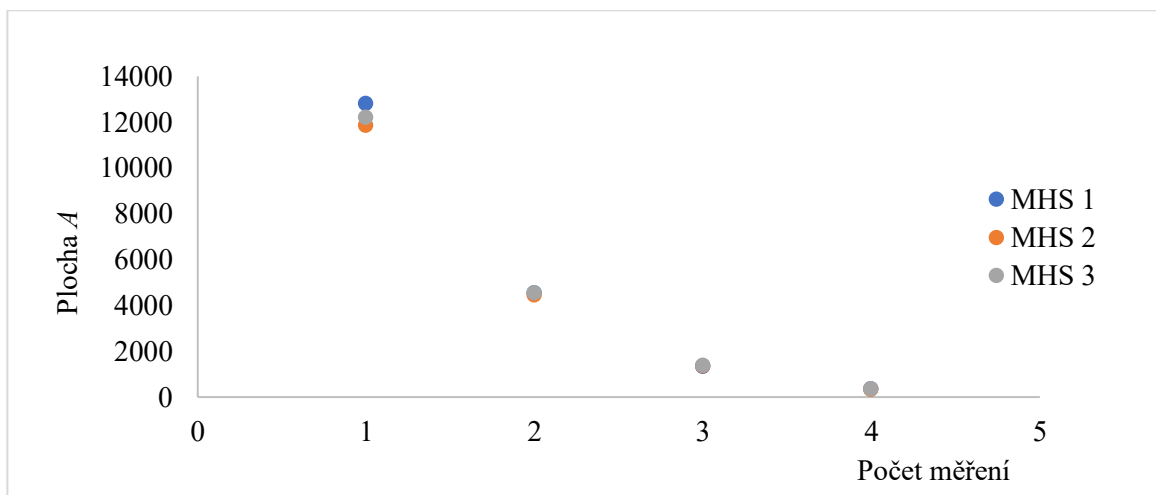
Obrázek I/3 Optimalizace – použitý objem 500 µl vzorku piva (Bakalář)



Obrázek I/4 Opakovatelnost – objem 100 µl vzorku piva (Bakalář)

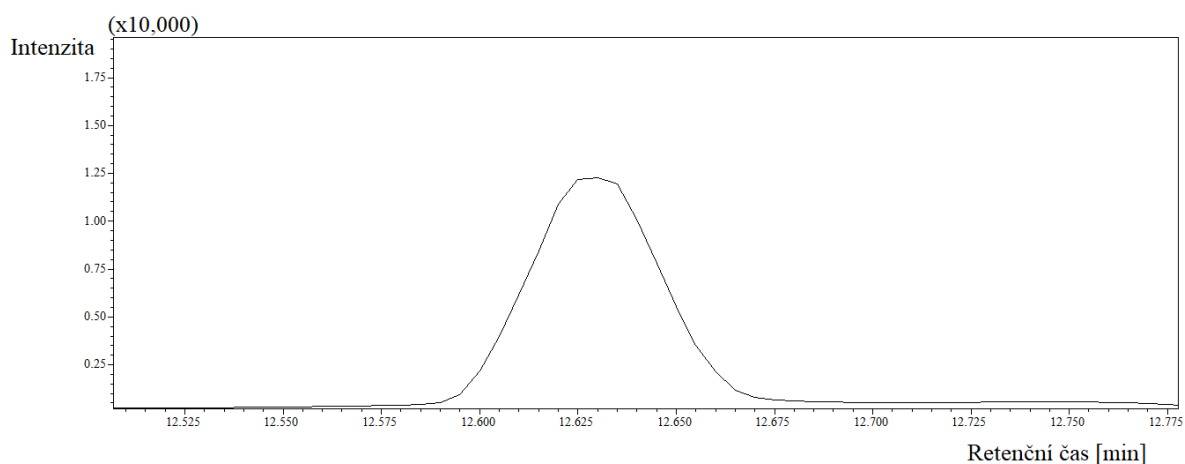


Obrázek I/5 Opakovatelnost – objem 250 µl vzorku piva (Bakalář)

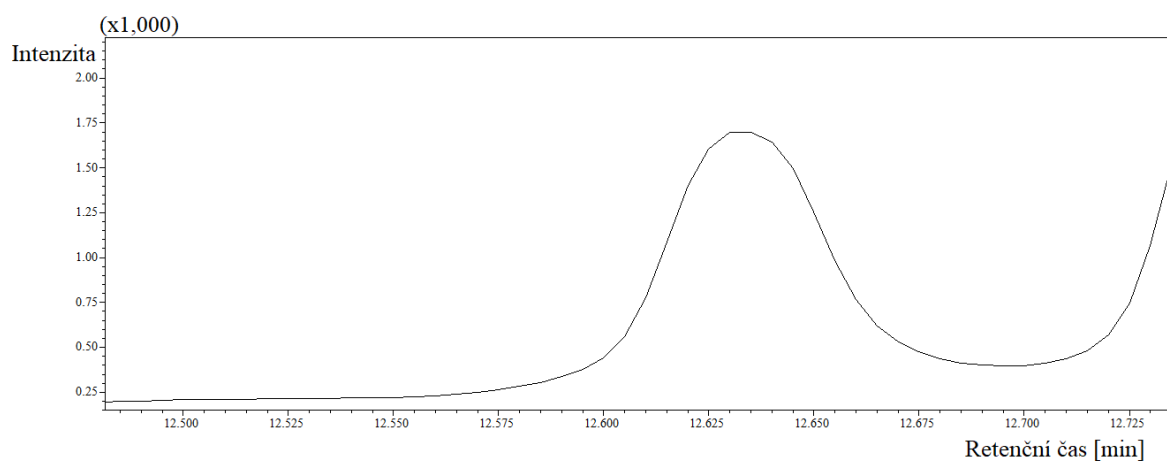


Obrázek I/6 Opakovatelnost – objem 500 µl vzorku piva (Bakalář)

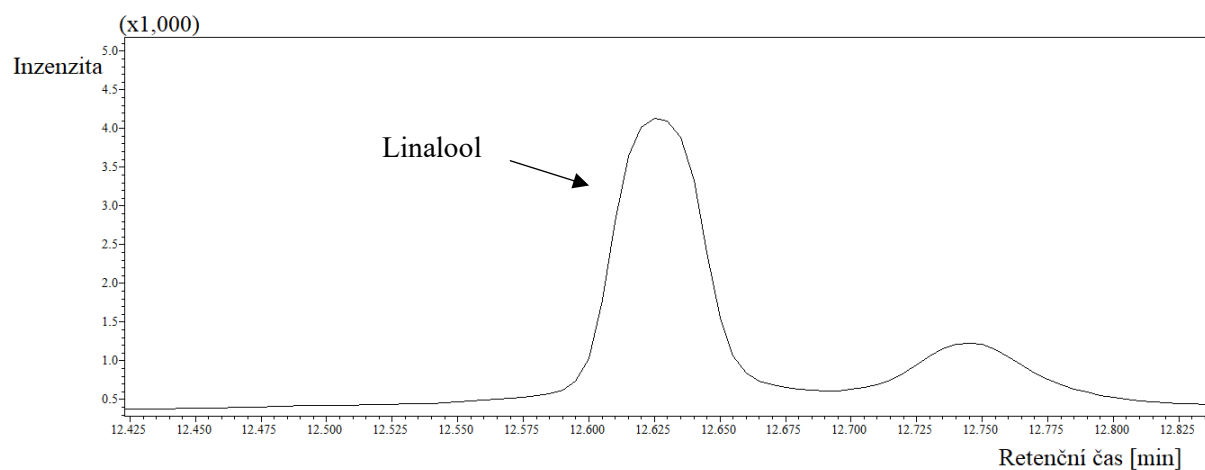
## Příloha II: Chromatogramy z měření reálných vzorků piv pomocí MHS-SPME-GC-MS



