

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití mikroextrakce tuhou fází pro analýzu profilu těkavých látek chmele

Bc. Hana Štefanová

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana Štefanová**
Osobní číslo: **C16623**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Využití mikroextrakce tuhou fází pro analýzu profilu
těkavých látek chmele**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analýzu profilu těkavých látek a význam této analýzy v potravinářství. Popište možnosti využití mikroextrakce tuhou fází z headspace (HS-SPME) pro daný účel a proveďte možnosti ovlivnění extrakčního procesu volbou experimentálních podmínek, a to včetně proměnlivé teploty během sorpce, případně pomocí podtlaku. Zaměřte se především na využití dané metody pro analýzu složek silic v pivovarských surovinách, a to se zvláštním důrazem na chmel a chmelové výrobky.
2. V experimentální části proveďte možnosti využití metody HS-SPME v uspořádání založeném na kombinaci více sorpčních teplot pro analýzu těkavých složek chmele. Pro daný účel vyzkoušejte různá SPME vlákna. Porovnejte profily těkavých látek různých chmelů a s využitím dostupných retenčních indexů a knihoven hmotnostních spekter identifikujte v chromatogramech co největší počet složek. Porovnejte navrženou metodiku s přístupem založeným na HS-SPME při konstantní teplotě sorpce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

Ing. Karolína Adámková


Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

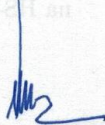
20. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

11. května 2018


prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji,

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

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

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

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

.....

Bc. Hana Štefanová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Doc. Ing. Martinovi Adamovi, Ph.D. za jeho čas a úsilí, který mi věnoval při měřeních a opravě diplomové práce. Chtěla bych také poděkovat moji rodině, která se během této doby starala o našeho malého syna.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá stanovením těkavých látek ve chmelu metodou mikroextrakce tuhou fází. V teoretické části je popis metody extrakce na tuhé vlákno. Jsou zde uvedeny metody provedení extrakce, jejich porovnání a použití v praxi se zaměřením na extrakci těkavých látek chmele. V praktické části diplomové práce je popsán průběh optimalizačních pokusů předcházejících samotnému měření vzorků chmele. Dále jsou v praktické části diskutovány získané chromatogramy ze stanovení metodami GC-FID a GC-MS při porovnání s knihovnými spekter.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikroextrakce tuhou fází; Chmel; Těkavé látky

TITLE

Utilization of Solid phase microextraction utilisation for analysis of volatile substances of hops.

ANNOTATION

This thesis deals with analysis of volatile substances of hops by solid phase microextraction method. In the theoretical part there is presented the description of solid phase microextraction. Method performance, comparison and its utilisation for real samples analysis with respect to the analysis of hop volatile profile are presented as well. Practical part of this thesis includes the description of the optimization process and measuring of real hops aromaprofiles. Identification of compounds from GC-MS and GC-FID are also discussed.

KEYWORDS

Solid phase microextraction; Hops; Volatile substances

OBSAH

Seznam obrázků	9
Seznam tabulek	11
Seznam zkratk	12
Úvod	14
1 Teoretická část	15
1.1 Chmel	15
1.2 Popis rostliny	15
1.3 Odrůdy chmele	16
1.4 Využití chmele	19
1.5 Složení chmele	19
1.5.1 Silice chmele	21
1.5.2 Chmelové silice	21
1.5.3 Dusíkaté látky a lipidy	23
1.5.4 Antioxidanty	23
1.6 Těkavé látky chmelových výrobků	25
1.7 Teoretický úvod do mikroextrakce tuhou fází	26
1.8 Základní výpočty	26
1.9 Optimalizace podmínek extrakce	29
1.9.1 Výběr stacionární fáze SPME	29
1.9.2 Způsob vzorkování	31
1.9.3 Optimální teplota	32
1.9.4 Doba extrakce	32
1.9.5 Přídavek solí a úprava pH	32
1.9.6 Míchání	33
1.10 Uspořádání experimentu mikroextrakce tuhou fází	34
1.10.1 Klasické uspořádání	34
1.10.2 Uspořádání in tube	35

1.11	Typy extrakčních metod	36
1.12	Použití SPME metody.....	38
1.13	Separáčn1 metoda plynov1 chromatografie.....	39
1.14	Srovnání metody SPME a dalš1ch vybran1ch metod	40
1.14.1	Srovnání metody SPME a metody SPE	41
1.14.2	Srovnání metody SPME a SBSE	41
1.15	Využit1 metody SPME v anal1ze t1kav1ch l1tek chmele	43
2	Experimentální část	49
2.1	Vzorky a chemikálie.....	49
2.2	Instrumentace.....	49
2.3	Pracovní postupy.....	50
3	Výsledky a diskuze	51
3.1	Optimalizace podm1nek extrakce.....	51
3.2	Optimalizace parametr1ch dle principu pl1nování experiment1ch.....	51
3.3	Možnost kombinace dvou teplot.....	56
3.4	Optimalizace doby extrakce	60
3.5	Porovnání vl1ken.....	65
3.6	Identifikace l1tek.....	68
3.6.1	Identifikace l1tek chmele odr1dy Mandarina	69
3.6.2	Identifikace l1tek chmele odr1dy Kazbek	70
3.6.3	Identifikace l1tek chmele odr1dy Simcoe	71
3.6.4	Identifikace l1tek chmele odr1dy Cascade	72
3.6.5	Identifikace l1tek chmele odr1dy Amarillo	73
4	Záv1r	74
5	Literatura.....	75
6	Přílohy.....	80

SEZAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chmel otáčivý (<i>Humulus lupulus</i> L.) [8].....	16
Obrázek 2 Strukturní vzorce α -hořkých kyselin a β -hořkých kyselin [26].....	21
Obrázek 3 Strukturní vzorec α -tokoferolu [38]	24
Obrázek 4 Zařízení pro SPME.....	26
Obrázek 5 Aplikátor pro SPME [53].....	34
Obrázek 6 Schéma uspořádání in-tube SPME.....	35
Obrázek 7 Typy extrakčních metod.....	36
Obrázek 8 Schéma metody SPME-GC	38
Obrázek 9 Schéma HPLC při aplikaci desorpční kapaliny	39
Obrázek 10 Vliv přídavku NaCl na SPME	48
Obrázek 11 Odezvové profily pro předpovědi a vhodnost (šedé vlákno).....	52
Obrázek 12 Odezvové profily pro předpovědi a vhodnost (černé vlákno)	53
Obrázek 13 Odezvové profily pro předpovědi a vhodnost (červené vlákno).....	54
Obrázek 14 Plocha píků při porovnání vláken s odlišnými parametry extrakce (n = 3).....	55
Obrázek 15 Počet píků při porovnání vláken s odlišnými parametry extrakce (n = 3)	55
Obrázek 16 Kombinace teplot pro šedé vlákno dle plochy píků (n = 3).....	56
Obrázek 17 Kombinace teplot pro šedé vlákno dle plochy píků (n = 3).....	57
Obrázek 18 Kombinace teplot pro černé vlákno (n = 3).....	57
Obrázek 19 Kombinace teplot pro černé vlákno dle počtu píků (n = 3).....	58
Obrázek 20 Kombinace teplot pro červené vlákno (n = 3)	58
Obrázek 21 Kombinace teplot pro červené vlákno dle počtu píků (n = 3)	59
Obrázek 22 Odezvové profily pro šedé vlákno a kombinace doby 1. a 2. extrakce.....	60
Obrázek 23 Odezvové profily pro černé vlákno a kombinace doby 1. a 2. extrakce	61
Obrázek 24 Odezvové profily pro červené vlákno a kombinace doby 1. a 2. extrakce.....	62
Obrázek 25 Doba extrakce pro šedé vlákno (n = 3).....	62
Obrázek 26 Doba extrakce pro šedé vlákno dle počtu píků (n = 3).....	63
Obrázek 27 Doba extrakce pro černé vlákno (n = 3)	63
Obrázek 28 Doba extrakce pro černé vlákno podle počtu píků (n = 3)	64
Obrázek 29 Doba extrakce pro červené vlákno (n = 3)	64
Obrázek 30 Doba extrakce pro červené vlákno dle počtu píků (n = 3)	65
Obrázek 31 Porovnání vláken na odrůdě Kazbek metodou I (n = 3).....	66
Obrázek 32 Porovnání vláken na odrůdě Mandarina metodou I (n = 3).....	66

Obrázek 33 Porovnání vláken na odrůdě Kazbek metodou II (n = 3)	67
Obrázek 34 Porovnání vláken na odrůdě Mandarina metodou II (n = 3)	67
Obrázek 35 10x přiblížený chromatogram chmele odrůdy Mandarina	69
Obrázek 36 Chromatogram odrůdy chmele Mandarina.....	69
Obrázek 37 Chromatogram odrůdy chmele Kazbek.....	70
Obrázek 38 10x přiblížený chromatogram odrůdy chmele Kazbek	70
Obrázek 39 10x přiblížený chromatogram chmele odrůdy Simcoe	71
Obrázek 40 Chromatogram chmele odrůdy Simcoe.....	71
Obrázek 41 Chromatogram chmele odrůdy Cascade.....	72
Obrázek 42 10x přiblížený chromatogram chmele odrůdy Cascade	72
Obrázek 43 Chromatogram chmele odrůdy Amarillo.....	73
Obrázek 44 10x přiblížený chromatogram chmele odrůdy Amarillo	73

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Příklady stacionárních fází, jejich vlastnosti a aplikace [42]	30
Tabulka 2 Vliv tloušťky stacionární fáze PDMS na výtěžnost analytu [42].....	31
Tabulka 3 Vliv pH a přidané soli na extrakci fenolů pomocí metody SPME [42].....	33
Tabulka 4 Srovnání detekčních limitů metody Headspace a přímé extrakce [47]	37
Tabulka 5 Srovnání citlivosti a detekčních limitů pro metody SPME a SBSE [62]	42
Tabulka 6 Porovnání výtěžnosti analytu mezi metodami SPME a SBSE [62]	43
Tabulka 7 Charakteristika SPME vláken použitých ve studii A. Petrowicze [61]	43
Tabulka 8 Rychlost sorpce na PDSM/DVB 65 μm vlákno při 50 °C [62]	45
Tabulka 9 Porovnání složení chmelové silice Žateckého poloraného červeňáku [62]	46
Tabulka 10 Použité odrůdy chmele.....	49
Tabulka 11 Parametry extrakce na šedé vlákno	50
Tabulka 12 Optimalizované podmínky pro šedé SPME vlákno.....	68

SEZNAM ZKRATEK

A - plocha průřezu jehly

BTEX - souhrnný název pro benzen, toluen, ethylbenzen a xyleny

C_0 - počáteční koncentrace analytu ve vzorku

C_1 - koncentrace analytu v čase t_1

C_{fA} - koncentrace analytu A na vlákne v rovnovážném stavu

C_{fMAX} - maximální dosažitelná koncentrace analytu na vrstvě

C_{tn} - TWA koncentrace

CA - Kalifornie (Spojené státy americké)

CAR - Carboxen, pórovitý sorbent obsahující aktivní uhlí

CCD - centrální kompozitní plán

D - difúzní koeficient analytu

d_c - koncentrace analytu

DI - metoda přímé extrakce

dA - hmotnost analytu, který prošel skrz plochu S

DVB - divinylbenzen

FID - plamenově ionizační detektor

GC - plynová chromatografie

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HS - metoda Headspace

HSSE - headspace sorpční extrakce

K_A - adsorbční rovnovážná konstanta pro analyt A

K_{fS} - rozdělovací koeficient systém vlákno/vzorek

L - délka difúzního prostoru

LOD - detekční limit

n - množství extrahovaného analytu

NV - Nevada (Spojené státy americké)

PA - Pensylvánie (Spojené státy americké)

PAK - polyakrylát

PAU - polycyklické aromatické uhlovodíky

PEG - polyethylen glykol

PDMS - polydimethylsiloxan

RI^a - retenční index spočítaný dle Van den Doola

RI^b - retenční index nalezený

SBSE - extrakce na míchací tyčince

SPME - mikroextrakce tuhou fází

t - doba expozice

USA - Spojené státy americké

V_f - objem vrstvy na povrchu vlákna

VOCs - těkavé organické látky

V_s - objem vzorku

ÚVOD

Analytická chemie se neustále vyvíjí. Jednou z relativně nových metod je i mikroextrakce tuhou fází (SPME). Tato metoda si velmi rychle zajistila poměrně široké využití téměř v každé oblasti chemického výzkumu. Využitelnost této metody je například v analýze vzduchu, odpadních vod, ale i tuhých vzorků. Své uplatnění si našla také v potravinářství.

V pivovarnictví při zpracování chmele se použití metody SPME přímo nabízí. Jednou z možných aplikací v potravinářství je využitelnost v analýze těkavých látek chmele. Za těkavé látky chmele se považují zejména silice. Cílem práce je tedy přiblížit využití této metody při mikroextrakci na tuhé vlákno s následnou analýzou pomocí plynové chromatografie v analýze těkavých látek obsažených ve chmelu. Tyto látky mohou mít výrazný dopad na výsledný výrobek, zejména pokud je uvažováno o pivovarnictví.

První sadou experimentů bylo nalezení vhodných extrakčních podmínek. Extrakce těkavých látek byla prováděna při dvou sorpčních teplotách. Proto bylo potřeba nalézt optimální teploty obou extrakčních kroků. Dále byl potřeba určit dobu obou extrakčních fází, nalézt optimální navážku vzorku a zvolit vhodný typ SPME vlákna. Nalezené optimální podmínky byly poté aplikovány při následných experimentech s cílem extrahovat těkavé látky z chmele a pokusit se o jejich identifikaci.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Chmel

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus*, L.) je rostlina patřící do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*). Konopovité jsou jak jednodomé, tak dvoudomé keře, byliny i stromy. Rostliny jsou jednoleté až vytrvalé. Do čeledi se řadí dva druhy: chmel a konopí. Chmel má dva druhy a řadu odrůd, konopí má tři druhy a rovněž řadu odrůd [1].

1.2 Popis rostliny

Samotný chmel je vytrvalá, dvoudomá rostlina. Má dlouhé řapíkaté listy. Tyto listy mají ze spodní strany srostlé palisty. Listy spodní jsou až 12 cm velké a jsou čepelovité. Čepel je okrouhle vejčitá a dlanitě 3-5 laločnatá. U řapíku je čepel srdčitě vykrojená. Listy výše postavené jsou převážně laločnaté, případně nedělené (viz obrázek 1). Horní listy jsou buď vstřícné, nebo se střídají se samičím květenstvím [2].

Samčí rostliny chmele mají květenství úžlabní nebo terminální nazývané laty. Tyto laty se skládají z kvítků, které jsou pětičlenné. Okvětí kvítků je světle žluté a hvězdčovitě. Má 5 tyčinek [3].

Samičí kvítky mají podobu malých klásků, které se mění v malé šištice o délce cca 3 cm. Tyto šištice mají v době zralosti žlutou barvu a jsou šupinaté. Chmel kvete od května do konce července. Doba zralosti plodů je srpen až září [4].

Chmel se dá nazvat globální plodinou. Je rozšířen nejen po celé Evropě, ale rovněž se vyskytuje i v Americe, Asii a Austrálii. Chmel roste vždy v mírném pásmu. Jeho původem je však mírný pás Eurasie. Přírodním stanovištěm jsou nivy potoků a řek, vlhká místa – zejména křoviny, okraje lesů a lužní lesy. Preferuje kyselé půdní prostředí [5, 6].

Jak už je uvedeno výše, jedná se o vytrvalou rostlinu, která na jednom místě vydrží růst i 25-30 let. I přesto, že chmel má rostliny samčí i samičí, pro pěstební účely se pěstují jen samičí rostliny. To je dáno tím, že chmel po opylení ztrácí kvalitu [7].



Obrázek 1 Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) [8]

1.3 Odrůdy chmele

Chmel je z genetického pohledu poměrně složitou rostlinou. Jak uvádí například Lutz a kol., jeho genetická heterogenita je vysoká. Vytvoření současných kulturních podob nebyla tedy jednoduchá cesta, ale umožnila vzniknout jednotné populaci chmele. Právě v České republice má šlechtění chmele dlouhou tradici [9].

V českých zemích bylo šlechtění chmele prováděno klonovou selekcí na základě pozitivních výběrů. Jinými slovy, docházelo k postupné selekci, kdy byli odstraňováni jedinci s nežádoucími vlastnostmi. Ke tvorbě nových odrůd byly navíc používány jen krajové odrůdy,

a dokonce i planý chmel. Planý chmel je používán z důvodu vysoké genové variability, čehož se využívá ke zvyšování odolnosti kulturních odrůd proti různým chorobám a škůdcům [10].

Za zmínku stojí, že v českých zemích se po dlouhou dobu směl pouze zušlechťovat Žatecký poloraný chmel. Dokonce až do roku 1996 bylo zakázáno pěstovat v České republice jiné odrůdy, než Žatecký poloraný červeňák [11].

Nejpěstovanější odrůdou chmele je v České republice Žatecký poloraný červeňák, který je považován za nejkvalitnější odrůdu. Proto také tato odrůda slouží jako standard pro porovnání kvality nově vyšlechtěných odrůd v České republice i po celém světě. Nejpěstovanější klony Žateckého poloraného červeňáku jsou Osvaldovy klony 31, 72, 114, které vyšlechtil Karel Osvald a byly registrovány v roce 1952 [12].

Ze Žateckého poloraného červeňáku bylo vyšlechtěno velké množství dalších odrůd. Ten tak tvoří genetický základ velkého množství odrůd chmele u nás i v zahraničí. Je přitom třeba zmínit, že České republice se podařilo jako prvnímu státu Evropské unie zapsat chmel na seznam zeměpisných ochranných známek. Stalo se tak 8. května 2007 na základě nařízení Evropské komise č. 503/2007. Toto označení se může používat pro Žatecký poloraný červeňák a jeho registrované klony – Lučan, Blato, Osvaldův klon 31, Osvaldův klon 72, Osvaldův klon 114, Siřem, Zlatan, Podlešák a Blšanka [13].