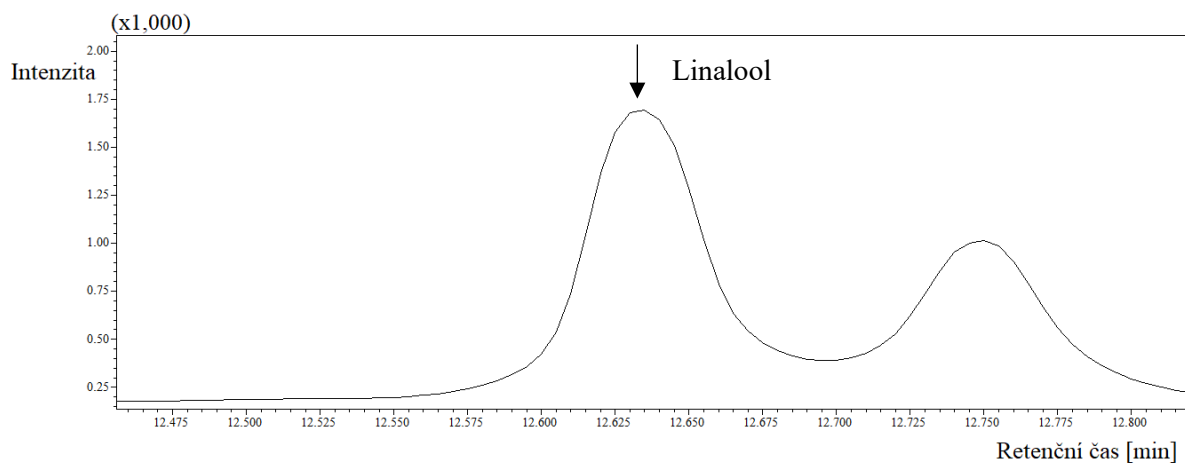
Obrázek II/1 Chromatogram pro pivo Bakalář (chmelené klasickým způsobem)



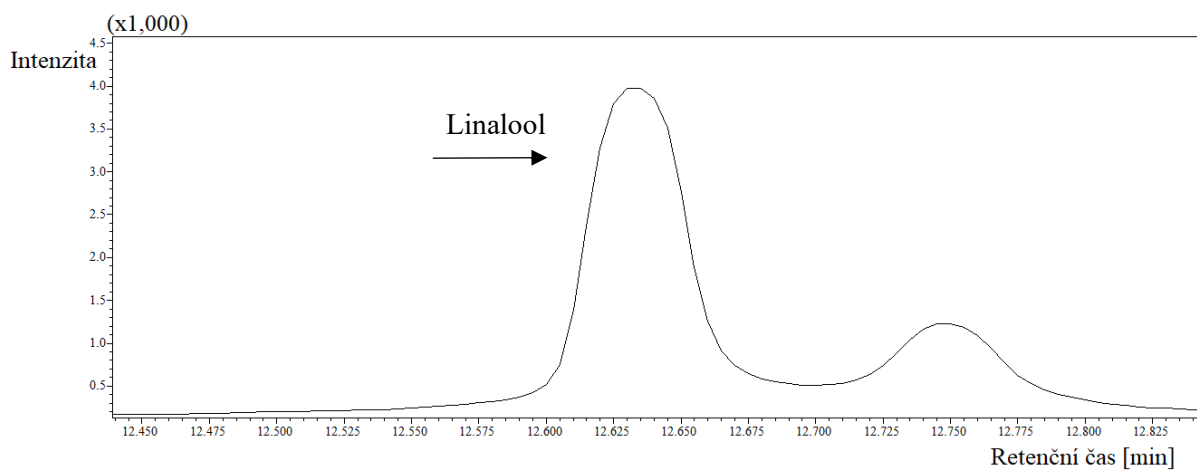
Obrázek II/2 Chromatogram pro pivo Bakalář Nealko (chmelené za studena)



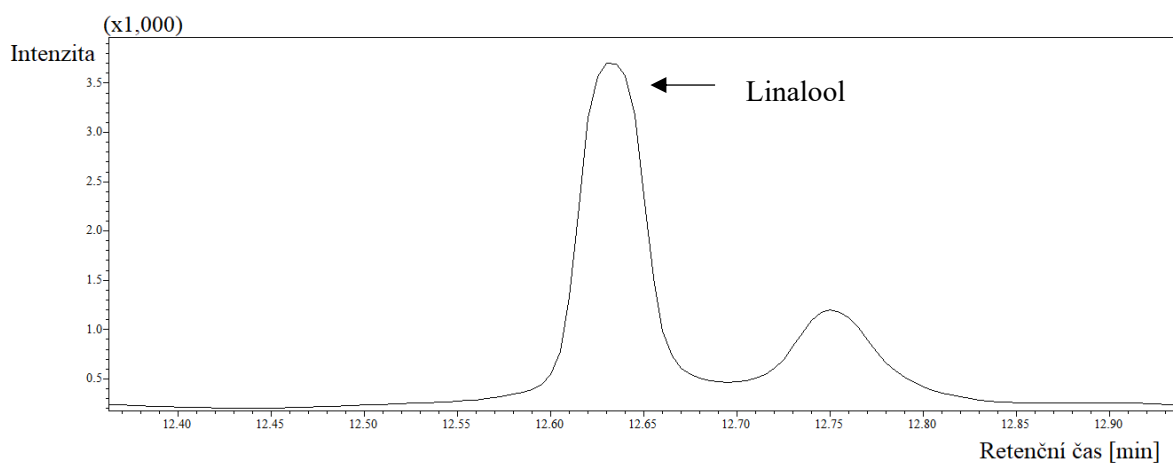
Obrázek II/3 Chromatogram pro pivo Bakalář (chmelené za studena)



Obrázek II/4 Chromatogram pro pivo Birell (chmelené klasickým způsobem)

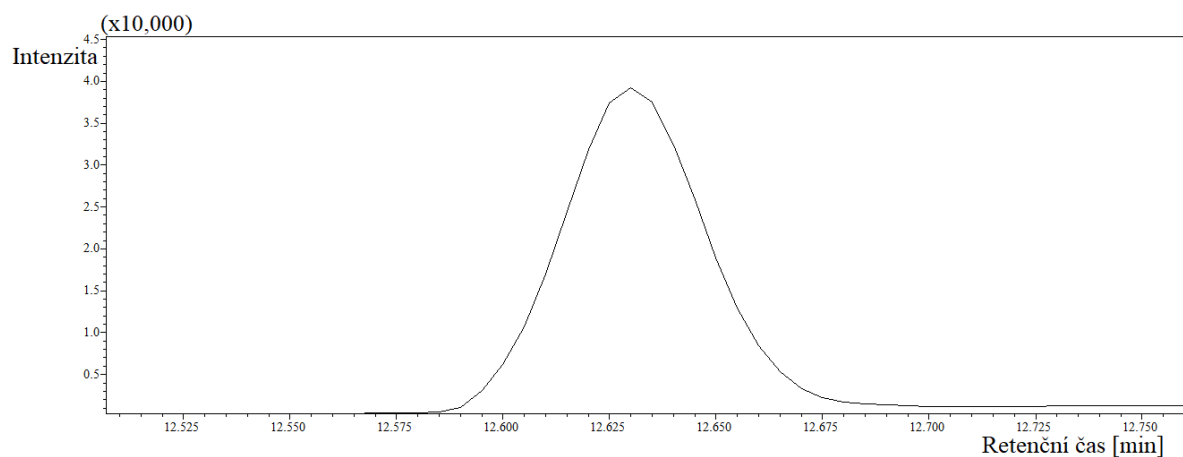


Obrázek II/5 Chromatogram pro pivo Birell (chmelené za studena)