V posledních letech se však v České republice pěstují i jiné odrůdy chmele. Tato skutečnost je v souladu se zvyšující se poptávkou po pivech jiného typu, do kterých se Žatecký poloraný červeňák nehodí.

Odrůdy chmele lze rozdělit například na rané, polorané a pozdní. Ty se pak dělí podle hořkosti. Odrůdy rané a polorané jsou více aromatické, zatímco odrůdy pozdní jsou hořké [14].

Jiné dělení odrůd nabízí Kosař a Procházka [15], kteří dělí odrůdy chmele na základě pivovarnického hlediska. Výše zmínění autoři dělí odrůdy chmele na:

- Jemné (aromatické) - To jsou především žatecké odrůdy. Tyto odrůdy mají příjemné chmelové aroma a nejsou příliš hořké.
- Hořké (vysokoobsažné) - Tyto odrůdy mají vysoký obsah pryskyřic, zejména pak α -hořkých kyselin, tedy těch, které po izomerizaci dávají pivu hořkost.
- Odrůdy ostatní.

Další dělení chmele uvádí autor Vent [16], který dělí chmel do čtyř skupin. Dělení je provedeno na základě obsahu α -hořkých kyselin. Jsou to následující skupiny:

- Jemně aromatické (fine aroma) - zástupcem této skupiny je právě Žatecký poloraný červeňák. Jedná se o odrůdy chmele, které jsou jemné chutí, určené k přímému chmelení.

Pivu předávají výborné chmelové aroma a hořkost. Obsah α -hořkých kyselin se pohybuje v rozmezí 2,5 až 4,0 %.

- Aromatické (Aroma) - rovněž tyto odrůdy jsou vhodné k přímému chmelení. Pivu předávají jemnou chuť a silnější hořkost než jemně aromatické odrůdy. Obsah α -hořkých kyselin se pohybuje v rozmezí 4 a 7 %.
- Hořké (bitter, dualpurpose) - obsah α -hořkých kyselin se pohybuje mezi 7 až 10 % a pivo má po tomto chmelu silnou hořkost.
- Vysokoobsažné (high alpha) - jak název napovídá, jedná se o odrůdy s vysokým obsahem α -hořkých kyselin. Ten se v případě těchto odrůd pohybuje mezi 12 až 17 %. Pivu předávají tyto odrůdy silnou hořkost a výrazné aroma. K přímému chmelení se používají jen výjimečně, spíše se z těchto odrůd vyrábějí chmelové extrakty.

Pro šlechtění chmele se používala metoda křížení, obdobně jako při hybridizaci. Proto se dnešní odrůdy chmele považují za hybridní odrůdy. Ve skutečnosti se však nejedná o hybridy, ale klony. Tato metoda šlechtění je odpovědná za některé dobré vlastnosti českých chmelů, jako jsou vůně, výnos a obsah α -hořkých kyselin. Je však nutné podotknout, že daná metoda šlechtění je důsledkem specifických požadavků daných odrůd na agrotechnické způsoby pěstování, jako je řez, doba sklizně a samotné založení porostu [17].

Nejvýznamnější odrůdy českého chmele jsou:

- Žatecký poloraný červeňák – obsah α -hořkých kyselin 2,5 až 4,5 %,
- Víťal - obsah α -hořkých kyselin 12 až 16 %,
- Bohemie – obsah α -hořkých kyselin 5 až 8 %,
- Saaz Late – obsah α -hořkých kyselin 3,5 až 6 %,
- Kazbek – obsah α -hořkých kyselin 5 až 8 %,
- Sládek – obsah α -hořkých kyselin 5 až 7 %
- Bor – obsah α -hořkých kyselin 6 až 9 %,
- Agnus – obsah α -hořkých kyselin 9 až 12 %,
- Premiant – obsah α -hořkých kyselin 7 až 10 %,
- Harmonie – obsah α -hořkých kyselin 5 až 8 %,
- Rubín – obsah α -hořkých kyselin 9 až 12 %.

1.4 Využití chmele

V celém světě se chmel nejvíce používá při výrobě piva. I když se v minulosti zkoušel chmel nahradit různými produkty, ten si však svoje výsadní postavení při výrobě piva zachoval. Pro tyto účely se sbírají chmelové šišťice, které se suší při teplotě 40 °C.

Chmel se však nevyužívá pouze v pivovarnictví. Jeho využití je známé i v lékařství nebo kosmetice. Výtažků z chmele se například používá jako prostředků ke zklidnění, nebo při léčbě nespavosti. Rovněž při problémech s nadýmáním se lze setkat s podáváním chmelových výtažků. Známé jsou i fytoncidní výtažky chmele. Používá se proto často například i jako prostředek na kloktání, nebo se z něj dělají obklady, případně zábaly. Chmel je výrazně močopudný a odvádí vodu z těla.

Své využití nalezne i v kuchyni. Mezi staročeské recepty například patří smažené chmelové šišky. Dále se části rostlin používají do salátů, omelet a lze ho i nakládat. Jeho předností je výrazná chuť a velmi vysoký obsah vitamínu C.

Chmel má široké uplatnění nejen v potravinářství. Časté využití je také v medicíně. Autoři uvádějí, že výtažky ze sušeného chmele mají výrazné antibakteriální účinky proti mikroorganismům *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* [18].

Autoři Cleemput a kol ke zdravotním účinkům chmele uvádějí také fakt, že látky obsažené ve chmelu mají protirakovinné účinky. Lze je použít proti zánětům a na léčbu nebo zmírnění metabolických poruch [19].

1.5 Složení chmele

Následující podkapitola bude věnována složení chmelových šišťic, tedy té části chmele, která je využívána nejvíce. Je však potřeba si uvědomit, že toto složení je dosti proměnlivé dle odrůdy a místa pěstování chmele. Stejně tak má vliv na výsledné chemické složení i posklizňová úprava. Složení chmelových šišťic je následující (průměrné údaje jsou uvedeny v hmotnostních procentech) [20]:

- voda 8 až 12 %,
- pryskyřice 15 až 20 %,
- polyfenolické látky 2 až 6 %,
- silice 0,2 až 2,5 %,
- vosky a lipidy 1 až 3 %,
- dusíkaté látky 12 až 15 %,
- sacharidické látky 40 až 50 %,
- minerální látky 12 až 15 %.

Jak už bylo zmíněno výše, nejvýznamnějšími složkami s technologickým významem jsou α -hořké kyseliny, respektive hořké látky obecně a silice. Hořké látky dávají pivu typickou hořkou chuť a silice zajišťují pivu aroma [21].

Ve chmelu jsou obsaženy i látky, které jsou z technologického hlediska naopak nevhodné. Jsou to zejména dusičnany, těžké kovy a zbytky chemikálií používaných v zemědělství při ošetřování chmele [14].

Hořké látky, neboli chmelové pryskyřice, jsou z pohledu technologie výroby piva nejdůležitější složkou. Ve vodě jsou to velmi špatně rozpustné látky. Chmelové pryskyřice se dělí na několik skupin. Jsou to následující [22]:

- Měkké pryskyřice. Tyto pryskyřice dále obsahují Humulony, lupulony a resupony. Humulony jsou α -hořké kyseliny, lupulony představují β -hořké kyseliny a resupony jsou nespecifické pryskyřice.
- Tvrdé pryskyřice. Tvrdé pryskyřice reprezentuje následující dvojice: γ -pryskyřice a δ -pryskyřice.

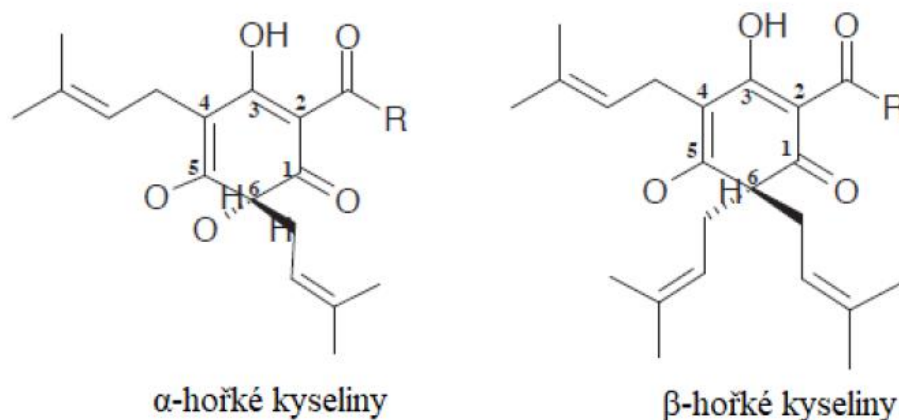
Jak bylo uvedeno výše, hořké látky jsou z pohledu technologie piva pravděpodobně tou nejdůležitější složkou. Na samotné hořkosti piva se pak nejvíce podílejí měkké pryskyřice. Z měkkých pryskyřic pak nejvíce α -hořké kyseliny. Tyto pryskyřice jsou totiž prekurzorem kyselin vznikajících během vaření piva: iso α -hořkých kyselin [23].

Množství výše zmíněných α -hořkých kyselin je odvislé od odrůdy samotné, ale rovněž závisí i na pěstebních postupech a podmínkách. Autoři dále uvádějí, že v průměru je obsah α -hořkých pryskyřic 3-10 hmotnostních % [22]. Jiný autor pak udává, že v případě Českých chmelů se obsah α -hořkých pryskyřic pohybuje v rozmezí 3,5-6,0 %, u hybridních odrůd chmele je to pak rozmezí 7-15 % [23]. V případě α -hořkých kyselin se jedná o slabé kyseliny, které obtížně disociují ve vodě a vodných roztocích. Tyto kyseliny jsou tvořeny směsí pěti známých analogů. Jedná se o: humulon (35-70 %), kohumulon (20-55 %), adhumulon (10-15 %), prehumulon (1-10 %) a posthumulon (1-5 %) [24].

Důležitá je skutečnost, že sensoricky jsou α -hořké kyseliny bez vůně a chutí. Teprve při výrobním procesu piva dochází k rozvinutí jejich hořkosti i vůně. Dochází totiž, jak už je uvedeno výše, k isomeraci α -hořkých kyselin na iso α -hořké kyseliny. Tyto kyseliny teprve dávají pivu jeho typickou vůni a hořkost. Karabín a kol [23] uvádějí, že tyto iso α -hořké kyseliny jsou odpovědné až za 70 % výsledné hořkosti piva.

Mezi α -hořkou kyselinou a β -hořkou kyselinou je ten rozdíl, že druhá jmenovaná má navíc další isopentenylový postranní řetězec na 6. uhlíku aromatického jádra (viz obrázek 2). Stejně jako v případě α -hořkých kyselin, jsou i β -hořké kyseliny tvořeny směsí analogů. Jsou to:

kolupulon (20-55 %), lupulon (30-55 % a adslupulon (5-10 %). Obsah dalších analogů je velmi nízký [25].



Obrázek 2 Strukturální vzorce α -hořkých kyselin a β -hořkých kyselin [26]

Nespecifické měkké pryskyřice se rozlišují na α -resupony a β -resupony. První zmiňované jsou odvozeny od α -hořkých kyselin a druhé od β -hořkých kyselin. Mezi α -resupony patří například isohumulony, humulinové kyseliny nebo humulinony. Mezi β -resupony patří lupotriony a hulupony. Podíl α -resuponů a β -resuponů závisí na stáří chmele. Starší chmel obsahuje více β -resuponů [27].

1.5.1 Silice chmele

Jedná se o velmi bohatou směsici různých látek. Nejčastěji se však jedná o flavonové glykosidy, anthokyanogeny, katechiny a volné fenolové kyseliny. Jedná se o látky, které jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a vodných roztocích a snadno podléhají oxidačně-redukčním procesům. Polyfenolové látky chmele rovněž mají velmi vysokou reaktivitu vůči bílkovinám. Obsah těchto polyfenolů se liší dle odrůdy. Například Čepička a Kubíček uvádějí, že největší množství těchto polyfenolových látek obsahují jemné aromatické odrůdy [14].

Tyto látky jsou důležité z pohledu varného procesu piva. Jak upozorňuje Karabín a kol, polyfenoly obsažené ve chmelu společně s antioxidačními vlastnostmi mladiny ovlivňují tvorbu karbonylů nejen při samotném vaření piva, ale i při jeho dalším skladování [23].

1.5.2 Chmelové silice

Chmelové silice dodávají pivu jeho aroma. Z tohoto pohledu lze chmelové silice označit za velmi důležitou skupinu látek, kterou chmel obsahuje. Z celkového množství silic, které jsou ve chmelu obsaženy, jich do konečného produktu, tedy uvařeného piva, projde jen asi čtvrtina.

Je nutné podotknout, že výrazný vliv na obsah silic má počasí, pěstební technologie a zacházení s chmelem během sklizně a po sklizni [25].

Chmelové silice představují směs velkého množství různých látek, které mají velmi rozličné chemické složení a jsou ve chmelu zastoupeny v celkovém množství do 1 g/100 g sušiny. V tomto jednom gramu jsou hojně obsaženy látky myrcen a humulen v množství, které odpovídá desítkám procent celkového obsahu silic [25].

Na obsah silic v rostlině má významný vliv odrůda, ale i složení půdy a počasí. Obsah silic závisí také na době zralosti. Obsah silic během zrání šištic stoupá a jejich přesné chemické složení však zatím nebylo zcela rozklíčováno [21].

V průměru obsahuje chmel 0,5 až 3,0 hmotnostních % silic. Nicméně, jak už je uvedeno výše, toto množství se mění dle odrůdy a dalších podmínek. Například u velmi jemných aromatických chmelů je celkový obsah silic 0,2 až 0,3 hmotnostních % [28].

Již bylo mnohokrát zopakováno, složek ve chmelových silicích je velké množství. Řada těchto složek navíc není ani chemicky definována. Složky silic lze rozdělit do tří následujících skupin [20]:

- uhlovodíková frakce,
- kyslíkatá frakce,
- frakce sirných sloučenin.

Kromě výše uvedených tří frakcí se v chmelových silicích dále nachází ketony s větveným řetězcem. Tento řetězec může být jak nasycený, tak i nenasycený. Dále jsou v silicích obsaženy epoxidy. Ty vznikají oxidací terpenických uhlovodíků. Obsah těchto epoxidů během stárnutí chmele roste. Kromě výše zmíněných látek silice obsahují také estery, které mají zásadní vliv při tvorbě aroma [29].

Uhlovodíková frakce představuje nejpočetnější frakci chmelových silic. Jak uvádí Čepička a kol. [20], u čerstvě sklizeného chmele tvoří tyto uhlíkové frakce silic 70 až 80 %. Mezi nejvýznamnější zástupce uhlíkové frakce chmelových silic patří terpenické uhlovodíky. Ty jsou reprezentovány např. látkami myrcen, karyofylen, humulen a farnesen. Z pohledu aroma je podle autorů Basařová a Čepička důležitý poměr monoterpenů a seskviterpenů. Tento poměr ve výsledku určuje hořkost piva [30].

Kyslíková frakce silic vzniká během samotného zrání a je to, co do chemického složení, velmi rozmanitá složka. I zde platí, že složení kyslíkové frakce je závislé na dané odrůdě, ale v tomto případě zejména na způsobu sklizně a posklizňovém zacházení s chmelem, zvláště pak na jeho uskladnění. Skladování je právě z pohledu kyslíkatých frakcí chmelových silic důležitá součást celého zpracování chmele, neboť během něj dochází ke zvyšování obsahu

těchto látek. Kyslíkatá frakce silic je tvořena nejčastěji alkoholy (např. nerol nebo linalool) a methylketony [20, 21].

Frakce sirných sloučenin chmelových silic pak představuje jen nepatrné množství. Nicméně jsou to látky sensoricky velmi aktivní, a tak i když je jejich obsah ve chmelu velmi nízký, mají velmi výrazný podíl na celkovém aroma chmele.

Mezi ostatní látky chmele se řadí mono- di- tri- a oligosacharidy, dusíkaté látky a pektinové látky. Monosacharidy jsou v suchém chmelu obsaženy v rozmezí 2 až 4 %. Pektinové látky tvoří u suchého chmele 1 až 2 %.

1.5.3 Dusíkaté látky a lipidy

Obsah dusíkatých látek je ve chmelu samotném i v pivu bedlivě hlídán. Obsah dusičnanů v pivu nesmí překročit 50 mg l⁻¹. Dusičnany snižují kvalitu piva, ale rovněž mohou představovat zdravotní riziko. V průběhu výrobního procesu totiž dochází k redukci dusičnanů na dusitany, které se pak podílejí na tvorbě karcinogenních N-nitrosaminů [31].

Další látky, které se v suchém chmelu vyskytují, jsou lipidy. Jejich obsah je v suchém chmelu do 3 %. Dále chmel obsahuje řadu minerálních látek, jejichž koncentrace je opět závislá na pěstební technologii. Obsah minerálních látek se pohybuje v rozmezí 7 až 10 % [31].

1.5.4 Antioxidanty

Významnou složkou chmele jsou antioxidanty. Jedná se o velmi významné látky z pohledu účinku na lidské zdraví. V poslední době se proto jedná o velmi sledované látky, které se podílí na celkové jakosti potravin.

Obecně jsou antioxidanty prostředníkem přenosu energie. Rovněž fungují jako prostředek ochrany a podpory imunity. Antioxidanty slouží jako signální molekuly buněčné úrovně a jsou považovány za látky, které přispívají ke zdraví člověka. Posilují celkovou obranyschopnost organismu a chrání organismus před choroboplodnými zárodky. Kromě výše uvedeného je antioxidantům připisována celá řada dalších pozitivních dopadů. Těmi jsou zejména zpomalování stárnutí a utlumování negativních procesů v organismu [32-34].

Antioxidanty v organismu neutralizují působení volných radikálů. Volné radikály poškozují organismus vlivem oxidačního stresu. Z pohledu zdraví je tak nutné udržovat rovnováhu mezi volnými radikály a antioxidanty. Jak ukazují vědecké studie, antioxidanty mají na lidské zdraví velmi pozitivní vliv [35].

Chmel obsahuje antioxidantů hned několik. Jak uvádí Krofta a kol. [25] nejvýznamnější z nich jsou zejména skupiny dimerů a trimerů. Tyto látky jsou odvozeny od katechinu a epikatechinu, tedy látek, které jsou souhrnně nazývány oligomerní proanthokyanogeny.

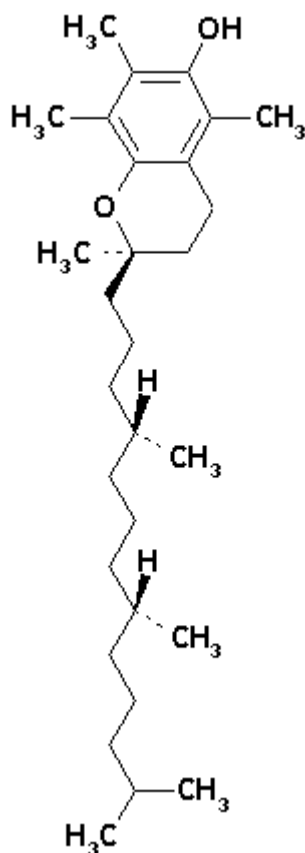
Tyto látky chrání zejména buněčnou DNA, snižuje se tak riziko její oxidace a ve výsledku i riziko vzniku nádorových onemocnění.

Další skupinou jsou prenylované flavonoidy. Jedná se o látky, které jsou vnímané lidským organismem jako estrogény. Tyto látky mají vysoký antioxidační potenciál. Interagují s tkáňovými receptory a ovlivňují buněčné dělení [36].

Mezi antioxidanty obsažené ve chmelu patří rovněž flavonoidy. Tyto látky se hojně využívají i ve farmakologii a jejich množství je velmi závislé na dané odrůdě. Nejvýznamnějším antioxidantem obsaženým v chmelu je však vitamín E [25].

Jednou z mnoha složek skupiny vitamínu E je látka s chemickým označením α -tokoferol. Tento vitamín byl objeven v roce 1922. Obecně platí, že vitamíny jsou látky, které organismus potřebuje ke své běžné činnosti.

Vitamín E je principiálně derivát chromanu. Těchto derivátů je celkem osm a tvoří ho látky tokoferoly a tokotrienoly. Všechny osm derivátů má podobný strukturální základ, kterým jsou tokol a tokotrienol. Jedná se o látky, které obsahují chromovaný cyklus s nasyceným nebo nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem o 16 atomech uhlíku [37].



Obrázek 3 Strukturální vzorec α -tokoferolu [38]

1.6 Těkavé látky chmelových výrobků

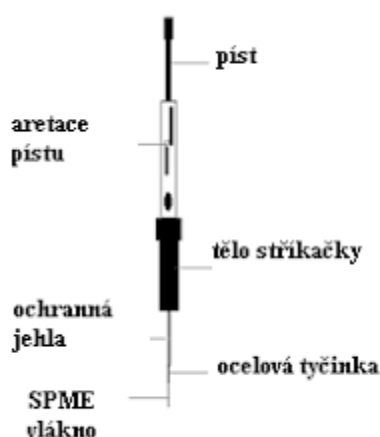
Zvláštní pozornost je věnována těkavým látkám obsaženým ve chmelových, a to zejména v pivu. Kromě chmelových silic, se za těkavé látky označují rovněž alkoholy, estery, aldehydy, ketony a i některé aminy a sirné sloučeniny [39].

Štěrba a kol uvádí, že v pivu, jako ve výsledném produktu připraveném z chmele, je obsaženo až 80 alkoholů, jejich množství se pohybuje od 100 až po 300 mg l⁻¹. Esterů je v pivu obsaženo do 40 mg l⁻¹ [39, 40].

Výše uvedené těkavé látky jsou důležité z pohledu výroby piva. Je proto nezbytné stanovit jejich přesnou koncentraci nejen v samotném vstupujícím chmelu, ale i ve výsledných produktech. Jako nejlepší způsob stanovení alkoholů, esterů a dalších těkavých látek se jeví plynová chromatografie (GC). Jiné analytické metody stanovení nejsou dnes upřednostňovány kvůli jejich nevýhodám, jako jsou menší přesnost a nespecifičnost. Moderní stanovení lze provést efektivně a přesně pomocí plynové chromatografie kombinované s metodou mikroextrakce vzorku tuhou fází. Tento postup je velmi přesný, robustní a rychlý [41].

1.7 Teoretický úvod do mikroextrakce tuhou fází

Úvodem je o metodě mikroextrakce tuhou fází zkr. SPME (z anglického solid phase microextraction) třeba říci, že se jedná o metodu izolace a zakoncentrování látek z matrice. Je to metoda velmi efektivní a levná. Její princip spočívá v sorpci a desorpci. Tato metoda se obejde bez složité instrumentace a rovněž bez rozpouštědla. Jedná se o jednoduché zařízení, které je tvořeno vláknem, jenž je pokryté sorpční vrstvou. Toto vlákno je umístěno v duté jehle (obrázek 4) [42].



Obrázek 4 Zařízení pro SPME

Princip metody je také velmi jednoduchý. Pracovní postup má dva kroky. V prvním kroku je vlákno vysunuto do vzorku, kdy dojde následně k sorpci analytů na sorpční vrstvu vlákna. Extrakce probíhá až do okamžiku dosažení rovnováhy. Toto je asi zásadní rozdíl od klasických extrakčních metod, kdy je analyt extrahován v co nejvyšší koncentraci. V případě SPME je analyt tedy extrahován pouze do okamžiku dosažení rovnovážného stavu. Druhý krok pak spočívá v tom, že vlákno s extrahovaným analytem je umístěno do analytického zařízení. V tomto zařízení pak proběhne desorpce, separace a kvantifikace analytů. Velmi často je metoda SPME využívána v kombinaci s metodou GC (plynová chromatografie - gas chromatography), případně s HPLC (kapalinová chromatografie – high performance liquid chromatography) [44].

1.8 Základní výpočty

Principem mikroextrakce je rozdělení analytu mezi matici vzorku a vlákno. Matrice vzorku může být kapalná, plynná nebo pevná. Tuhé mikroextrakční vlákno pak může být na svém povrchu opatřeno kapalnou nebo tuhovou vrstvou [45].

Je potřeba si uvědomit, že při analýze nedochází k extrakci veškerého analytu, který byl obsažený v matrici. Extrahována je pouze část analytu, který je ve vzorku přítomný. K tomu, aby bylo dosaženo maximální extrakce (tedy extrakce celého množství vzorku), je potřeba vytvořit speciální podmínky. Tyto podmínky spočívají v tom, že množství analytu je velmi velké a afinita vzorku k povrchu vlákna je malá. Množství analytu, které je při analýze sorbované na povrch vlákna, lze pro dvoufázový systém vypočítat pomocí následující rovnice (1) [45, 46].

$$n = \frac{K_{fS} \cdot V_S \cdot V_f \cdot c_0}{K_{fS} \cdot V_f + V_S} \quad (1)$$

kde: K_{fS} – rozdělovací koeficient vlákno/vzorek,
 V_f – objem sorpční vrstvy vlákna,
 V_S – objem vzorku,
 c_0 – počáteční koncentrace analytu ve vzorku
 n – množství extrahovaného analytu

Výše uvedená rovnice (1) uvádí, že existuje určitý lineární vztah mezi koncentrací analytu ve vzorku a extrahovaným množstvím. Je potřeba si uvědomit, že vlákna, respektive materiál, ze kterých jsou tato vlákna vyrobena, mají velkou afinitu vůči organickým molekulám. To jinými slovy znamená, že hodnota rozdělovacího koeficientu systému vlákno/vzorek, je vysoká.

Z výše uvedeného je patrné, že na vlákne samotném dochází k zakoncentrování daného analytu. To má za následek zvýšení citlivosti metody. Podstatné je, že hodnota rozdělovacího koeficientu vlákno/ vzorek nemůže stačit k tomu, aby byla extrakce kvantitativní. Z tohoto důvodu musí být prováděna optimalizace [45, 47].

Rovněž z výše uvedené rovnice (1) vyplývá, že v případě, kdy je objem vzorku velký, nemá množství extrahovaného analytu vliv na objem vzorku [45]. Rovnici (1) lze při zanedbání součinu $K_{fS} \cdot V_f$ vůči V_S upravit do tvaru (2):

$$n = K_{fS} \cdot V_f \cdot c_0 \quad (2)$$

Extrakce analytu na tuhou vrstvu, která je na povrchu vlákna, tedy adsorpci, popisuje rovnice (3) níže [45]:

$$n = c_{fA} = K_A \cdot V_S \cdot V_f \cdot c_{0A} \cdot c_{fMAX} - c_{fA} \cdot V_S + K_A \cdot V_f \cdot c_{fMAX} - c_{fA} \quad (3)$$

kde: c_{fA} – koncentrace analytu A na vlákne v rovnovážném stavu
 K_A – adsorpční rovnovážná konstanta pro analyt A
 c_{fMAX} – maximální dosažitelná koncentrace analytu na sorpční vrstvě
 V_f – objem sorpční vrstvy vlákna
 V_S – objem vzorku
 n – množství extrahovaného analytu

Výše uvedená rovnice (3) ukazuje, že pokud je hodnota c_{fMAX} větší než hodnota c_{fA} , případně pokud je afinita analytu k adsorpční vrstvě malá, vyskytuje se lineární závislost mezi počáteční koncentrací a extrahovaným množstvím analytu [45, 46].

Analyt může být extrahován z tuhých nebo plyných matric, přičemž není nutné znát objem původní matrice. Takto lze stanovit koncentrace vybraných organických látek například v půdě, nebo ve vodě v rybníku. K tomuto účelu se používá speciální zařízení k odběru vzorku, které je mobilní, a lze jej odnést na místo analýzy. SPME vlákno je umístěné uvnitř ochranné jehly chránící vlákno při extrakci a při přemísťování z laboratoře na místo měření. Celou krycí jehlu i s vláknem lze poté umístit do GC nebo HPLC, jen je třeba mít chromatograf opatřený nástavcem pro vkládání jehly s vláknem. Otvor jehly je velmi malý a neumožňuje proudění vzduchu. Nemůže proto dojít k ovlivnění extrahovaného množství analytu okolím matrice a jediným důležitým parametrem se tak stává difúze analytu uvnitř ochranné jehly. V tomto případě vzniká koncentrační gradient, který lze popsat rovnicí (4) [45, 47]:

$$\frac{dA}{dt} = -D \cdot A \cdot L \cdot c \quad (4)$$

kde: dA – hmotnost analytu, který prošel skrz plochu S ,
 S – plocha průřezu jehly,
 dt – doba expozice,
 D – difúzní koeficient analytu,
 L – délka difúzního prostoru,
 c – rovnovážná koncentrace analytu.

1.9 Optimalizace podmínek extrakce

Pro kvantitativně provedenou extrakci je potřeba nastavit optimální podmínky. Zejména se jedná o [45, 47]:

- Volba sorpční fáze SPME,
- způsob vzorkování,
- teplota,
- doba extrakce,
- úprava pH a přidavek soli,
- míchání.

1.9.1 Výběr stacionární fáze SPME

Prvním krokem pro SPME je volba vhodné stacionární fáze vzhledem k analytu, který má být extrahován. Bez dobře zvoleného vlákna není možné provést extrakci kvantitativně a následné optimalizace jsou proto zbytečné. Stacionární fáze pro SPME lze rozdělit podle velkého množství kritérií. Základní dělení je však následující [45]:

- vázaná stacionární fáze
- nevázaná stacionární fáze

Rozdíl mezi vázanou a nevázanou stacionární fází je takový, že vázané fáze jsou stabilní ve většině používaných organických rozpouštědlech, zatímco fáze nevázané jsou stabilní v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou. V tomto případě může dojít i k bobtnání. Druhé možné rozdělení stacionárních fází může být následující [45, 47]:

- homogenní čisté polymery - absorbenty,
- porézní částice suspendované v polymeru - adsorbenty.

V prvním případě dochází k tomu, že analyt je zachycen absorpcí ve vrstvě pokrývající vlákno. V druhém případě dochází k zachycení analytu pomocí adsorpce na povrchu porézních částic, které jsou suspendované ve vrstvě vyskytující se na povrchu vlákna.

Třetím možným dělením stacionárních fází pro SPME je [45]:

- polární,
- nepolární.

Je nasnadě, že polární fáze jsou výhodnější pro extrakci polárních látek a nepolární fáze jsou efektivnější při použití pro extrakci nepolárních látek. Základní přehled stacionárních fází používaných při SPME a jejich základní vlastnosti, případně jejich aplikace, jsou zobrazeny v následující tabulce 1:

Tabulka 1 Příklady stacionárních fází, jejich vlastnosti a aplikace [42]

Typ a tloušťka stacionární fáze	Polarita	Aplikace
7 μm PDMS 30 μm PDMS 100 μm PDMS	Nepolární Nepolární Nepolární	Nepolární organické sloučeniny: VOCs, PAU, BTEX
85 μm PA	Polární	Polární organické sloučeniny: triaziny a fenoly
65 μm Carbowax - DVB	Polární	Alkoholy, ketony, nitrované aromáty
65 μm PDMS - DVB	Bipolární	Aromatické uhlovodíky
75 μm Carboxen - PDMS	Bipolární	VOCs a uhlovodíky

Vysvětlivky: PDMS – polydimethylsiloxan; PA – polyakrylát; DVB – divinylbenzen; PAU – Polycyklické aromatické uhlovodíky; VOCs – těkavé organické látky; BTEX – souhrnný název pro benzen, toluen, ethylbenzen a xyleny

Významnou a důležitou charakteristikou SPME vláken, která musí být brána v úvahu, je tloušťka stacionární fáze. Platí totiž, že v případě silnější vrstvy stacionární fáze se sorbuje větší množství analytu, než v případě slabší vrstvy. Silnější vrstva stacionární fáze se tedy využívá pro analýzu těkavých látek. V tomto případě je analyt sorbován rychleji, ve větším množství a dochází k menším ztrátám. Rovněž při použití silnější vrstvy stacionární fáze je možné extrahovat i látky o vysokém bodu varu. Nicméně jde o zdlouhavý proces a existuje zde riziko, že dojde k přenosu analytu z jedné extrakce do další. V případě použití tenké vrstvy stacionární fáze je desorpce rychlá, ale sorpční kapacita tenké vrstvy je menší oproti stacionární fázi v případě silné vrstvy, viz tabulka 2 [48].

Tabulka 2 Vliv tloušťky stacionární fáze PDMS na výtěžnost analytu [42]

Látka	Výtěžnost [%]		
	100 μm	30 μm	7 μm
Benzen	2	< 1	< 1
Toluen	5	1	< 1
Chlorbenzen	6	2	< 1
Ethylbenzen	3	4	1
1,3-dichlorbenzen	17	5	2
1,4-dichlorbenzen	15	5	1
1,2-dichlorbenzen	15	4	1
Naftalen	13	4	1
Fluoren	29	18	8
Fenantren	37	27	16
Antracen	49	38	32
Pyren	69	54	47
Benzo[a]antracen	105	91	96
Chrysen	100	100	100
Benzo[b]fluoranten	104	111	120
Benzo[k]fluoranten	111	124	127
Benzo[a]pyren	119	127	131

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že je třeba dbát na správný výběr vhodné tloušťky stacionární fáze a zároveň je nutné brát v úvahu množství analytu, velikost molekul analytu a časovou náročnost celého procesu.

1.9.2 Způsob vzorkování

Způsob vzorkování při SPME je rovněž nesmírně důležitý pro kvantitativní provedení extrakce. Obecně lze rozlišovat dva základní způsoby, a to [45]:

- Headspace (HS). Tato metoda extrakce je prováděna z prostoru nad vzorkem v tuhém nebo kapalném stavu, který je umístěn v uzavřené nádobce,
- Direct immersing (DI). Jedná se ponoření vlákna do kapalné nebo plynné matrice vzorku

Metoda HS je používána k extrakci těkavých látek, které mají nízký bod varu. Extrakce může být provedena z tuhých nebo kapalných matric. Druhá zmiňovaná metoda DI je oproti tomu vhodná spíše pro použití v případě extrakce netěkavých látek z kapalných vzorků nebo extrakce z plynných vzorků. Tato metoda se například používá pro vzorkování látek ze vzduchu. V plynném prostředí se molekuly pohybují rychleji a rychleji tak nastane i rovnovážný stav mezi vláknem a analytem [45, 50].

Úskalím při extrakci výše uvedenou metodou DI může být kontaminace matrice makromolekulárními látkami, případně mechanickými nečistotami. Pro odstranění nežádoucích kontaminantů je třeba vzorek filtrovat nebo odstředit, případně vlákno ochránit membránou [50].

1.9.3 Optimální teplota

Teplota má na extrakční postup během SPME analýzy významný vliv [45]. Obecně lze tento vliv rozdělit na:

- extrakční,
- skladovací.

Vliv teploty se může projevat například tím, že pokud dojde ke zvýšení extrakční teploty, tak se zároveň zvýší difúze analytu k vláknu. Nicméně současně s tím může být z vlákna analyt snadněji uvolněn. Mezi zvýšením extrakční teploty a uvolněním analytu z vlákna neexistuje přímá úměra. V praxi je tak potřeba provádět všechny extrakce při stejné teplotě [45].

Vliv má i teplota během skladování vzorku zachyceného na vláknech. Pokud je totiž vzorek zachycen na vláknech, klesá v závislosti na rostoucí teplotě jeho množství, které po 24 hodinách na vláknech zůstává. Je tedy žádoucí analýzu provádět co nejrychleji [45].

1.9.4 Doba extrakce

Doba extrakce hraje významnou úlohu v každém analytickém procesu. V případě SPME je čas přímo kritickou veličinou. Z pohledu extrakce je nejrizikovějším časovým úsekem okamžik, kdy dochází k významné změně koncentrace analytu na vláknech za časovou jednotku. Je potřeba zmínit, že k největším změnám v koncentraci dochází prvních několik minut. Délka tohoto okamžiku závisí rovněž na použité teplotě [46, 49].

1.9.5 Přídavek solí a úprava pH

Problémem používání metody SPME může být rozpustnost analytů. Nicméně přidáním solí, například chloridu sodného, případně změnou pH, dochází k posílení iontové síly roztoku. Hlavní přínos zvýšení iontové síly roztoku spočívá v tom, že se sníží rozpustnost analytů. Dojde tak ke zvýšení výtěžku extrakce u polárních a těkavých látek. V případě látek vysoce polárních však může přídavek solí způsobit rušivé píky [45, 47].