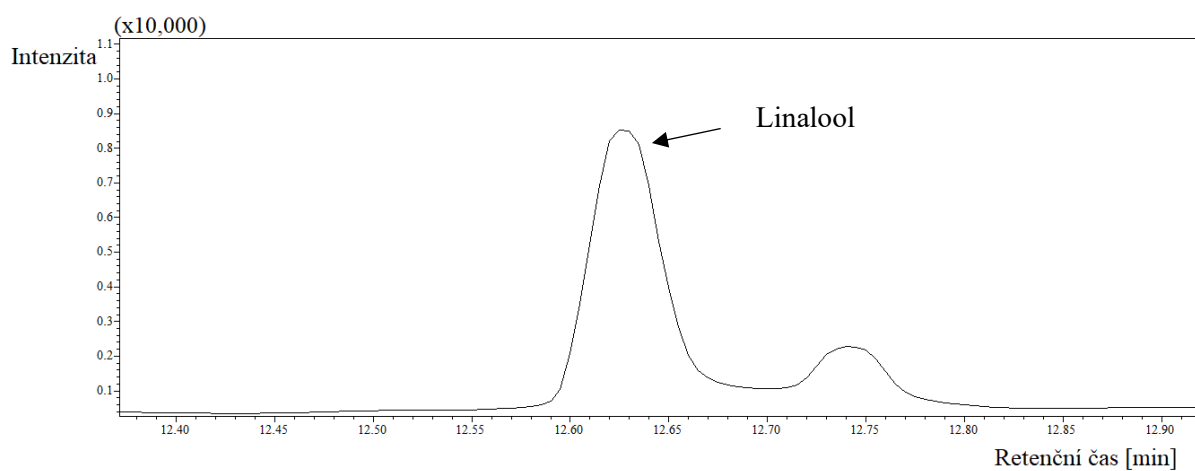


Obrázek II/6 Chromatogram pro pivo Lobkowicz (chmelené klasickým způsobem)

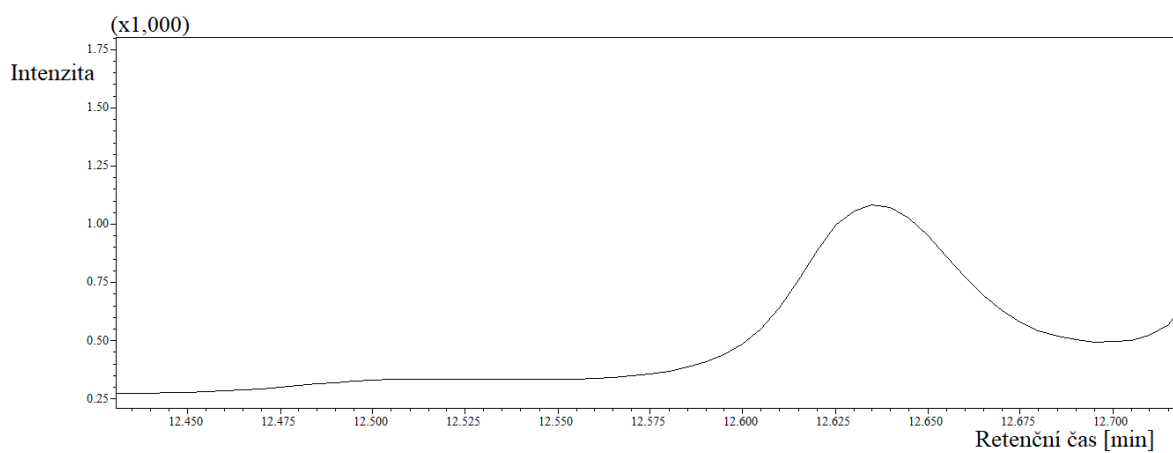




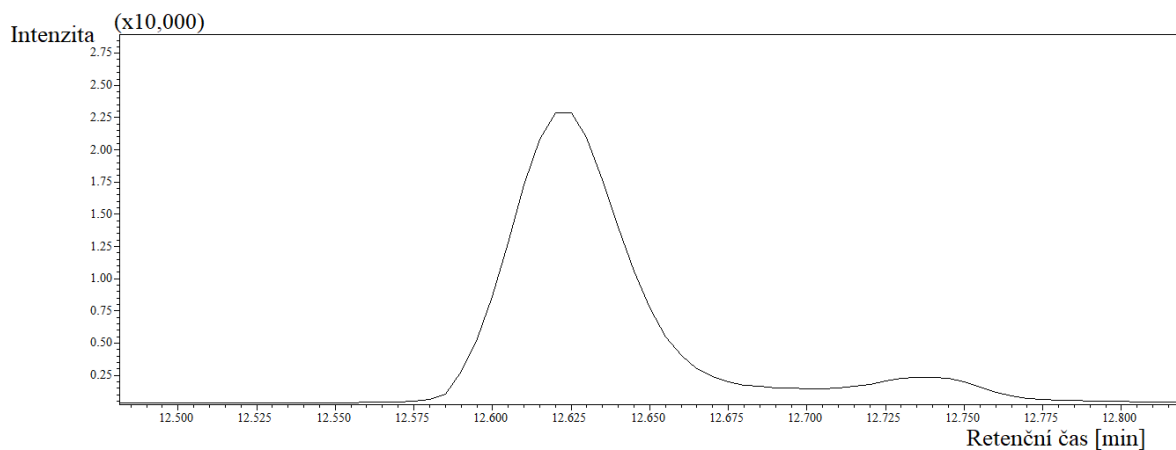
Obrázek II/7 Chromatogram pro pivo Lobkowicz ALE (chmelené za studena)



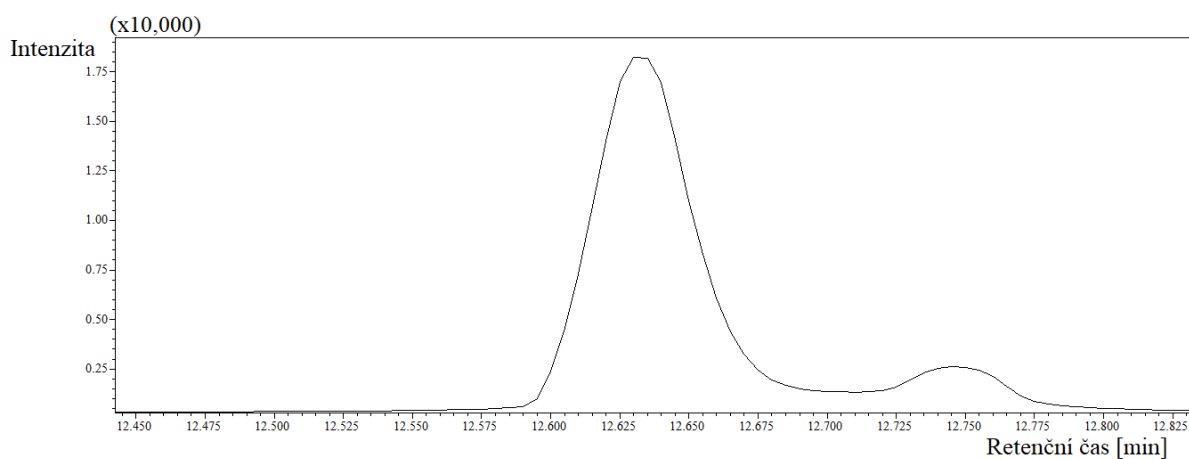
Obrázek II/8 Chromatogram pro pivo Muflon (chmelené za studena)



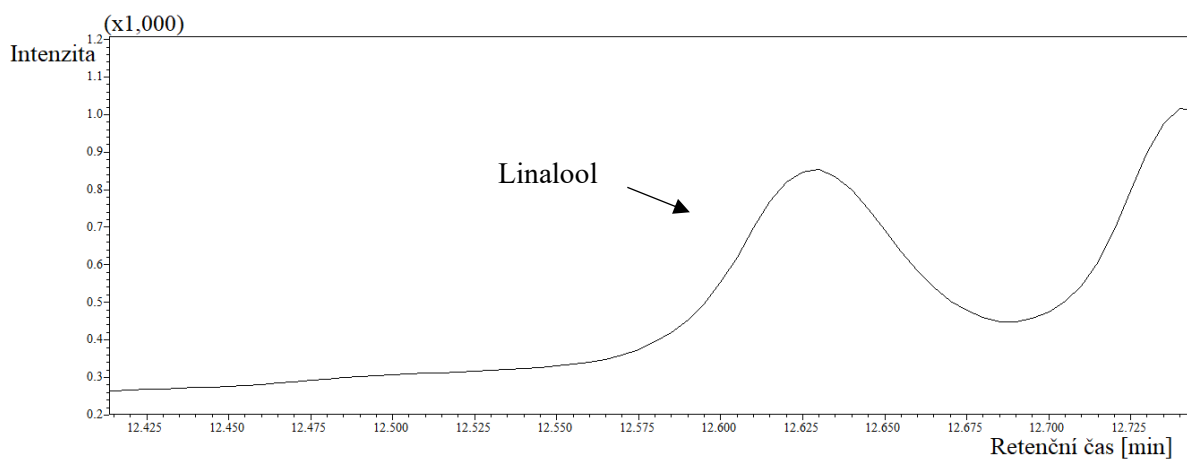
Obrázek II/9 Chromatogram pro pivo Primátor Exkluziv (chmelené klasickým způsobem)