Obdobně jako přidání chloridu sodného, funguje i změna pH. Tedy vhodnou úpravou pH může být zvýšen výtěžek extrakce, příčinou je změna disociační konstanty daného analytu. Obecně platí, že kyselé látky jsou snadněji extrahovány v prostředí kyselém a naopak bazické látky jsou lépe extrahovány v prostředí bazickém, viz tabulka 3 [46].

Tabulka 3 Vliv pH a přidané soli na extrakci fenolů pomocí metody SPME [42]

Analyt	Odezva detektoru [plocha píku]			
	Bez přídavku soli		S přídavkem soli	
	pH 7	pH 2	pH 7	pH 2
2-chlorfenol	1800	2361	3952	14028
Fenol	810	1003	6425	6150
Methylfenol	761	882	5485	7434
3- a 4-methylfenol	1795	1846	15337	19723
2-nitrofenol	422	474	311	2315
2,4-dimethylfenol	1344	1476	15000	20710
2,4-dichlorfenol	5396	8138	19803	61661
2,6-dichlorfenol	2991	5858	12511	48530
4-chlor-3-methylfenol	2398	3137	24060	33529
2,4,5-trichlorfenol	3115	11097	34270	96333
2,4,6-trichlorfenol	9702	19307	35466	109492
2,4-dinitrofenol	0	11	765	1182
4-nitrofenol	626	730	11458	6536
2,3,4,6-tetrachlorfenol	3108	27683	33938	70440
2-methyl-4,6-dinitrofenol	55	47	920	1685
Pentachlorfenol	2305	40582	22056	143905

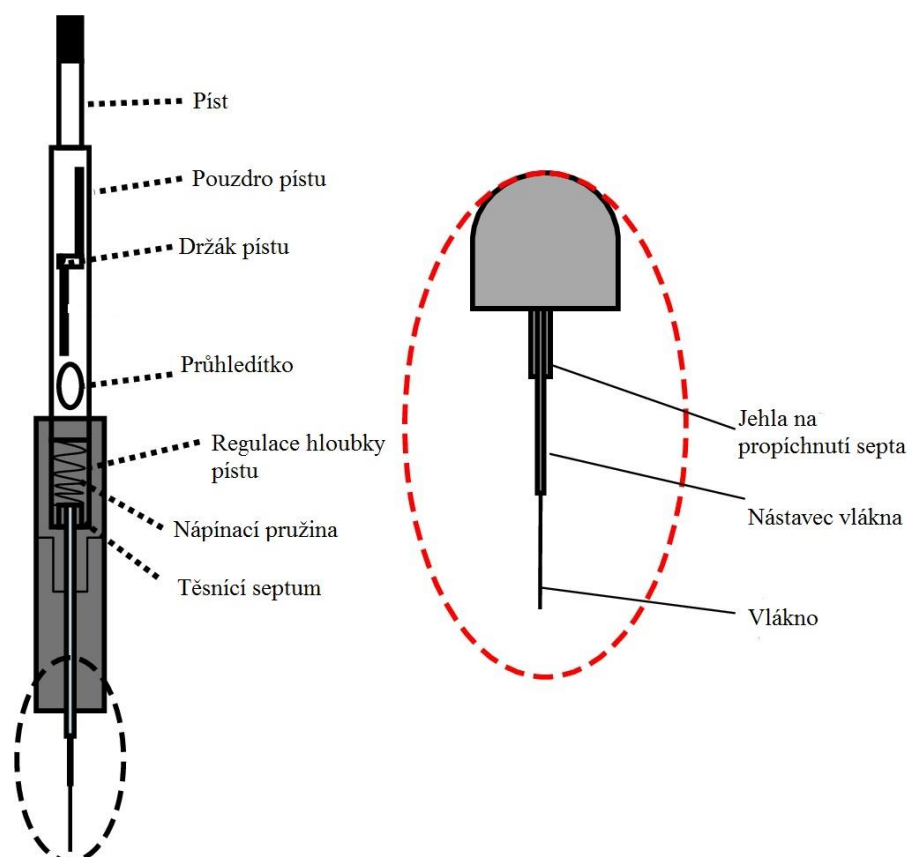
1.9.6 Míchání

Vliv míchání je různý pro různé způsoby přípravy vzorku. Zatímco pro extrakci HS-SPME nemá, s výjimkou látek méně těkavých, míchání prakticky žádný význam. U těchto látek totiž míchání přispívá k urychlení transportu. Tím dochází k rychlejšímu ustavení rovnovážného stavu mezi vlákem a okolním prostředím. V případě DI-SPME vede míchání k rychlejšímu dosažení rovnováhy vždy. Pro opakovaná měření stejného typu analytu se nedoporučuje měnit rychlost míchání během extrakce. Dochází tím ke zhoršení reprodukovatelnosti výsledků [45, 46].

1.10 Uspořádání experimentu mikroextrakce tuhou fází

1.10.1 Klasické uspořádání

Uspořádání SPME experimentu může být klasicky na vlákno, nebo takzvaně in-tube. Uspořádání na vlákno je základním uspořádáním, kterého je využíváno k odběru vzorku. Zařízení, které, je používáno pro tento účel, je blízce podobné injekční stříkačce, ve které je umístěné vlákno. Toto vlákno je cca 1 cm dlouhé a potažené polymerním materiálem. Na tomto polymerním materiálu dochází k samotné sorpci analytu (obrázek 5). Z obrázku je patrné, že vlákno je umístěné uvnitř duté jehly a jedním koncem je upevněné k pístu. Pokud je vlákno vytaženo z duté trubice jehly ven, přijde do kontaktu s analytem.



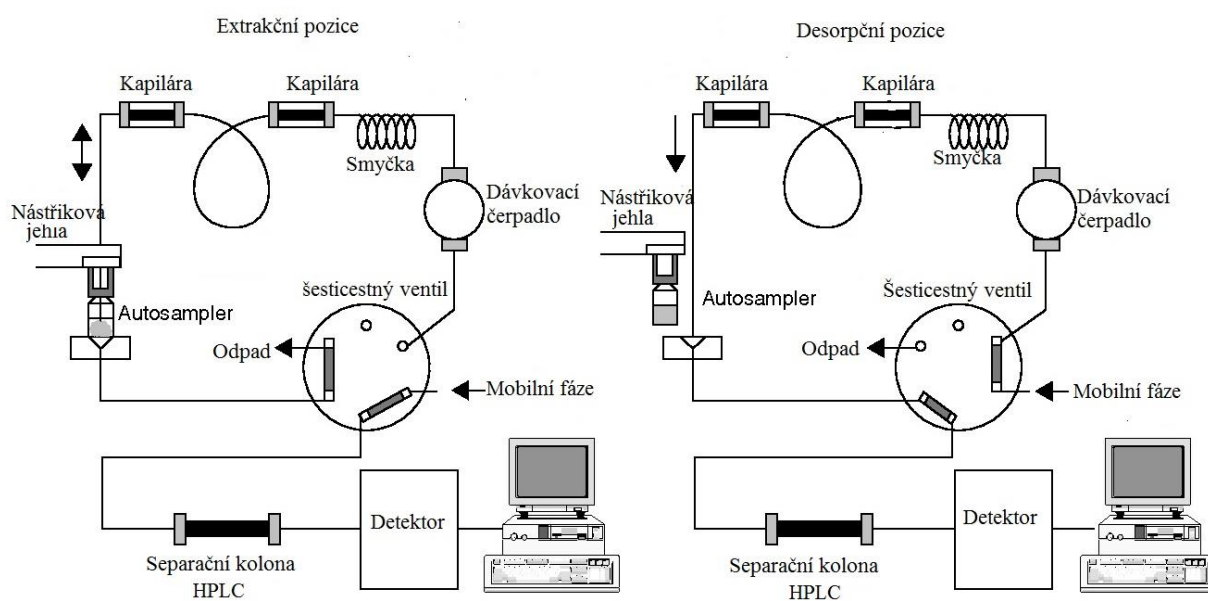
Obrázek 5 Aplikátor pro SPME [53]

Extrakce a následná desorpce probíhá tak, že vlákno je nejprve pomocí pístu vtaženo do držáku. V následném kroku je dutá jehla, ve které je vlákno umístěné, zavedena do nádoby, ve které je daný vzorek. Následně je vlákno opět pomocí pístu vysunuto z duté jehly a dostane se do kontaktu s měřeným analytem. Třetím krokem je, že vlákno je v kontaktu se vzorkem po potřebnou dobu. Po skončení této doby je vlákno pomocí pístu opět vztaženo do duté jehly.

Desorpce samotného analytu následně probíhá v nástřikovém prostoru plynového chromatografu, případně prostřednictvím SPME-HPLC adaptéru.

1.10.2 Uspořádání in tube

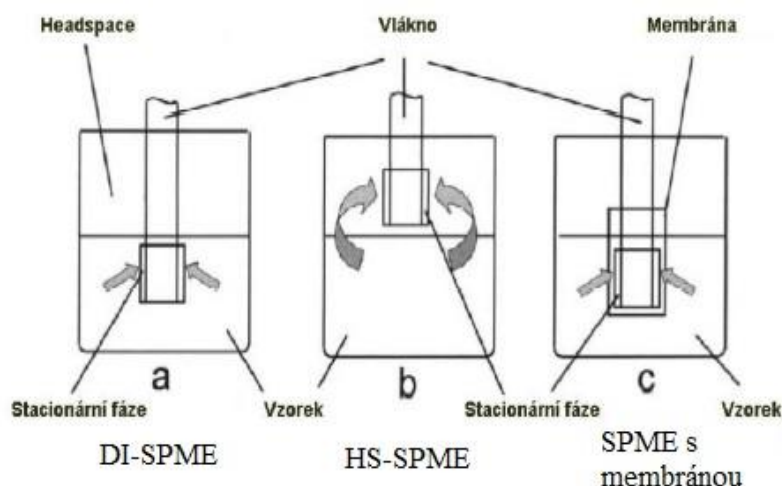
Při tomto uspořádání probíhá stanovení analytu pomocí HPLC, případně pomocí LC-MS. Základem jsou otevřené kapiláry v podobě tenkých trubic (viz obrázek 6). Uvnitř těchto kapilár je nanášena vrstva polymeru. Výhodou tohoto uspořádání je, že postupně probíhá extrakce, desorpce a nástřik do chromatografické kolony. V tomto uspořádání jsou totiž analyty přímo extrahovány do stacionární fáze, která se nachází uvnitř kapilár. Následně jsou tyto analyty desorbovány mobilní fází, případně rozpouštědlem.



Obrázek 6 Schéma uspořádání in-tube SPME

1.11 Typy extrakčních metod

Extrakce na tuhé vlákno může být provedena několika způsoby, níže budou popsány tři konkrétní typy SPME. Jedná se o extrakční metody: přímá extrakce, headspace extrakce a membránová extrakce.



Obrázek 7 Typy extrakčních metod

Přímá extrakce (viz obrázek 7a) spočívá v tom, že vlákno potažené polymerem je ponořeno do vzorku. Tak dojde k přenosu zkoumaného analytu z matrice vzorku na stacionární fázi. V případě, že je vzorek kapalný, je nutné zajistit dostatečné a hlavně rovnoměrné míchání. Tím dojde k rychlejšímu přenosu analytu ze vzorku na vlákno. V případě plynného vzorku je nutné zajistit přirozené proudění vzduchu. Rozhodujícím faktorem, který může výrazně ovlivnit výsledky, je teplota [53].

Druhou extrakční metodou je metoda nazývaná headspace. Její princip je zobrazen na obrázku výše (obrázek 7b). Název metody je vlastně odvozen od jejího principu, který spočívá v tom, že analyt musí při extrakci projít bariérou tvořenou vzduchem. U této extrakční metody je velmi nutné provést extrakci co nejrychleji. Rychlost má v tomto případě zásadní vliv na množství extrahovaného analytu. Platí totiž, že více těkavé látky jsou extrahovány rychleji, než ty méně těkavé [53].

Tato extrakční metoda má nespornou výhodu, která spočívá v tom, že vlákno je chráněno před poškozením látkami, které mají vysokou molekulovou hmotnost, případně před poškozením látkami netěkavými, které jsou přítomné v matrici. Takové látky mohou být například bílkoviny. Další významnou výhodou této extrakční metody je, že umožňuje úpravu pH vzorku a dalších vlastností. Nehrozí přitom poškození vlákna [53, 54].

V porovnání s metodou přímé extrakce dochází u metody headspace k rychlejšímu dosažení rovnovážného stavu v případě těkavých látek při stejné rychlosti míchání. Tato skutečnost je způsobena tím, že analyt je v případě extrakční metody headspace před samotnou extrakcí ukrytý právě v prostoru headspace. Druhým faktorem, který způsobuje rychlejší ustanovení rovnovážného stavu v případě extrakční metody headspace je, že difúzní koeficienty jsou v plynné fázi čtyřikrát větší, než v případě fáze kapalné [53].

Tabulka 4 uvádí porovnání detekčních limitů (LOD) metod přímé extrakce a headspace extrakce pro BTEX sloučeniny. Porovnání bylo provedeno pro dvě různá vlákna: PDMS (polydimethylsiloxan) a Carboxen-PDMS (Carboxen-polydimethylsiloxan).

Tabulka 4 Srovnání detekčních limitů metody headspace a přímé extrakce [47]

Látka	LOD [ng l ⁻¹]			
	Headspace extrakce		Přímá extrakce	
	80 μm Car-PDMS	100 μm PDMS	80 μm Car-PDMS	100 μm PDMS
Benzen	55	480	45	1200
Toulen	50	430	35	550
Ethylbenzen	60	225	35	225
m-xylen	60	200	40	215
p-xylen	55	215	35	220

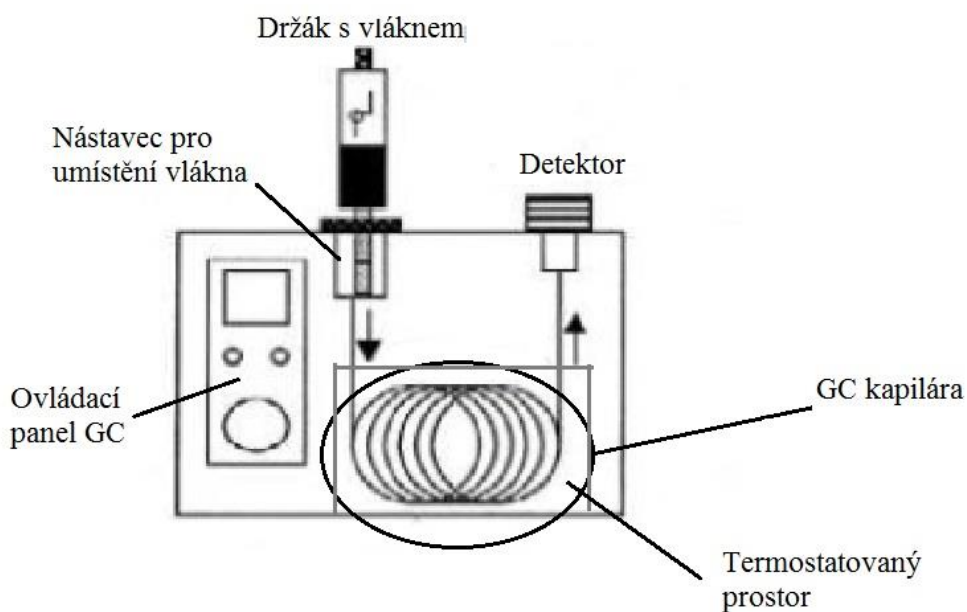
Třetím typem extrakční metody je membránově chráněná extrakce (je zobrazena na obrázku 7c). Výhodou této extrakční metody je to, že vlákno je membránou chráněno před poškozením. Tato metoda však není vhodná pro všechny analyty. Její užití je možné výhradně pro stanovení analytů, které mají nízkou těkavost. Na druhou stranu lze touto metodou extrahovat ty analyty, které jsou pro metodu headspace příliš málo těkavé. Použití membrány má další výhodu v tom, že pokud je zvolen vhodný materiál, lze zvýšit citlivost extrakčního procesu [53].

Nevýhodou této extrakční metody je pomalejší kinetika než u dvou výše zmíněných extrakčních metod. Tato skutečnost je dána tím, že analyt musí nejprve projít přes membránu. Teprve v okamžiku, kdy analyt projde přes membránu, je navázán na stacionární fázi. Tento čas však lze zkrátit použitím tenčí membrány a zvýšením teploty. Naopak zvýšením tloušťky membrány lze zpomalit celý proces extrakce [53].

1.12 Použití SPME metody

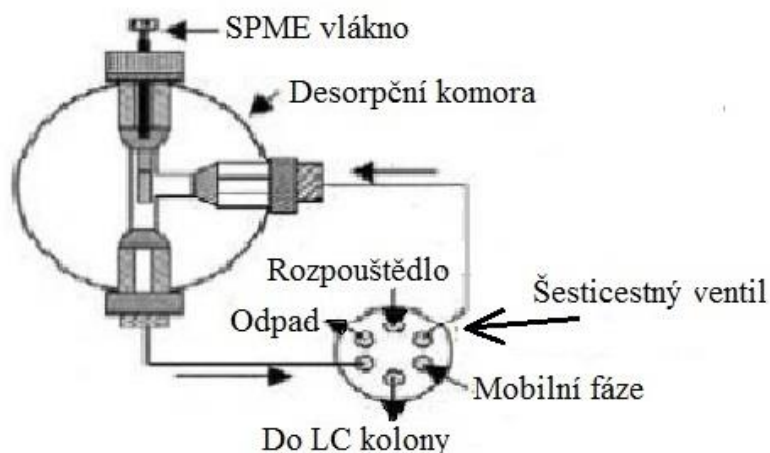
Metoda SPME ve spojení s plynovou chromatografií se v běžné instrumentální praxi používá velmi často. Výhodou této metody je rychlá desorpce zkoumaného analytu z vlákna do nosného plynu. Tato skutečnost je dána tím, že v celém procesu se nevyskytuje rozpouštědlo, jehož přítomnost by celý proces prodlužovala. Rovněž je za rychlou desorpci skutečnost, že tuhá fáze je tvořena pouze tenkou vrstvou, kterou je možné desorbovat při vysoké teplotě. Právě vysoká teplota má za následek rychlou desorpci [55].