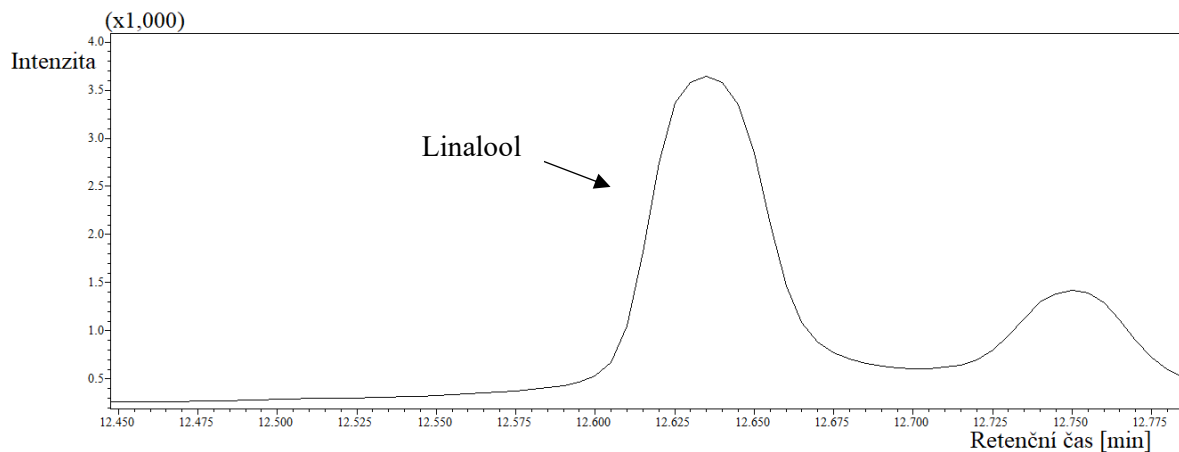
Obrázek II/10 Chromatogram pro pivo Primátor IPA (chmelené za studena)



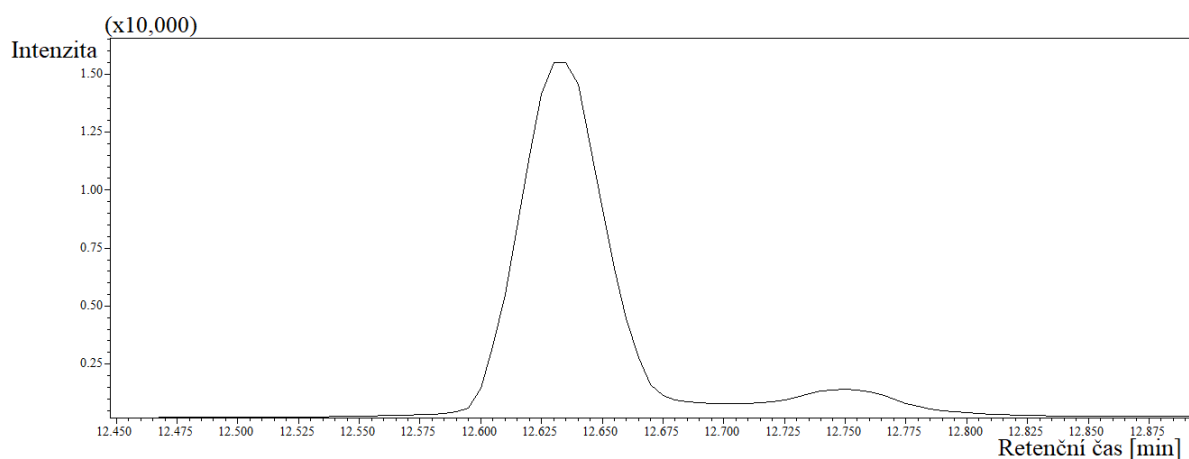
Obrázek II/11 Chromatogram pro pivo Primátor Tchyně (chmelené za studena i klasickým způsobem)



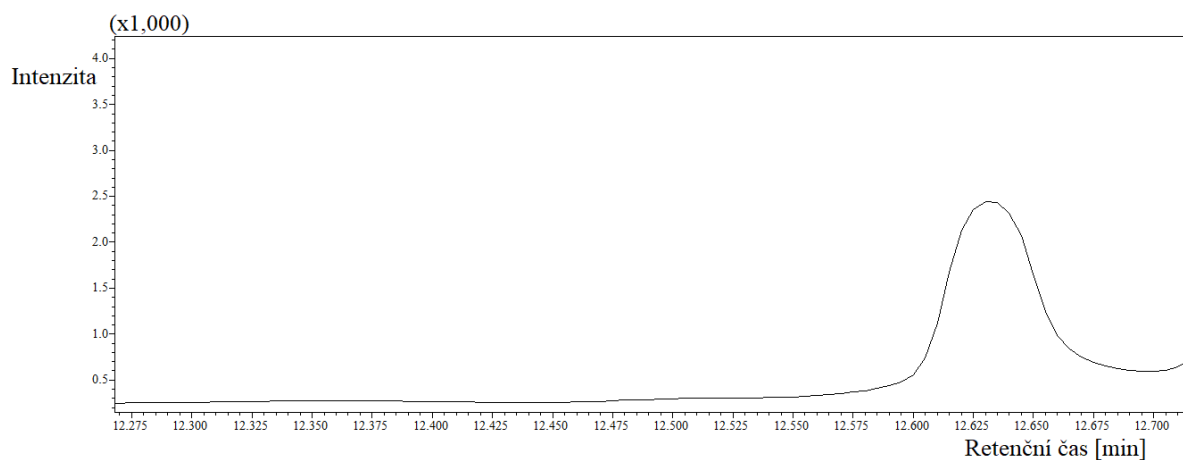
Obrázek II/12 Chromatogram pro pivo Radegast (chmelené klasickým způsobem)



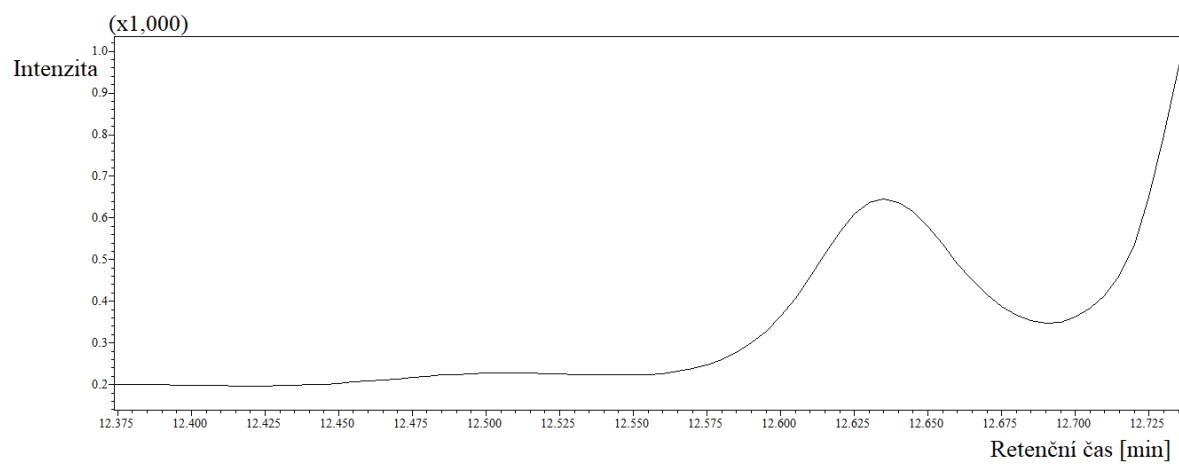
Obrázek II/13 Chromatogram pro pivo Radevast Ratar (chmelené za studena)



Obrázek II/14 Chromatogram pro pivo Sedmý schod (chmelené za studena)

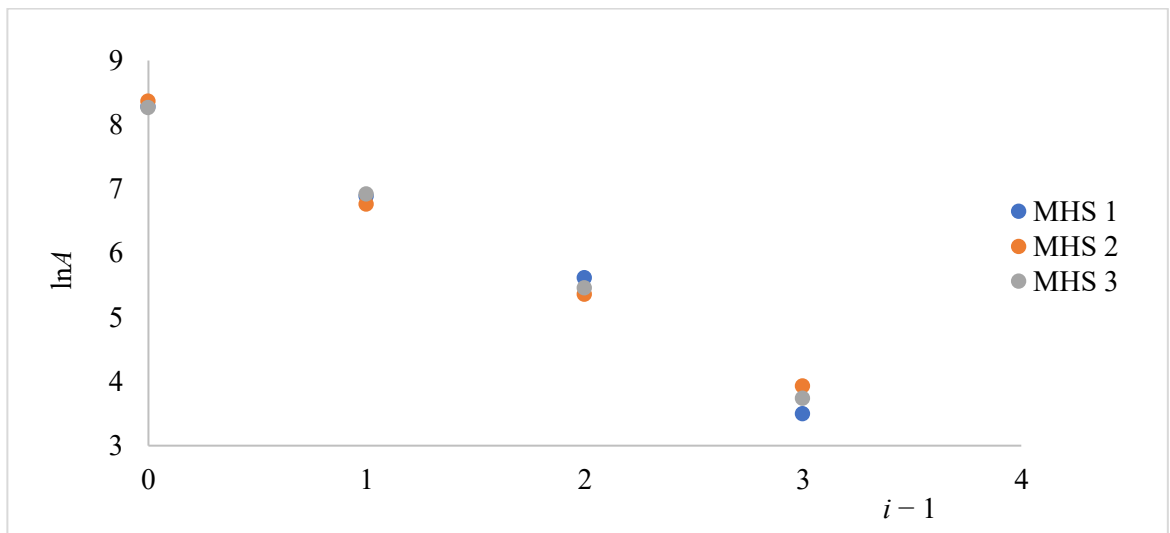


Obrázek II/15 Chromatogram pro pivo Svijanský rytíř (chmelené za studena)

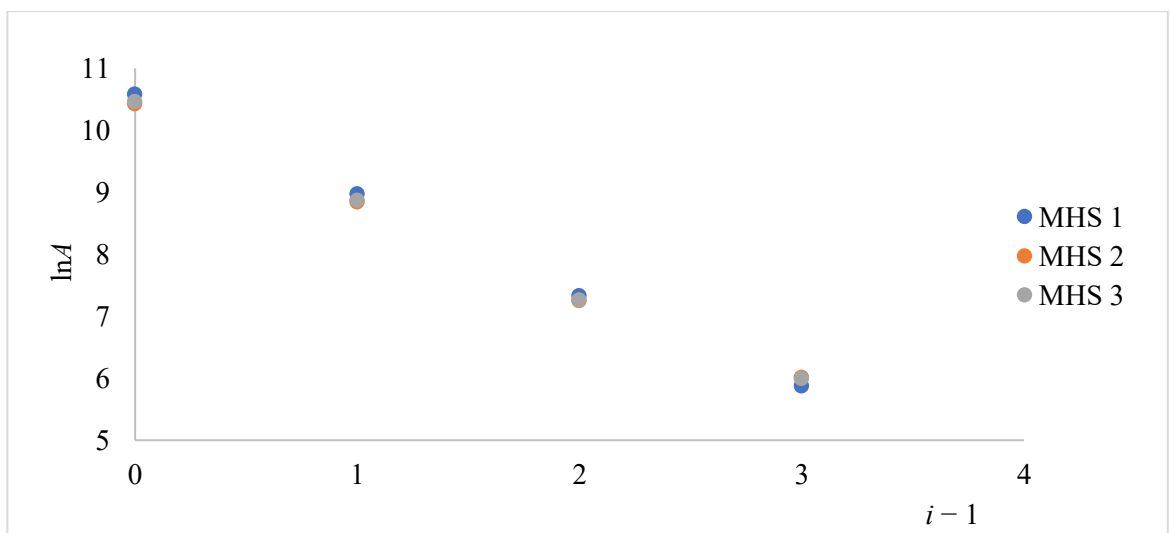


Obrázek II/16 Chromatogram pro pivo Svijany (chmelené klasickým způsobem)

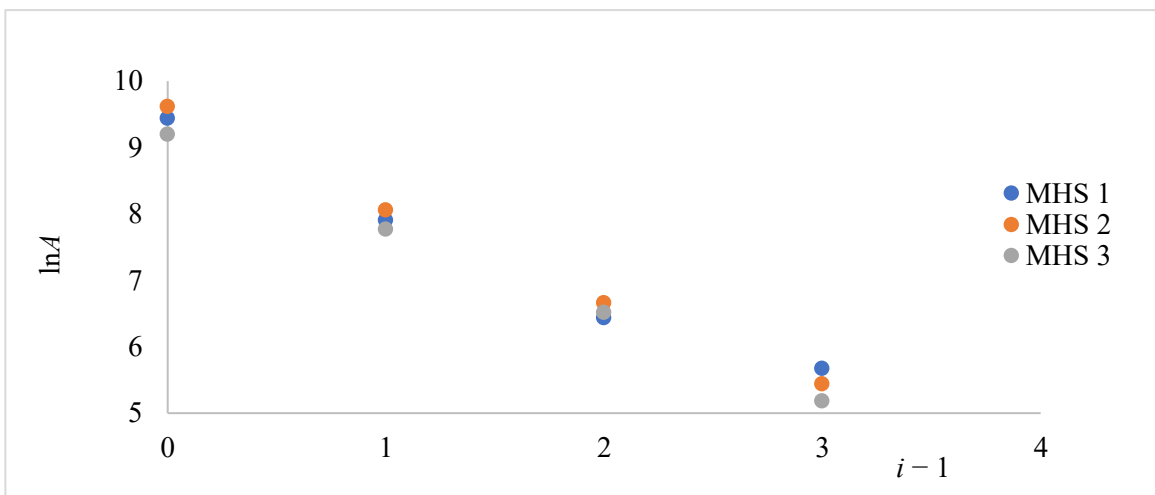
**Příloha III: Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro reálné vzorky piva**



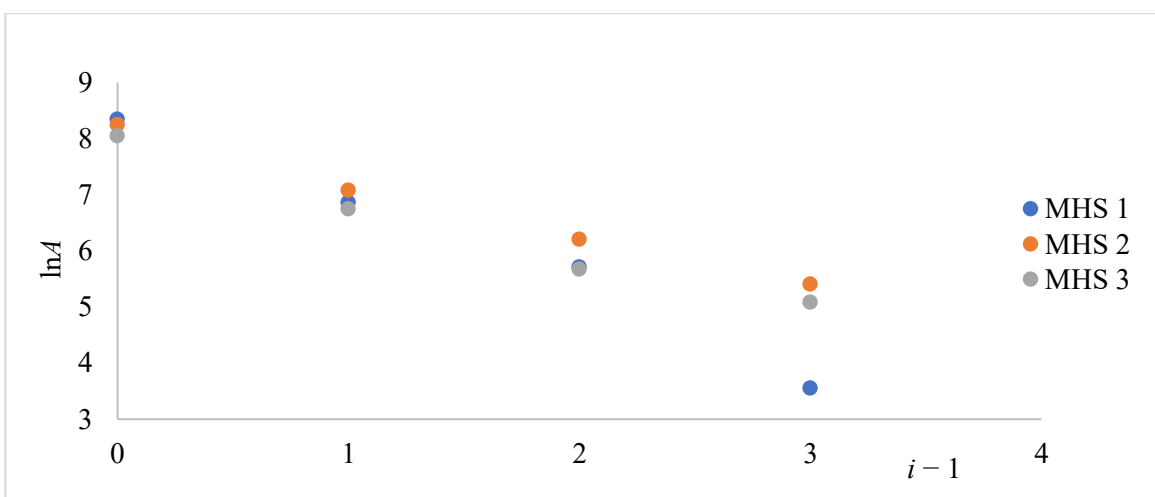
Obrázek III/1 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Lobkowicz (chmelené klasickým způsobem)