Princip metody je zobrazen na obrázku níže (obrázek 8). Během samotné desorpce se vlákno nachází uvnitř vyhřívané části křemenné kapiláry. Vzdálenost mezi vlákem a stěnou kapiláry je přitom velmi malá - pouhých 0,15 mm. Právě tato těsná vzdálenost je zárukou toho, že dojde k efektivnímu přenosu tepla z topného tělesa na vlákno a zároveň tato malá vzdálenost zajišťuje vysokou lineární rychlost toku nosného plynu [48].



Obrázek 8 Schéma metody SPME-GC

Druhou možností je využití metody SPME ve spojení s kapalinovou chromatografií. Tato metoda je používána v případech, kdy jsou analyty málo těkavé, případně vykazují termickou nestabilitu. V případě této metody je analyt zaváděn do komory prostřednictvím vlákna, skrze které protéká mobilní fáze. V případě nutnosti je možné použít desorpční rozpouštědlo obsažené v mobilní fázi. Princip metody je zobrazen na obrázku 9 [55].



Obrázek 9 Schéma HPLC při aplikaci desorpční kapaliny

1.13 Separační metoda plynové chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda určená k oddělení a stanovení plynů, kapalin, ale i tuhých látek. Principem metody je dělení předmětných složek mezi dvě fáze. Jako stacionární fáze může sloužit tuhá látka, jako je např. aktivní uhlí, silikagel, oxid hlinitý nebo různé polymery. Stacionární fází však může být i vysokovroucí kapalina [57].

Mobilní fází je myšlen nosný plyn. Tento plyn unáší analyty kolonou k detektoru. Proto jsou na nosné plyny kladeny určité požadavky. Jedná se zejména o nízkou viskozitu, malou reaktivitu a vysokou čistotu [57].

Nosným plymem může být například argon, helium, dusík nebo vodík. V případě mobilní fáze je kritické správné nastavení průtoku. Optimalizace průtoku nosného plynu a zejména teplotní program jsou parametry důležité pro správné dělení látek na koloně – cílem je dosáhnout nejmenšího možného rozšíření zón separovaných látek. Výše zmíněné zóny a jejich rozšiřování je způsobeno čtyřmi základními procesy. Jsou to [57]:

- vířivá difuze - při tomto ději dochází k tomu, že molekuly musí urazit velkou vzdálenost,
- podélná molekulová difuze – v tomto případě putují molekuly z místa s vyšší koncentrací do místa s nižší koncentrací,
- odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi – dochází k tomu, že různé molekuly difundují různě hluboko do stacionární fáze,
- odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi – rychlostní profil mobilní fáze je parabolický.

Princip metody SPME-GC je velmi jednoduchý. Spočívá v tom, že pomocí metody SPME jsou analyty extrahovány ze vzorku. Následně jsou tyto analyty přeneseny do nástřikové komory chromatografu. Zde dojde k odpaření vzorku, který je následně unášen nosným plynem

do kolony. Na začátku kolony chromatografu dojde k adsorpci analytů na stacionární fázi a následně pak k desorpci čerstvým nosným plynem. Tento proces se pak opakuje až do doby, kdy je vzorek rozdělen a jednotlivé složky. Každá složka vzorku je pak kolonou unášena rychlostí, která je závislá na distribuční konstantě dané složky. Tato konstanta je určena rovnicí (5) [51, 57]:

$$K_D = \frac{C_S}{C_m} \quad (5)$$

Kde: K_D – distribuční konstanta dané složky,
 C_S – rovnovážná koncentrace ve stacionární fázi,
 C_m – rovnovážná koncentrace v mobilní fázi.

Jednotlivé složky jsou pak následně v koloně unášeny nosným plynem v pořadí, které odpovídá pořadí jejich distribučních konstant. V tomto pořadí jsou odnášeny až k detektoru. V detektoru jsou tyto složky registrovány. Identifikace látek pak probíhá tak, že v koloně dojde k rozdělení vzorku na n -látek a výsledný chromatogram obsahuje n -píků. Poloha daného píku pak identifikuje danou látku a plocha píku její obsah. Kombinace metody SPME a GC je velmi efektivní nástroj pro analytickou praxi, který kombinuje výhodou obou metod.

1.14 Srovnání metody SPME a dalších vybraných metod

Metoda SPME je metoda poměrně nová. Nicméně, velmi rychle se stala metodou hojně používanou a dnes představuje zcela plnohodnotnou alternativu k již dříve zavedeným a osvědčeným analytickým metodám. Srovnání bude vztaženo zejména k metodám mikro-SPE a SBSE (stir bar sorptive extraction).

Metoda SPME je unikátní zejména v tom, že není potřeba používat rozpouštědla a zejména proto, že k extrakci a zkoncentrování dochází během jednoho kroku. Mezi další výhody patří krátká doba zpracování vzorku, jednoduchost, možnost opakovaní použití vláken a výběr velkého množství stacionárních fází. Výše uvedené dělá z metody SPME snadno použitelnou metodu a poskytuje jí řadu výhod před ostatními metodami. Využití metody SPME je tak opravdu velmi široké. Pomocí této metody lze zpracovat vzorky odpadních vod, vzorky vzduchu, tuhé vzorky a mnoho dalšího [55, 58].

Problém při SPME, na který pravděpodobně dříve či později narazí každý uživatel této metody, je kalibrace. Problém je, že při SPME nedochází k extrakci všech analytů ze vzorků a ani k extrakci kvantitativní. Z tohoto důvodu byla vytvořena kalibrace, kalibrační postup, v čisté vodě. Protože se vlákno při SPME dostává do interakce s každou fází systému, na extrakci má tak vliv i matrice u heterogenních vzorků. Právě proto je přidáván kalibrační

roztok, případně značené izotopy. Přídavek izotopicky značených standardů je drahý, proto nebývá až tak častý [59].

1.14.1 Srovnání metody SPME a metody SPE

Metoda mikroextrakce tuhou fází se dá označit za jinou formu metody extrakce tuhou fází (SPE, případně mikro-SPE). Jedná se však o metody poměrně odlišné. V následujícím textu budou osvětleny nejvýznamnější rozdíly mezi oběma metodami.

První z nich je, že metoda extrakce tuhou fází (SPE) má tři po sobě jdoucí kroky. Prvním je, že vzorek musí projít přes sorbent sorbent. V tomto okamžiku dochází k tomu, že analyty, které jsou obsažené ve vzorku, jsou navázané na tento sorbent. Druhý krok pak spočívá v tom, že dochází k promývání. Tímto promýváním je dosaženo selektivního odstranění nežádoucích interferentů. To znamená, že na sorbentu z prvního kroku zůstanou jen ty analyty, které jsou z pohledu stanovení důležité. Poslední krok pak představuje samotná desorpce analytů [53].

Metoda SPME se od metody SPE odlišuje tedy tím, že využívá rovnovážné extrakce a selektivní desorpce z matrice na stacionární fázi vlákna. Jedná se o metodu dvoukrokovou. V prvním kroku je vlákno vystaveno vzorku. Analyty z tohoto vzorku jsou následně selektivně extrahovány. Druhý krok pak spočívá v tom, že analyty, které byly vyextrahované v prvním kroku, jsou desorbované do samotného analytického přístroje [53].

1.14.2 Srovnání metody SPME a SBSE

Metoda SBSE je metoda, která využívá sorpční extrakci, kdy jsou analyty extrahovány do polymerní fáze umístěné ve skleněné tyčince, která zároveň slouží jako míchadlo. Společně s metodou SPME má metoda SBSE to, že probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je extrakce a druhým stejně jako v případě SPME desorpce [60].

Obě metody mají společné, že se jedná o metody, které mají velmi nízkou spotřebu rozpouštědel, navíc příprava vzorku probíhá ve velmi krátkém čase. Rozdíl metod je zejména v objemu vrstvy sorbentu na vlákne v případě metody SPME a na magnetickém míchadle v případě metody SBSE. Zatímco tato vrstva (PDMS) je v případě metody SPME na vlákne silná jen 7 maximálně 100 mikrometrů, tak v případě metody SBSE je vrstva (PDMS) na magnetickém míchadle silná 0,5 mm. Z uvedených informací je zřejmé, že v případě metody SPME probíhá desorpce analytů ze vzorku výrazně rychleji [60].

Ke zjištění, která z metod je výhodnější a lepší, provedl Heiden a kol., rozsáhlé srovnání obou metod. To spočívalo v tom, že pomocí obou výše uvedených metod byly stanoveny polyaromatické uhlovodíky. Autoři zjistili, že hlavní rozdíl spočívá zejména v detekčních

limitech a v citlivosti. Výsledky tohoto pokusu jsou sumarizované v tabulce 5. Jak je z tabulky patrné, v případě stanovení polyaromatických uhlovodíků je lepší metoda SPME [60].

Tabulka 5 Srovnání citlivosti a detekčních limitů pro metody SPME a SBSE [62]

Látka	SPME		SBSE	
	Citlivost [plocha/ppt]	Detekční limit [ng/kg]	Citlivost [plocha/ppt]	Detekční limit [ng/kg]
Naftalen	638	0,5	9	83,8
Acenaftalen	699	0,1	9	16,5
Acenaften	466	0,6	18	5,1
Fluoren	562	0,1	21	11,6
Fenantren	792	0,9	34	4,2
Antracen	836	0,2	31	1,1
Fluoranten	1091	0,7	51	1,7
Pyren	1122	1,3	55	3,6
Bez[a]antracen	1026	1,2	32	0,3
Chrysen	1031	1,8	44	1,4
Benzo[b]fluoranten	1030	0,5	40	2,3
Benzo[k]fluoranten	1123	0,1	43	5,1
Benzo[a]pyren	931	0,5	28	6,0
Indeno[1,2,3]pyren	538	0,2	23	7,0
Dibenzo[a,h]antracen	481	0,3	16	2,6
Benzo[g,h,i]perylene	577	0,2	26	6,3

Druhým srovnávacím parametrem k porovnání obou metod byla výtěžnost analytu. Tyto výsledky jsou zobrazeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Porovnání výtěžnosti analytu mezi metodami SPME a SBSE [62]

Látka	Výtěžnost SPME [%]	Výtěžnost SBSE [%]
Naftalen	0,11	0,83
Acenaftylen	0,35	0,98
Acenaften	0,34	0,95
Fluoren	0,48	0,97
Fenantren	0,64	0,99
Antracen	0,63	0,99
Fluoranten	0,90	1,00
Pyren	0,82	0,99
Bez[a]antracen	0,97	1,00
Chrysen	0,98	1,00
Benzo[b]fluoranten	0,97	1,00
Benzo[k]fluoranten	0,99	1,00
Benzo[a]pyren	0,99	1,00
Indeno[1,2,3]pyren	1,00	1,00
Dibenzo[a,h]antracen	1,00	1,00
Benzo[g,h,i]perylene	1,00	1,00

1.15 Využití metody SPME v analýze těkavých látek chmele

Těkavé organické látky unikající z výroby piva byly pomocí HS-SPME stanovovány a blíže popsány ve článku od Adama Petrowicze. Pro optimalizaci podmínek extrakce byla použita vlákna z různým typem polymeru a různou tloušťkou. Konkrétní údaje uvádí tabulka 7.

Tabulka 7 Charakteristika SPME vláken použitých ve studii A. Petrowicze [61]

Typ polymeru	Tloušťka polymeru [μm]	Doporučený teplotní rozsah [$^{\circ}\text{C}$]
PDMS	100	200-280
CAR/PDMS	75	250-310
CAR/PDMS	85	250-310
PEG	60	200-250
PDMS/DVB	65	200-270
PEG/DVB	70	200-250
DVB/CAR/PDMS	50/30	230-270

Z uvedených vláken uvedených v tabulce 7 byla vybrána tři vlákna, která vykazovala nejlepší sorpční vlastnosti. Tyto vlastnosti byly hodnoceny podle počtu piků nalezených po desorpci s následnou separací a detekcí na GC-MS. Největší počet látek ze vzorku sorbovala vlákna DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , PDMS/DVB 65 μm a PDMS 100 μm . Rozdíl v počtu nalezených látek je autorem zdůvodněn rozdílnou polaritou polymeru na vlákně. Protože vzorek obsahoval větší množství látek polárních, došlo k lepší sorpci na vlákno s polárním polymerem DVB/CAR/PDMS 50/30 μm [61].

Autoři Krofta a Čepička zjistili, že při teplotě 250 °C trvala desorpce všech analytů pouze 1,5 minuty, a to u všech vláken zmíněných v tabulce. Dále autoři zjišťovali, jaký vliv má navážka vzorku. Sledována tedy byla odezva na detektoru při navážkách 0,1 g, 0,2 g a 0,3 g chmele. Vzorek chmele byl vždy stejně namletý, aby byla zajištěna stejná homogenita vzorku mezi jednotlivými experimenty. Sorpce probíhala po dobu 60 minut při teplotě 50 °C. Přitom byl sledován vliv na následující složky silic: myrcen, β -karyofylen, α -humulen, β -farnesen a 2-undekanon. Předpoklad byl, že množství analytu, které se zachytí na vlákně, bude přímo úměrné objemu plynné fáze. Jinými slovy, jak autoři uvádějí, mělo by to znamenat, že s rostoucí navážkou by došlo k účinnější sorpci analytu. Tato domněnka však nebyla autory potvrzena. Pouze v případě vlákna PDMS 100 μm u myrcenu, α -humulenu a β -farnesenu došlo při navážce 0,3 g ke zvýšení účinnosti sorpce. V případě jiných vláken se ukázalo, že množství zachycených analytů je na množství navážek nezávislé [62].

Autoři dále zdůrazňují, že výhodou metody SPME je, že není nutné provádět pro zjištění složení chmelových silic mletí chmelové hlávky. Speciálně v případě metody HS-SPME lze dokonce provádět analýzu nesusušených hlávek chmele. Zajímavé bylo i sledování rychlosti sorpce jednotlivých složek na SPME vlákna v čase 30 minut, 1 hodina, 2 hodiny, 3 hodiny a 4 hodiny. Teplota byla nastavena na 50 °C. Výsledky jsou sumarizovány níže (tabulka 8). Z tabulky 8 je patrné, že například množství myrcenu, který je zachycen na vlákně, se v závislosti na délce sorpce nemění. Studie rychlosti sorpce dále zjistila, že množství sorbovaných vysoko vřoucích terpenů má s časem silně progresivní charakter. Jak je patrné z tabulky 8, chromatografická plocha s časem roste. Autoři dále uvádějí, že v případě nízko vřoucích látek se snižuje jejich zastoupení, zatímco množství těkavých látek stoupá [62].

Tabulka 8 Rychlost sorpce na PDSM/DVB 65 μm vlákno při 50 °C [62]

Složka	Doba sorpce							
	30 minut		1 hodina		2 hodiny		4 hodiny	
	Plocha píku	Obsah složky [% rel.]	Plocha píku	Obsah složky [% rel.]	Plocha píku	Obsah složky [% rel.]	Plocha píku	Obsah složky [% rel.]
α -pinen	64,40	0,09	55,70	0,09	52,60	0,06	53,10	0,05
β -pinen	416	0,57	343	0,53	339	0,37	335	0,34
myrcen	21630	37,00	19920	30,2	19575	21,20	18194	18,6
methylheptanoát	271	0,37	218	0,33	178	0,19	142	0,15
limonen	603	0,82	433	0,66	454	0,49	422	0,43
2-nonanon	341	0,46	266	0,42	242	0,26	234	0,24
linalool	487	0,66	372	0,57	363	0,39	366	0,37
methyloktanoát	184	0,25	146	0,22	132	0,14	121	0,12
2-dekanon	255	0,35	217	0,30	221	0,24	219	0,22
methylnonanoát	154	0,21	146	0,22	145,50	0,16	146	0,15
geraniol	96,40	0,13	78,00	0,12	141	0,15	155	0,16
2-undekanon	1082	1,47	997	1,27	1237	1,34	1282	1,31
methyl-4-decenoát	1104	1,50	1116	1,54	1407	1,52	1569	1,60
2-dodekanon	104	0,14	123	0,19	196	0,21	252	0,26
β -karyofyllen	4385	6,52	4731	6,85	8217	8,90	8320	8,49
α -humulen	13859	21,60	14543	22,40	26187	28,40	26208	26,80
β -farnesen	6803	9,30	10726	15,02	14289	15,50	16271	16,60
γ -muurolen	519	0,70	591	0,90	1389	1,51	1543	1,57
β -selinen	351	0,48	394	0,62	628	0,68	725	0,74
δ -kadinen	1156	1,57	965	1,48	2171	2,35	2578	2,63
karyofyllen oxid	155	0,21	184	0,28	302	0,33	503	0,51

Tabulka 9 Porovnání složení chmelové silice Žateckého poloraného červeňáku [62]

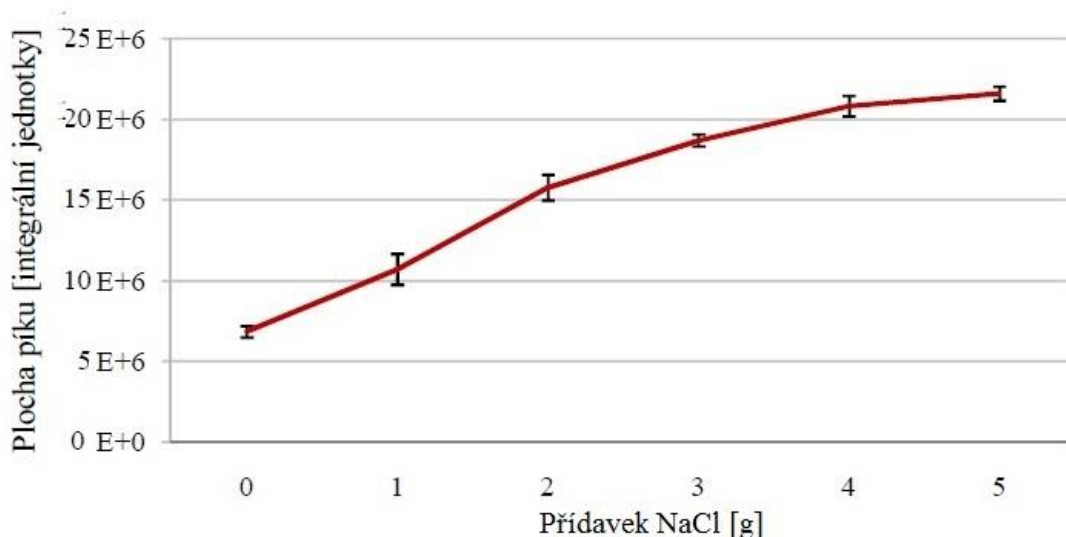
Složka	Destilace [%]	PDMS/DVB 65 μm [%]	PA 85 μm [%]	PDMS 100 μm [%]
α -pinen	0,05	0,06	0,08	0,13
β -pinen	0,36	0,37	0,54	0,68
myrcen	16,80	21,2	27,40	26,0
methylheptanoát	0,18	0,19	0,21	0,17
limonen	0,32	0,49	0,53	0,41
2-nonanon	0,25	0,26	0,46	0,19
linalool	0,39	0,39	0,89	0,24
methyloktanoát	0,15	0,14	0,15	0,11
2-dekanon	0,37	0,24	0,28	0,19
methylnonanoát	0,19	0,16	0,09	0,12
geraniol	0,14	0,15	0,28	0,04
2-undekanon	1,97	1,34	1,38	0,90
methyl-4-decenoát	1,86	1,52	1,81	1,27
2-dodekanon	0,29	0,21	0,23	0,16
β -karyofyllen	7,77	8,79	6,33	8,07
α -humulen	25,18	28,40	18,77	25,88
β -farnesen	17,48	15,48	13,75	16,72
γ -muurolen	0,86	1,19	0,69	1,08
β -selinen	0,52	0,68	0,48	0,57
δ -kadinen	1,54	2,35	1,32	1,62
karyofyllen oxid	0,95	0,33	0,71	0,56

Tabulka 9 uvádí složení chmelových silic Žateckého poloraného červeňáku. Ke stanovení autoři použili destilační metodu a HS-SPME metodu. Porovnání výsledků bylo provedeno statistickými metodami. Z tabulky vyplývá, že metoda HS-SPME se podle autorů také ukázala jako velmi vhodná pro stanovení složek chmelových silic.