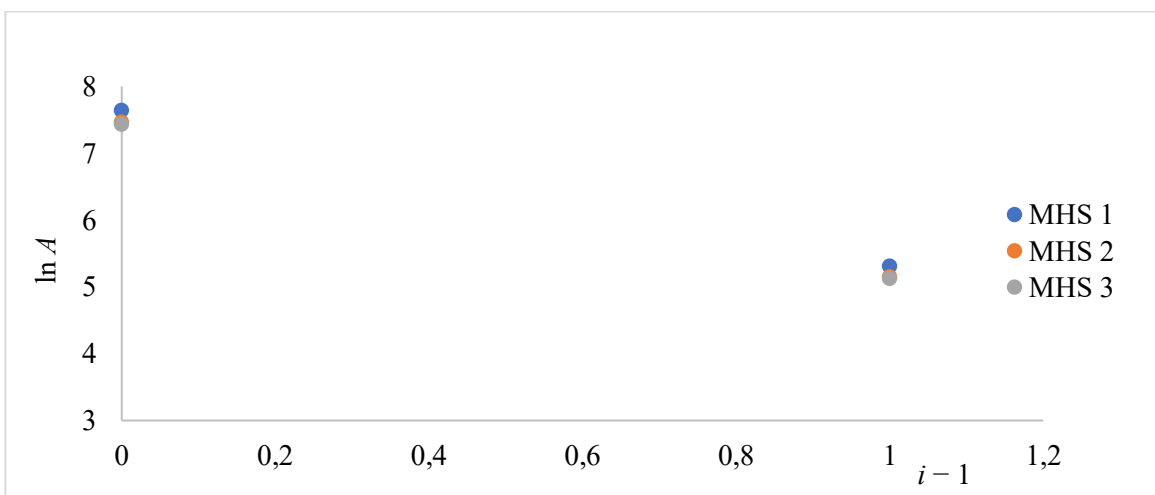
Obrázek III/2 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Lobkowicz ALE (chmelené za studena)



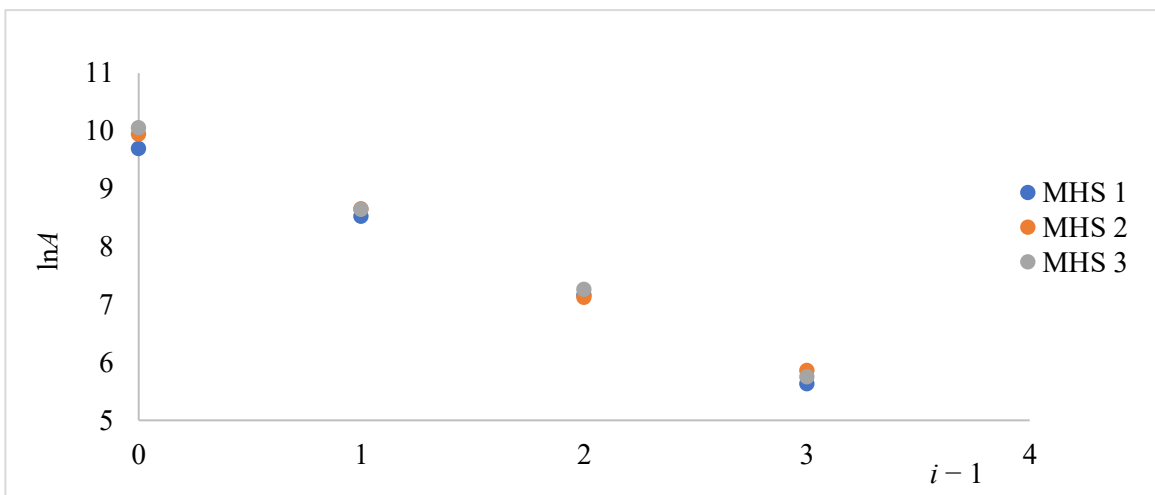
Obrázek III/3 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Bakalář (chmelené klasickým způsobem)



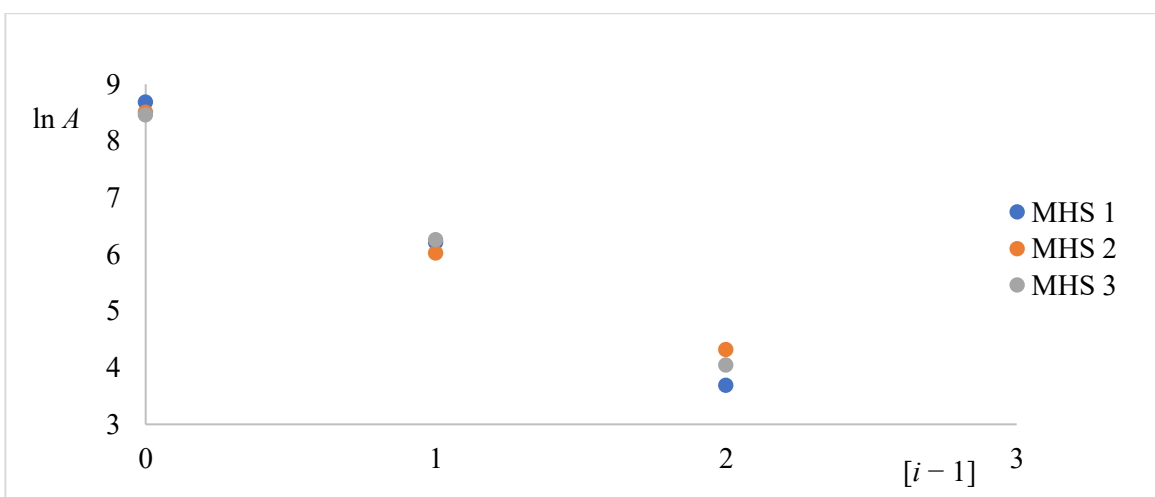
Obrázek III/4 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Bakalář (chmelené za studena)



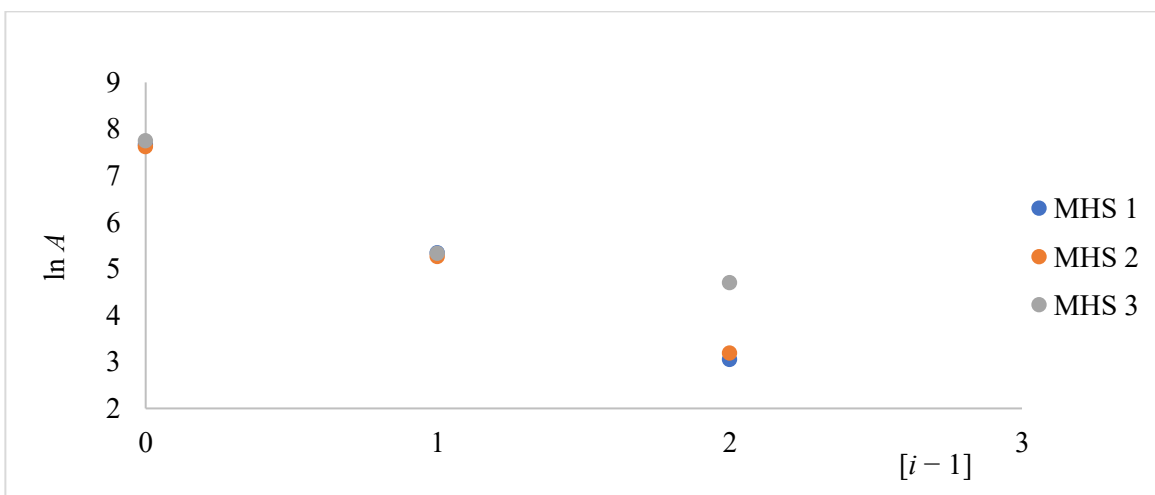
Obrázek III/5 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Bakalář Nealko (chmelené za studena)



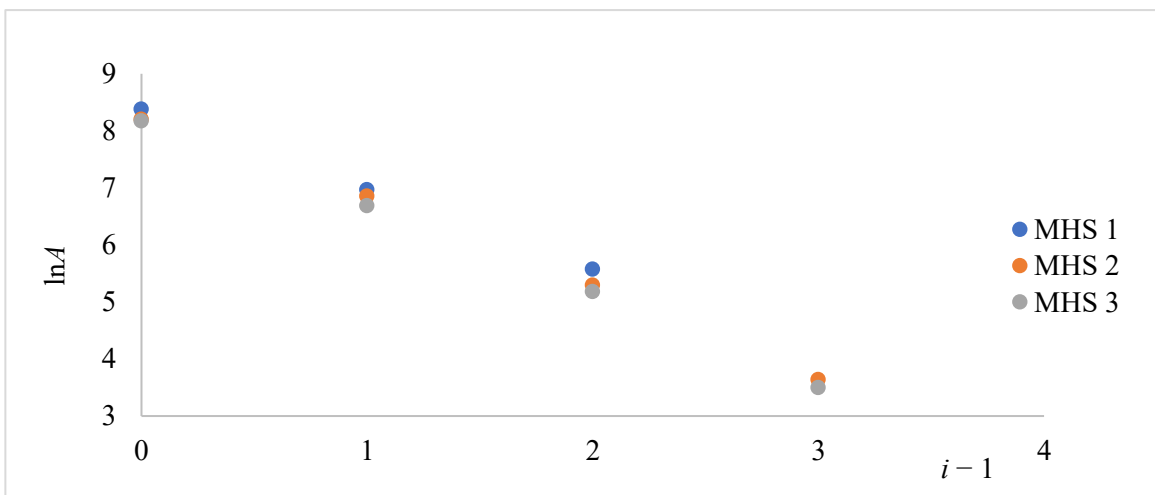
Obrázek III/6 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Sedmý schod (chmelené za studena)



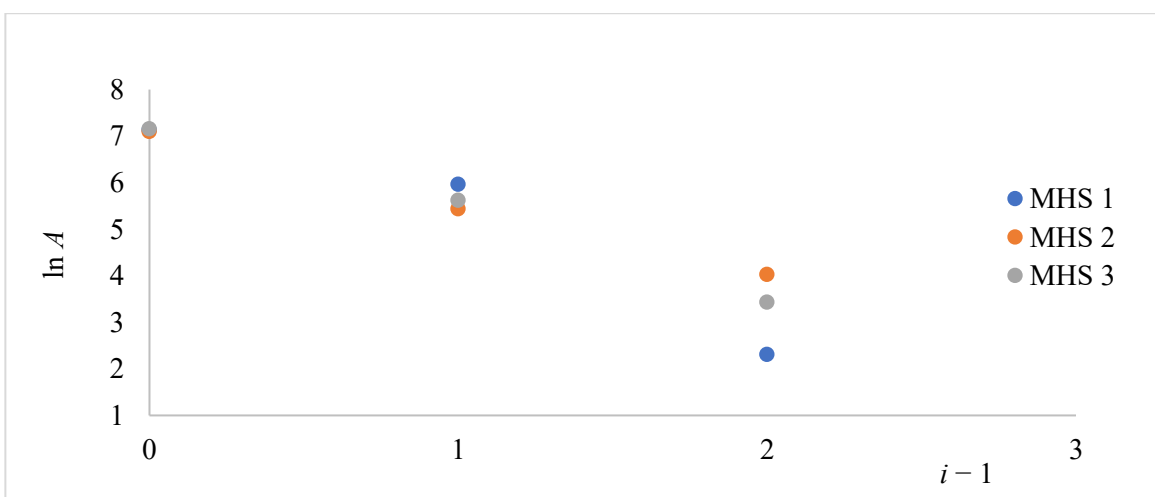
Obrázek III/7 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Birell (chmelené za studena)



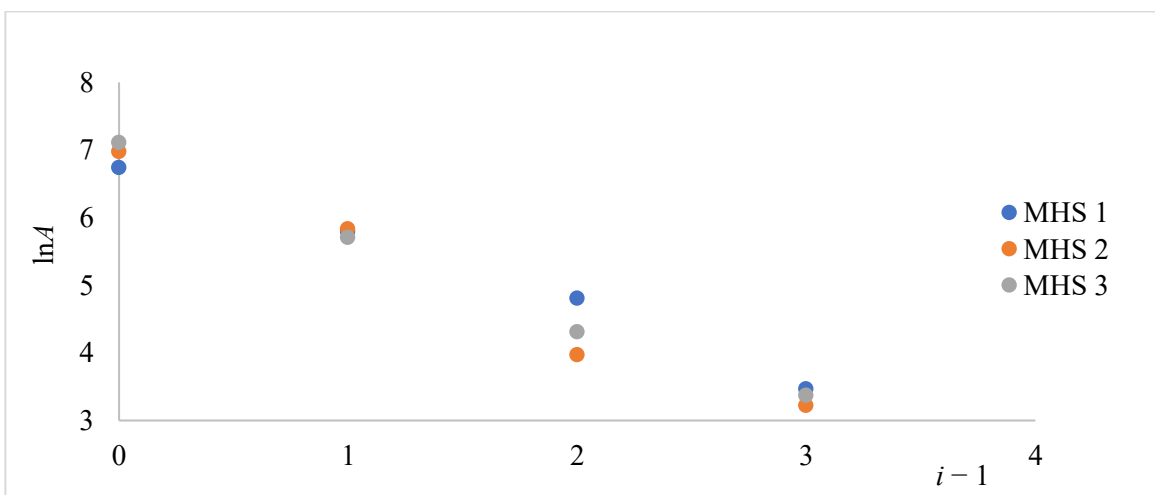
Obrázek III/8 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Birell (chmelené klasickým způsobem)



Obrázek III/9 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Radevast Ratar (chmelené za studena)

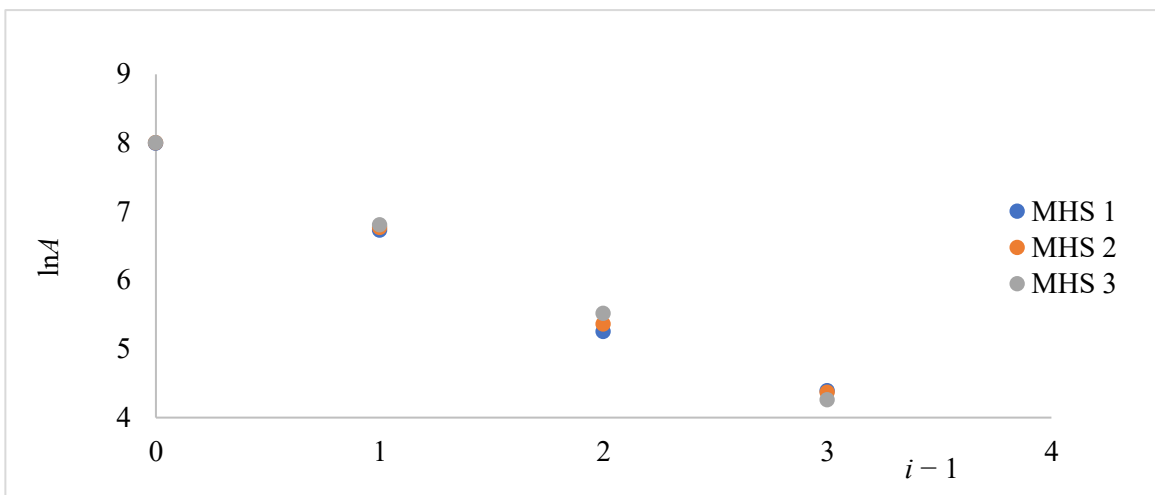


Obrázek III/10 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Radevast (chmelené klasickým způsobem)