Porovnání extrakce na tuhé vlákno provedli Tobias M. Richter a kol. Pro extrakci VOC zvolili čtyři metody. První metodou byla extrakce do rozpouštědla s následným odpařováním, která sice dosáhla největší plochy píků, ale pouze proto, že stanovení bylo prováděno v pivu a společně s rozpouštědlem se také odpařovaly alkoholy. Další tři metody SBSE, HSSE a SPME alkoholy extrahovali mnohem méně, proto bylo dosaženo menší plochy píků, ale přitom poslední tři jmenované způsoby extrakce vykazovali vyšší citlivost právě na těkavé organické látky. Jako nejúčinnější metodu extrakce autoři uvádějí metodu SBSE, případně HSSE [63].

Více než 45 těkavých látek chmele bylo nalezeno v každém ze tří zkoumaných druhů chmele, jak uvádí článek autorů Laura Vázquez-Araújo a kol. V jejich práci je provedeno porovnání HS-SPME a destilace těkavých látek chmele za účelem zlepšení chuťových vlastností potravin, zejména piva. V jejich práci byly použity tři odrůdy chmele, u kterých byl stanoven obsah těkavých látek výše uvedenými metodami. Ve článku je uvedeno, že obě metody jsou stejně přesné, přesto HS-SPME má výhodu. Ta spočívá v tom, že při destilačním stanovení může dojít k tepelnému rozkladu některých těkavých látek, ve článku je uvedeno, že se jedná především o látku myrcen. Dále je uvedeno, že HS-SPME je metoda stanovení rychlejší než druhá jmenovaná [64].

Extrakci těkavých látek na tuhé vlákno lze podpořit také přidavkem NaCl do roztoku vzorku [65]. Dojde tak, ke zvýšení iontové síly roztoku a tím k lepšímu uvolnění těkavých látek z matrice vzorku. Bylo prokázáno, že přídavek NaCl vede k účinnější extrakci, avšak nadbytečné přídavky soli do roztoku množství extrahovaných látek dále neovlivní. Závislost přídavku soli lze vidět na níže uvedeném obrázku 10.



Obrázek 10 Vliv přídavku NaCl na SPME

SPME metodu k analýze těkavých látek chmele využili i autoři Olšovská a kol., Autoři použili metodu SPME a analýzu těkavých látek pro chemotaxonomii. Falšování chmelů, respektive vydávání jedné odrůdy za jinou, většinou dražší a kvalitnější odrůdu, je poměrně běžný jev. Chemotaxonomie přitom nabízí možnost rychlé, relativně levné analýzy, na základě které je možné jednoznačně identifikovat odrůdu chmele [66].

I řada dalších autorů a studií potvrdila, že metoda mikroextrakce tuhou fází je velmi vhodná pro stanovení těkavých látek chmele. Její hlavní výhodou podle studií je, že je velmi levná, efektivní a lze ji použít k izolaci zakoncentrovaných těkavých látek [42, 67].

Autoři uvádějí, že hlavní předností SPME metod je zejména [68]:

- Při procesu extrakce není používáno žádné rozpouštědlo. Separace je tak šetrnější k životnímu prostředí.
- Jedná se o velmi malé zařízení, které umožňuje analyzovat i velmi malé vzorky.
- Citlivosti a detekční limity metody SPME jsou srovnatelné s jinými metodami, které rovněž využívají extrakci.
- Celý proces analýzy vzorku je mnohem rychlejší, protože několik operací je spojeno do jednoho kroku (vzorkování, extrakce, zakoncentrování a dávkování).

Autoři dále uvádějí, že metoda SPME může být použita jednak pro orientační stanovení, ale pokud je metoda řádně kalibrována a použit interní standard, může být využita i pro velmi přesná analytická stanovení [68].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Vzorky a chemikálie

Pro analýzy byly použity odrůdy chmele ve formě chmelových granulí typ 90 (Brelex, Praha, ČR) níže uvedené v tabulce 10.

Tabulka 10 Použité odrůdy chmele

chmelová odrůda	ročník	velikost balení [g]	země původu
Kazbek	2016	200	Česká republika
Amariillo	2015	100	USA
Mandarina	2016	100	Německo
Cascade	2015	100	USA
Simcoe	2015	100	Německo

Pro výpočet retenčních indexů byla homologická řada n-alkanů C6-C40 (Sigma Aldrich, Praha, ČR). Dále byla používána destilovaná voda z centrálního rozvodu Univerzity Pardubice.

2.2 Instrumentace

Jako vodní lázeň byly použity dva oběhové termostaty Julabo MP-5P (Julabo Labortechnik, Seelbach, Německo) s teplotním rozsahem +20 °C až +110 °C a druhým Julabo F 12 MV (Julabo Labortechnik, Seelbach, Německo) mající širší teplotní rozsah -20 °C až +100°C. Pro drcení chmelových granulí byla použita keramická třecí miska s tlučkem. Podrcené vzorky byly váženy na analytických vahách Kern ABT 220-4M (Kern&Sohn GmbH, Balingen, Německo). Vzorky byly navažovány do vzorkovacích nádobek o objemu 20 ml uzavíratelné víčkem se silikonovým septem Supelco (Bellefonte, PA, USA).

K sorpci bylo použito černé křemenné SPME vlákno 75 μm CAR/PDMS, červené křemenné SPME vlákno 100 μm PDMS a šedé křemenné SPME vlákno 50 μm /30 μm DVB/CAR/PDMS Stable Flex. Vlákna byla umístěna v držáku pro manuální vzorkování. Všechny čtyři použité komponenty od Supelco (Bellefonte, PA, USA). Vlákna byla před každým měřením čištěna v souladu s příloženým manuálem od výrobce. Proces probíhal v přístroji na čištění Hamiltonových stříkaček při 211 °C v přístroji Hamilton Syringe Cleaner (Reno, NV, USA).

Pro desorpci bylo vlákno umístěno do plynového chromatografu GC-17A s hmotnostní detekcí QP5050A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), nosný plyn u metody GC-MS bylo ultra čisté helium (Linde Gas, Praha, ČR). Vyhodnocení spekter z hlediska velikosti a četnosti píků bylo

prováděno v programu GCMS Solution (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). MS spektra byla porovnávána s knihovnamí spekter NIST, WILEY a FFNSC. Současně s použitím GC-MS byly vzorky desorbovány také metodou GC spojenou s FID detektorem. Plynový chromatograf Hewlett-Packard 5890 (Avondale, PA, USA) používal jako nosný plyn dusík z centrálního rozvodu Univerzity Pardubice. K FID detektoru byl připojen vodík z tlakové lahve (Linde Gas, Praha, ČR) a vzduch z centrálního rozvodu Univerzity Pardubice.

2.3 Pracovní postupy

Do vzorkovací nádobky bylo na analytických vahách naváženo 550 mg podrcené homogenní směsi chmele. Nádobka opatřená neporušeným septem byla uzavřena víčkem. Krycí jehlou vlákna bylo septum propíchnuto a následným stlačením pístu došlo k vysunutí vlákna do headspace prostoru nad vzorkem. Nádobka se vzorkem byla neprodleně umístěna do první vodní lázně tak, aby se vzorek nacházel pod hladinou temperované kapaliny. Po uplynutí definované doby extrakce byla vzorkovací nádobka přemístěna do druhé vodní lázně, kde extrakce pokračovala při druhé nižší teplotě. Po uplynutí definované doby druhé extrakce bylo vlákno zpětným pohybem pístu zataženo do držáku a přeneseno do plynového chromatografu k desorpci.

Tabulka 11 Parametry extrakce na šedé vlákno

typ vlákna	teplota [°C]		doba extrakce [min]		navážka [mg]
	1. sorpce	2. sorpce	1. sorpce	2. sorpce	
šedé	90	30	41	14	550

Teplotní program pro GC-MS začínal při teplotě 55 °C, která byla udržována 3 minuty. Následoval růst teploty rychlostí 6 °C za minutu za konstantního tlaku 30 kPa na teplotu 300 °C, která byla držena 20 minut. Teplota nástřiku byla 250 °C a teplota iontového zdroje 230 °C. Kolona použitá k analýzám byla SLB-5ms o délce 30 m, průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Počáteční průtok nosného plynu byl 0,7 ml min⁻¹, lineární rychlost 30,6 cm s⁻¹. Dávkování bylo realizováno za použití děliče toku v rozmezí 1:5 až 1:50 podle potřeby.

Teplotní program GC-FID byl nastavený následovně: počáteční teplota kolony byla 250 °C a byla udržována 3 minuty. Po této době došlo k nárůstu teploty rychlostí 6 °C za minutu do teploty 250 °C, která byla udržována 10 minut. Teplota nástřiku a detektoru byla shodně 250 °C. Kolona použitá k analýzám je HP-5. Má délku 30 m a její průměr je 0,32 mm, tloušťka filmu kolony je 1 μm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Nosným plynem byl při GC-FID dusík, při přetlaku na hlavě kolony 30 kPa. Dávkování bylo realizováno děličem toku při konstantním poměru 1:3.

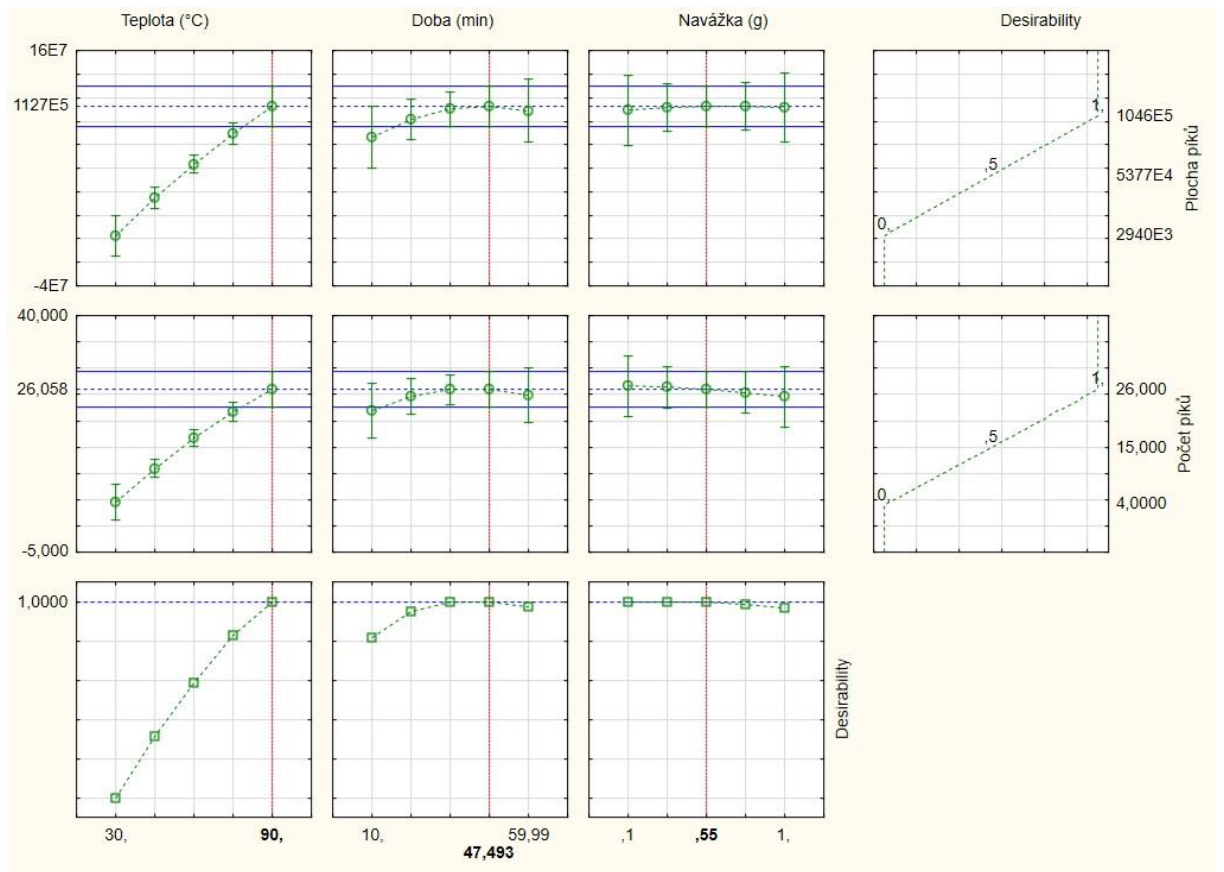
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace podmínek extrakce

Při měření vzorků chmele byly cíleně měněny tři parametry, které mají výrazný vliv na průběh extrakce. Prvním významným parametrem je teplota extrakce, druhým parametrem je doba extrakce, třetí parametr ovlivňující extrakci je navážka vzorku. Měřený vzorek chmele byl směsný vzorek složený z pěti druhů chmele. Každé odrůdy bylo naváženo stejné množství, jednalo se o druhy Mandarina, Kazbek, Simcoe, Cascade a Amarillo. Chromatografické podmínky byly převzaty z diplomové práce Dominiky Šuhajové [69].

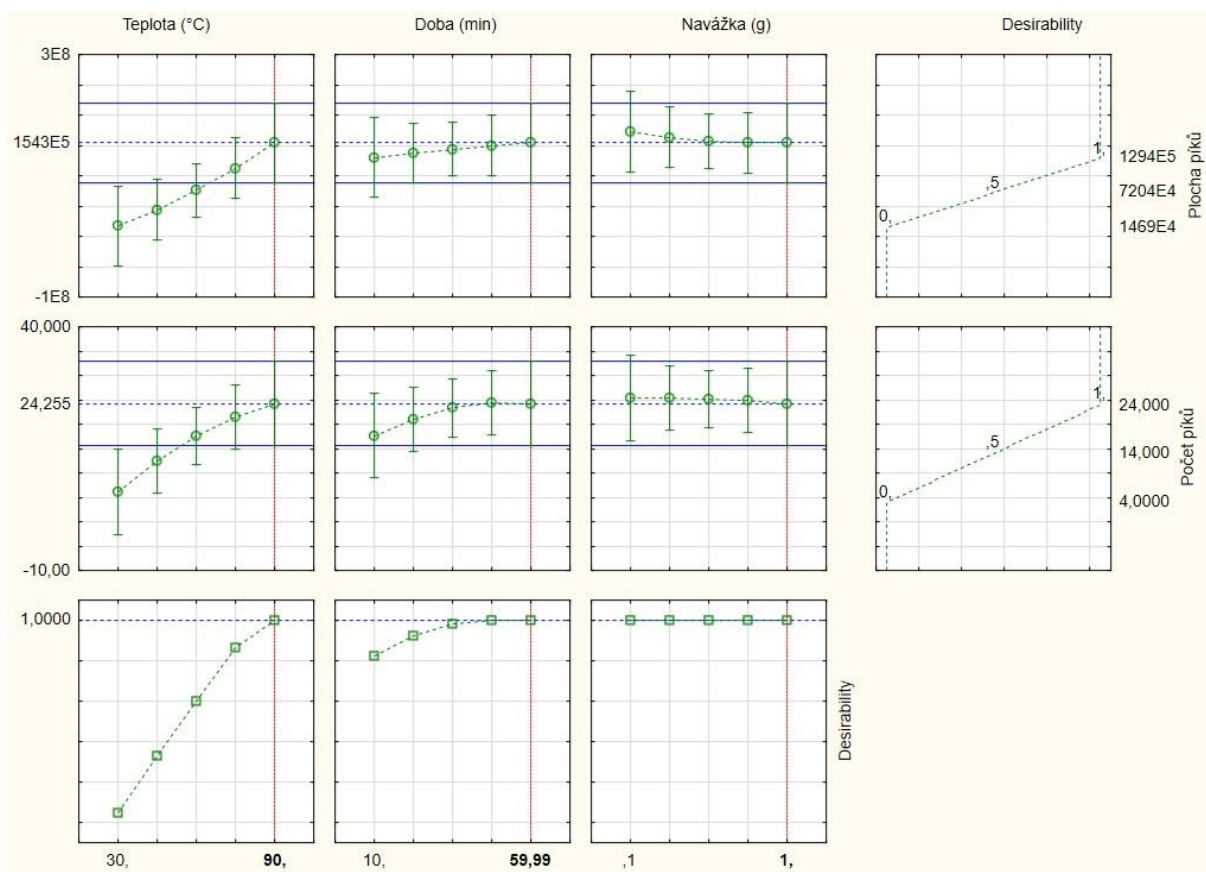
3.2 Optimalizace parametrů dle principu plánování experimentů

Pro určení optimálních podmínek extrakce byl použit statistický program STATISTICA Cz 12 (StatSoft Praha, ČR), ve kterém byl navržen experiment pomocí ortogonálního centrálního kompozitního plánování (CCD). Z plánování experimentu metodou CCD byly vygenerovány podmínky optimalizačních pokusů, viz tabulka I/1 v příloze. Bylo provedeno celkem 20 extrakcí, a to pro každé ze tří typů vláken. Následně byla sledována plocha píků a počet píků s cílem určit vhodnou navážku, kombinaci teplot a dobu extrakce pro navazující experimenty související s identifikací látek. Optimalizační experimenty probíhaly pouze v jedné vodní lázni při definované teplotě. Na obrázku 11 jsou uvedeny profily pro předpovědi a vhodnost pro šedé vlákno, na základě kterých byla určena ideální teplota extrakce 90 °C, doba extrakce 47,5 minuty a navážka 550 mg. Celkový vhodnostní profil pro šedé vlákno je uveden v příloze II obrázek II/1.



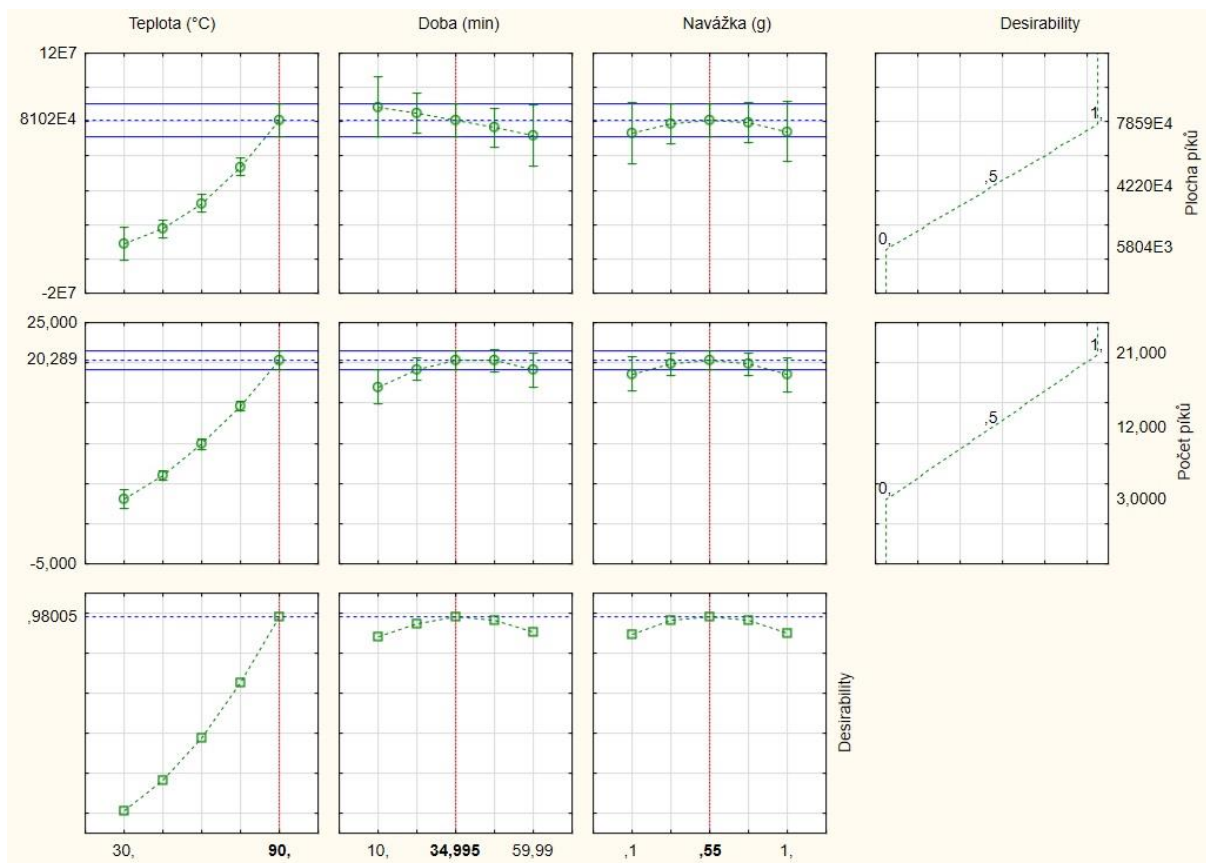
Obrázek 11 Odezvové profily pro předpovědi a vhodnost (šedé vlákno)

Na dalším obrázku 12 je uveden odezvoový profil pro předpovědi a vhodnost pro černé vlákno. Z obrázku lze odečíst ideální parametry extrakce. Teplota extrakce 90 °C, doba extrakce 60 minut a navážka 1000 mg vzorku. Celkový vhodnostní profil pro černé vlákno je uveden v příloze II obrázek II/2.



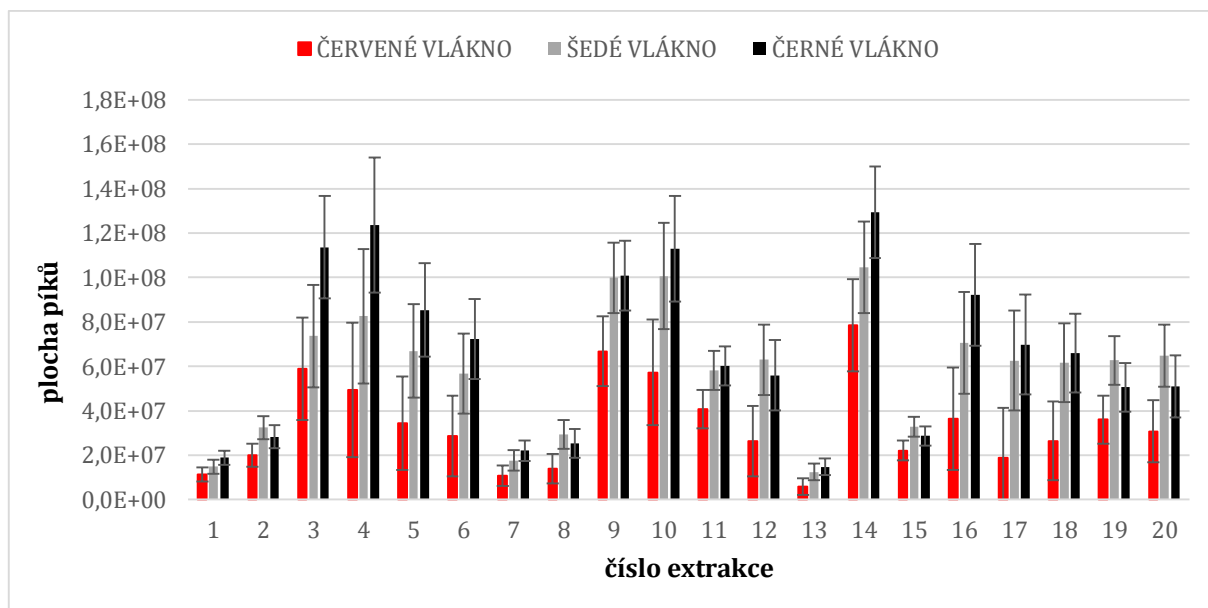
Obrázek 12 Odezvoové profily pro předpovědi a vhodnost (černé vlákno)

Odezvový profil pro předpovědi a vhodnost podmínek extrakce na červené vlákno je uveden v tabulce 13. Optimalizované extrakce podmínky jsou 90 °C, 35 minut a navážka 550 mg. Celkový vhodnostní profil pro černé vlákno je uveden v příloze II obrázek II/3.

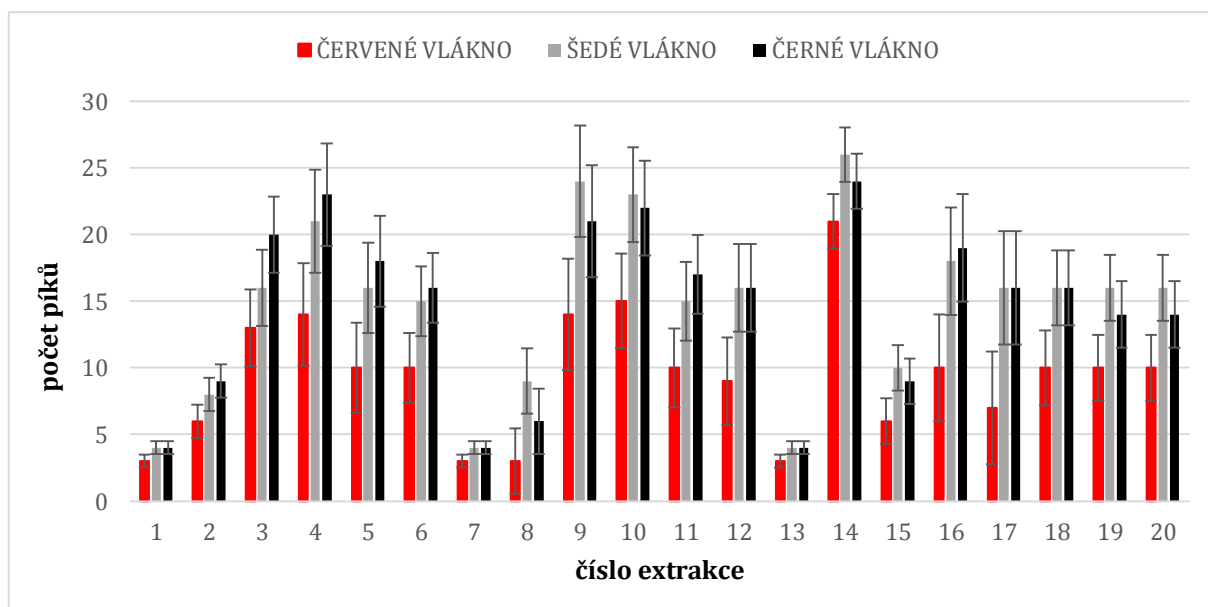


Obrázek 13 Odezvové profily pro předpovědi a vhodnost (červené vlákno)

Jak je vidět z obrázku 14 a především z plochy píků na obrázku 15, tak největší plochy bylo dosaženo při extrakci č. 14, která odpovídá navážce 550 mg. Tato navážka při teplotě 90 °C a době extrakce 35 minut vykazovala shodně pro všechna tři vlákna nejvyšší množství extrahovaných látek. Nejnižší navážka 0,10 g odpovídá skupině píků s číslem 17. Takto nejnižší navážka však nevykazuje nejnižší hodnoty, jelikož extrakce byla prováděna při 60 °C. Skupina píků s nejnižší plochou byla zjištěna při experimentu s číslem 13, kde teplota extrakce byla 30 °C, doba extrakce 35 minut a navážka činila 550 mg.



Obrázek 14 Plocha píků při porovnání vláken s odlišnými parametry extrakce (n = 3)

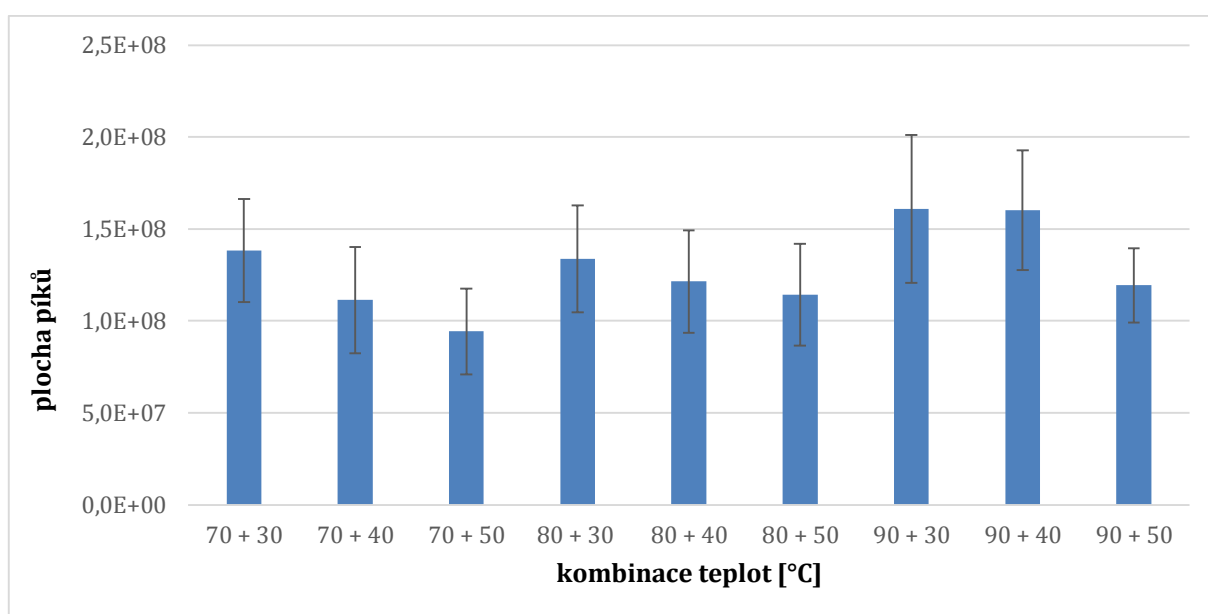


Obrázek 15 Počet píků při porovnání vláken s odlišnými parametry extrakce (n = 3)

Počet píků nalezených při desorbci látek je nejvyšší u extrakce číslo 14, tedy při navážce 550 mg, teplotě extrakce 90 °C a době extrakce trvající 35 minut. Tyto podmínky extrakce vykazovaly nejvyšší počet píků shodně pro všechny tři typy použitých vláken.

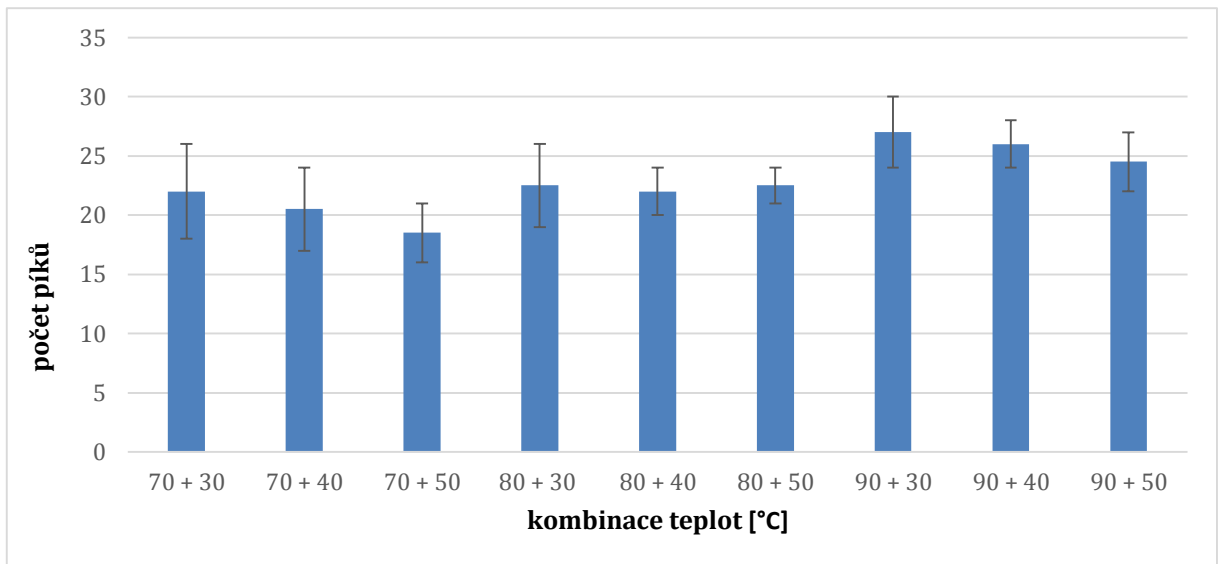
3.3 Možnost kombinace dvou teplot

Teplota má velký vliv na průběh extrakce. Protože extrakce byla při experimentu prováděna ve dvou krocích, bylo nutné určit optimální teploty pro jednotlivé termostaty. Předběžnými experimenty byly zkoušeny teploty 1. extrakce 70 °C, 80 °C a 90 °C a teploty 2. extrakce 30 °C, 40 °C a 50 °C. Uvedené teploty obou extrakcí byly následně kombinovány pro všechna tři vlákna.