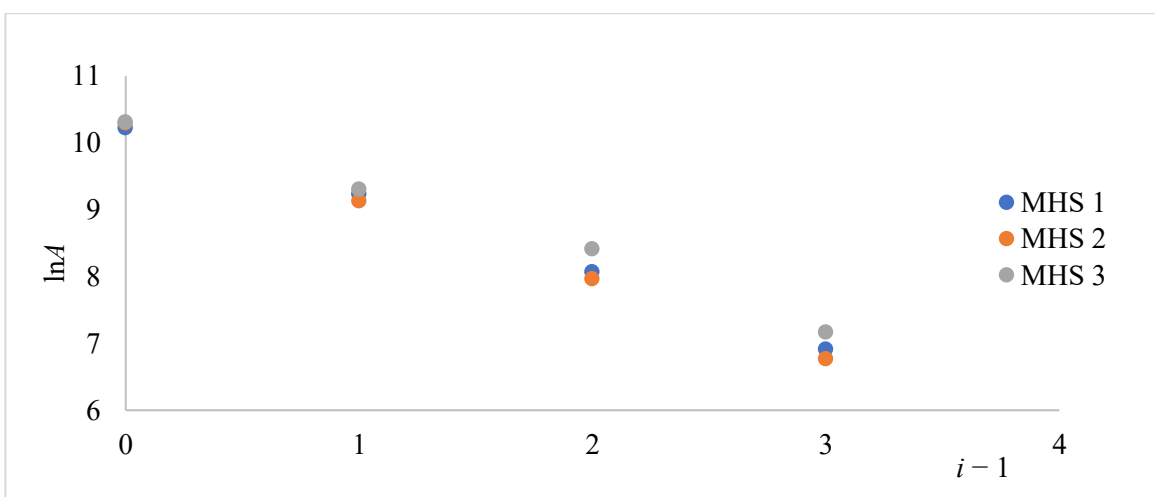


Obrázek III/11 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Svijany (chmelené klasickým způsobem)

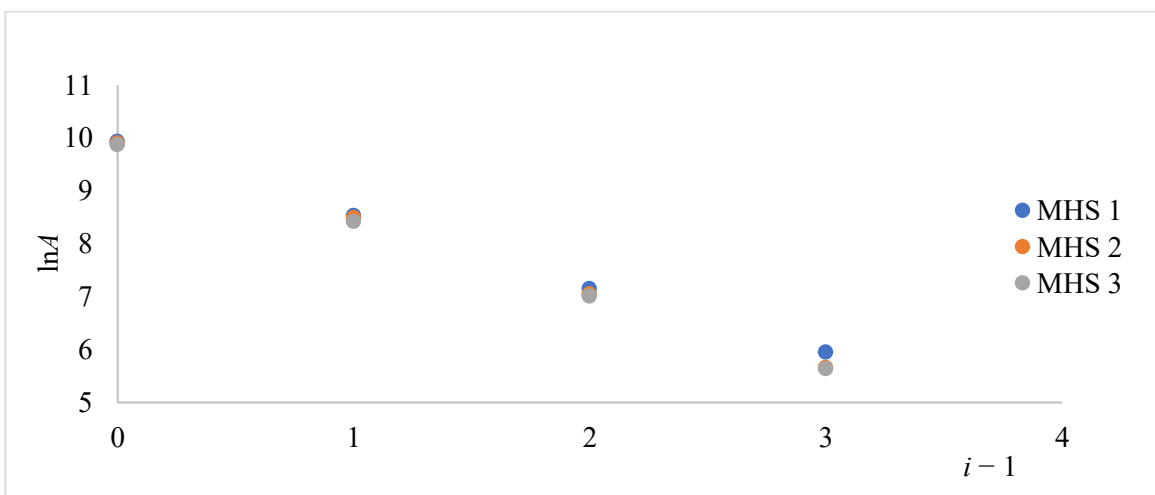




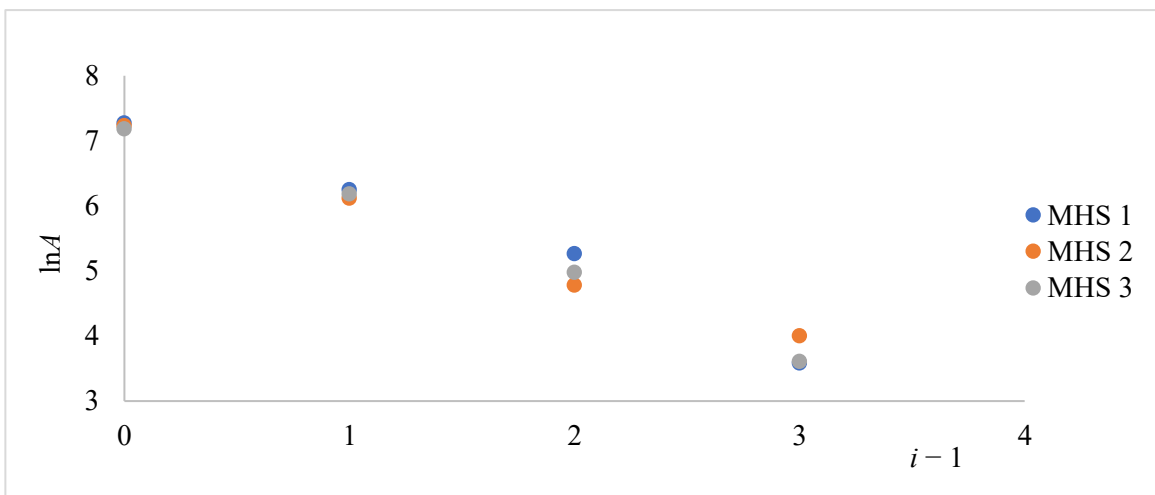
Obrázek III/12 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Svijanský rytíř (chmelené za studena)



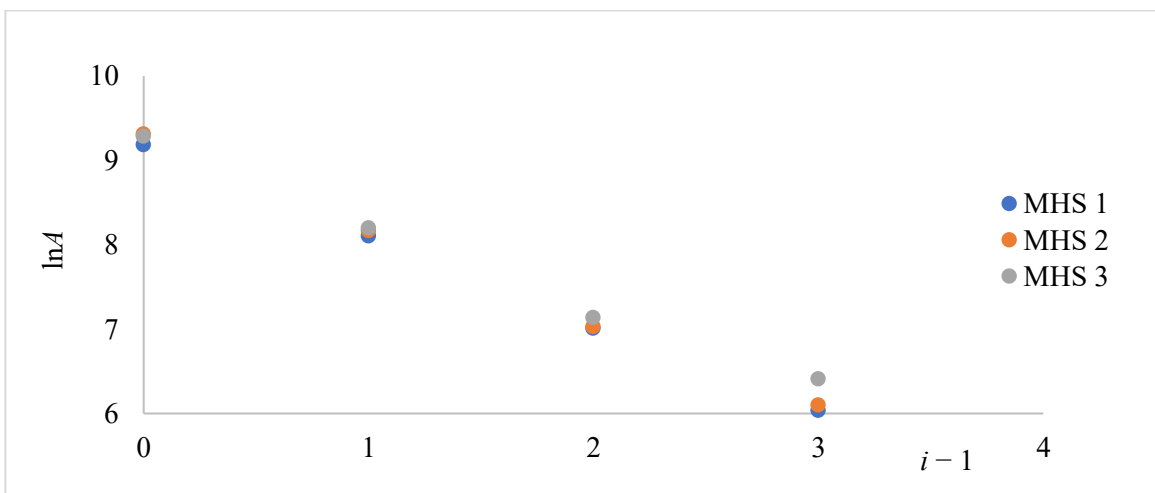
Obrázek III/13 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Primátor IPA (chmelené za studena)



Obrázek III/14 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Primátor tchyně (chmelené za studena)



Obrázek III/15 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Primátor Exkluziv (chmelené klasickým způsobem)



Obrázek III/16 Závislost  $\ln A$  na  $i - 1$  pro pivo Muflon (chmelené za studena)