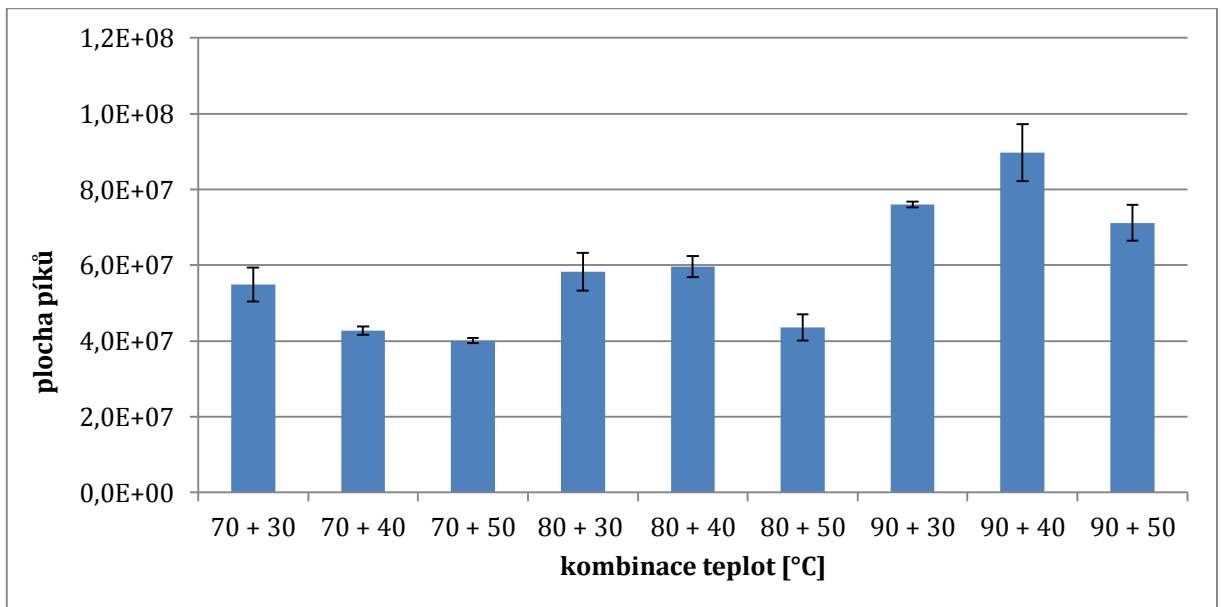


Obrázek 16 Kombinace teplot pro šedé vlákno dle plochy píků (n = 3)

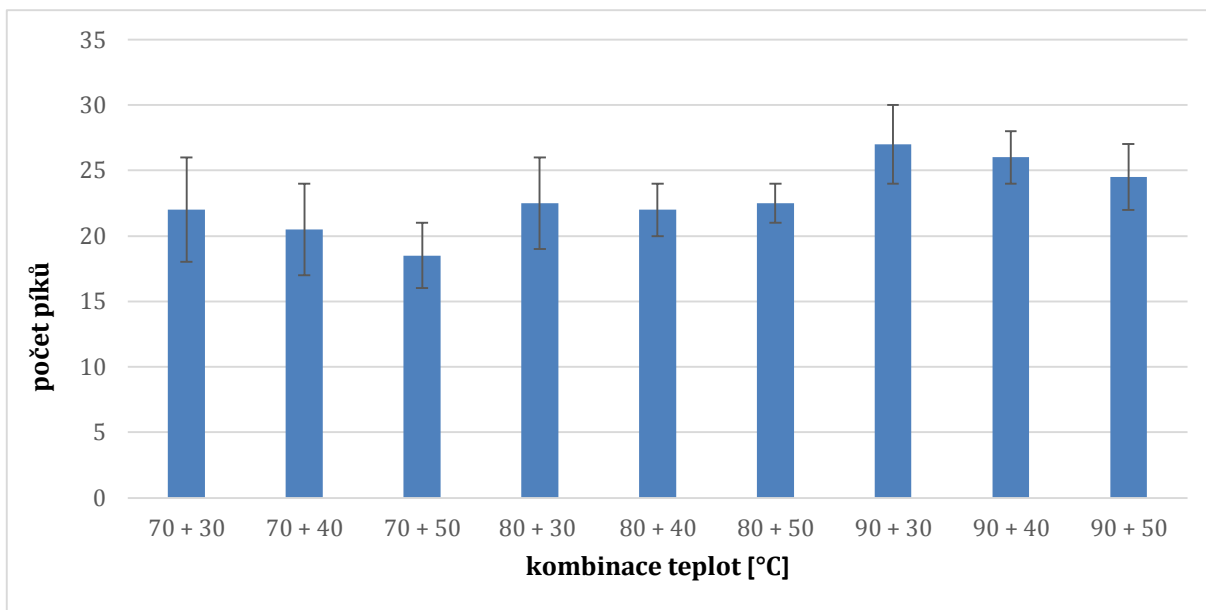
Z obrázku 16 je zřetelně vidět, že optimální teplota extrakce na šedé vlákno je při kombinaci 90 + 30 °C, případně 90 + 40 °C, při navážce 550 mg a době extrakce 22 + 22 minut. Tyto dvě kombinace teplot lze považovat za uvedených podmínek za optimální. Optimální podmínky lze odečíst také z obrázku 17, na kterém jsou uvedeny počty nalezených píků pro uvedené podmínky.



Obrázek 17 Kombinace teplot pro šedé vlákno dle plochy píků (n = 3)

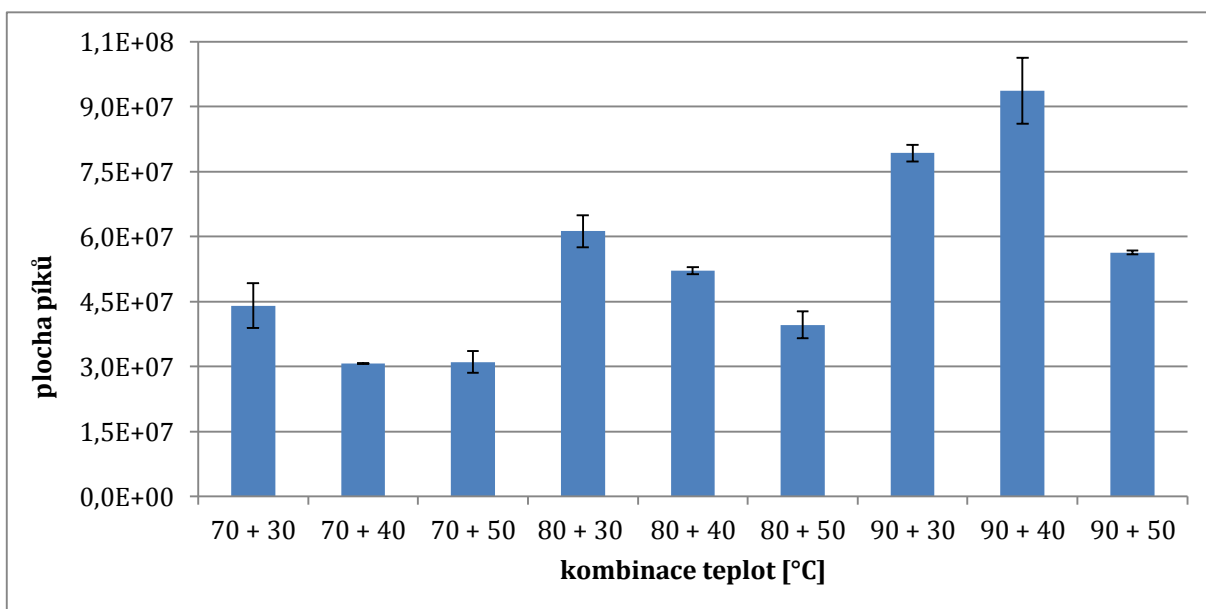


Obrázek 18 Kombinace teplot pro černé vlákno (n = 3)



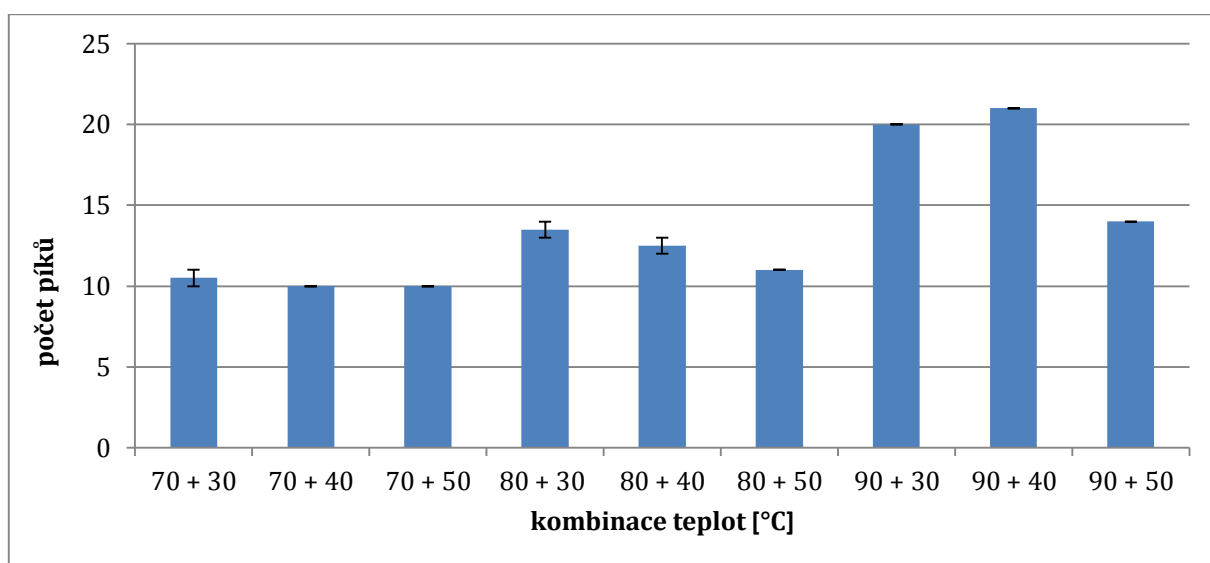
Obrázek 19 Kombinace teplot pro černé vlákno dle počtu píků (n = 3)

Na obrázku 18 je znázorněna plocha píků naměřená pro černé vlákno. Na obrázku 19 je znázorněn počet píků pro kombinaci teplot při extrakci na černé vlákno. Je jasně patrné, že optimální kombinace teplot je 90 °C u 1. extrakce a 40 °C u 2. extrakce.



Obrázek 20 Kombinace teplot pro červené vlákno (n = 3)

Obrázek 20 lze interpretovat tak, že čím vyšší je první extrakční teplota, tím vyšší plochy píků byla dosaženo. Nárůst druhé extrakční teploty snižuje účinnost předcházející extrakce. Pouze v případě kombinace teplot 90 + 40 °C bylo se zvyšující se druhou teplotou extrakce dosaženo vyšší plochy.



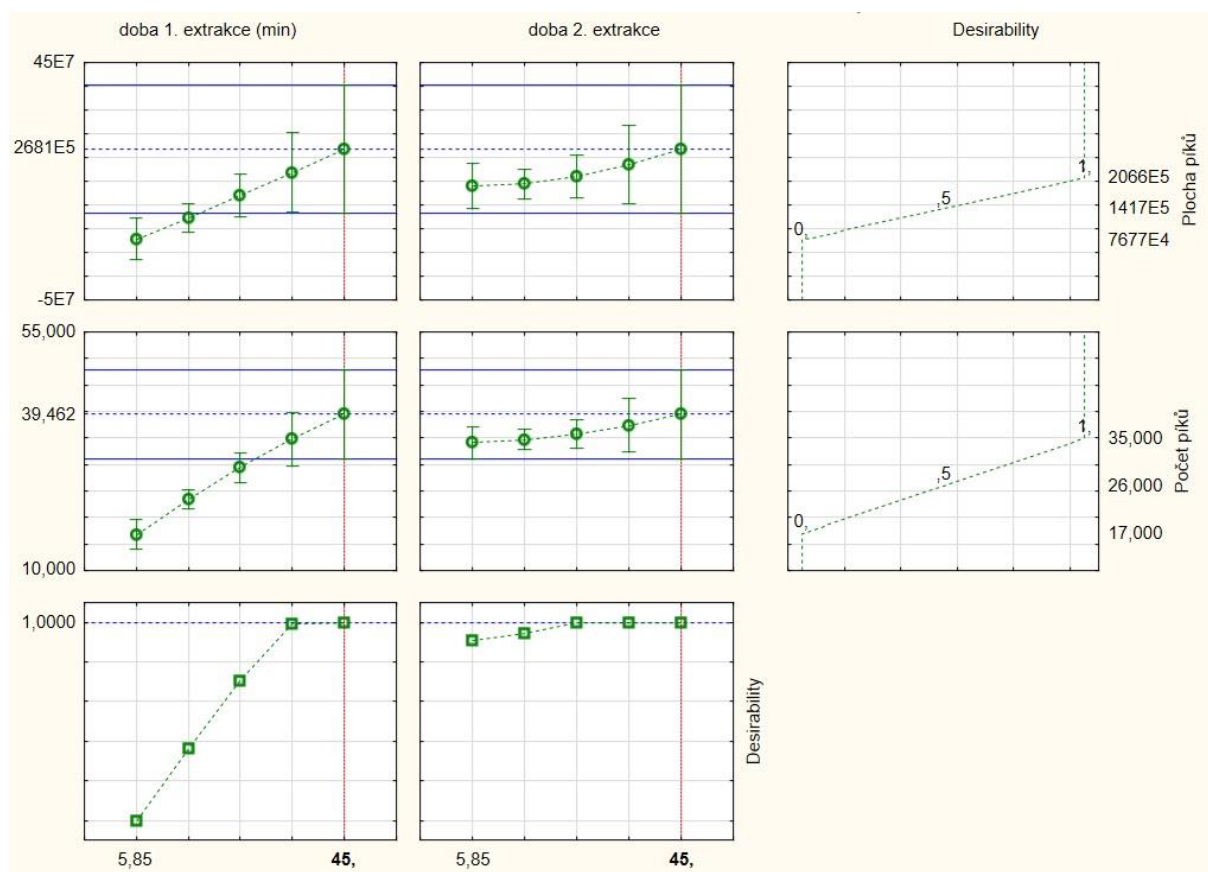
Obrázek 21 Kombinace teplot pro červené vlákno dle počtu píků (n = 3)

Největší počet píků byl nalezen při kombinaci teplot 90 + 40 °C, viz obrázek 21. Tato kombinace teplot je proto pro extrakci na červené vlákno nejvýhodnější.

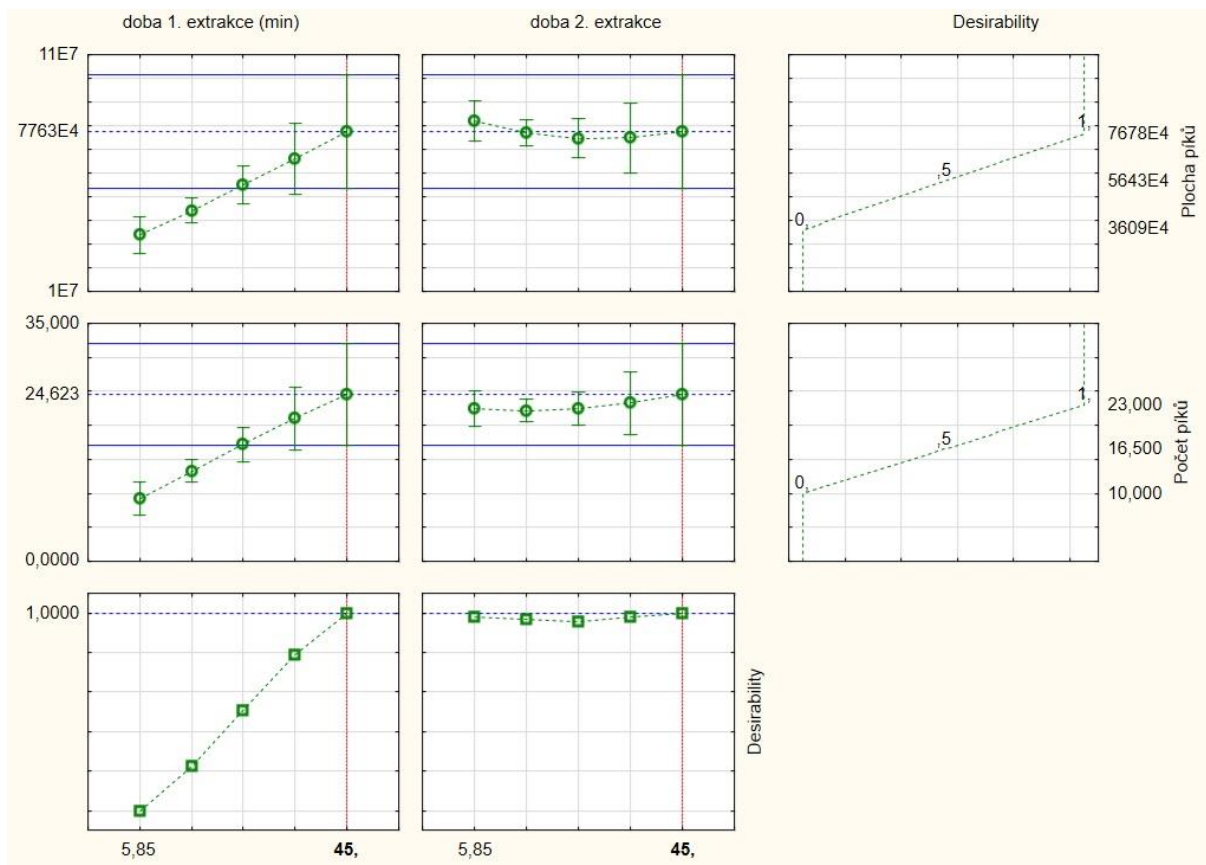
3.4 Optimalizace doby extrakce

Dalším důležitým faktorem je doba extrakce. Byla provedena série experimentů, kde byla testována jak celková doba extrakce, tak i podíl první doby extrakce na celkové době. Poměr první doby extrakce k celkové době byl určen CCD návrhem experimentu, tabulka s poměrem doby první extrakce k celkové době je uvedena v příloze I tabulka I/2. Účinnost extrakce byla zkoumána pomocí GC-MS, přičemž platí, že účinnější extrakce vedla k detekci vyššího počtu píků s větší celkovou plochou ve výsledném chromatogramu.

Pro extrakci byly použity tři druhy vláken. Pro šedé a černé vlákno byly stanoveny jako optimální parametry extrakce navážka 550 mg a teplota 1. extrakce 90 °C, teplota následné extrakce 30 °C. Červené vlákno má optimální navážku rovněž 550 mg a teplotu 1. extrakce 90 °C, odlišuje se však teplotou 2. extrakce 40 °C. Programem Statistica Cz byly určeny kombinace doby extrakcí pro další sérii experimentů, viz tabulka I/2 v příloze I. Na obrázku 22 je uveden odezvvový a vhodnostní profil pro šedé vlákno, kterým je určena doba jednotlivých kroků extrakce.

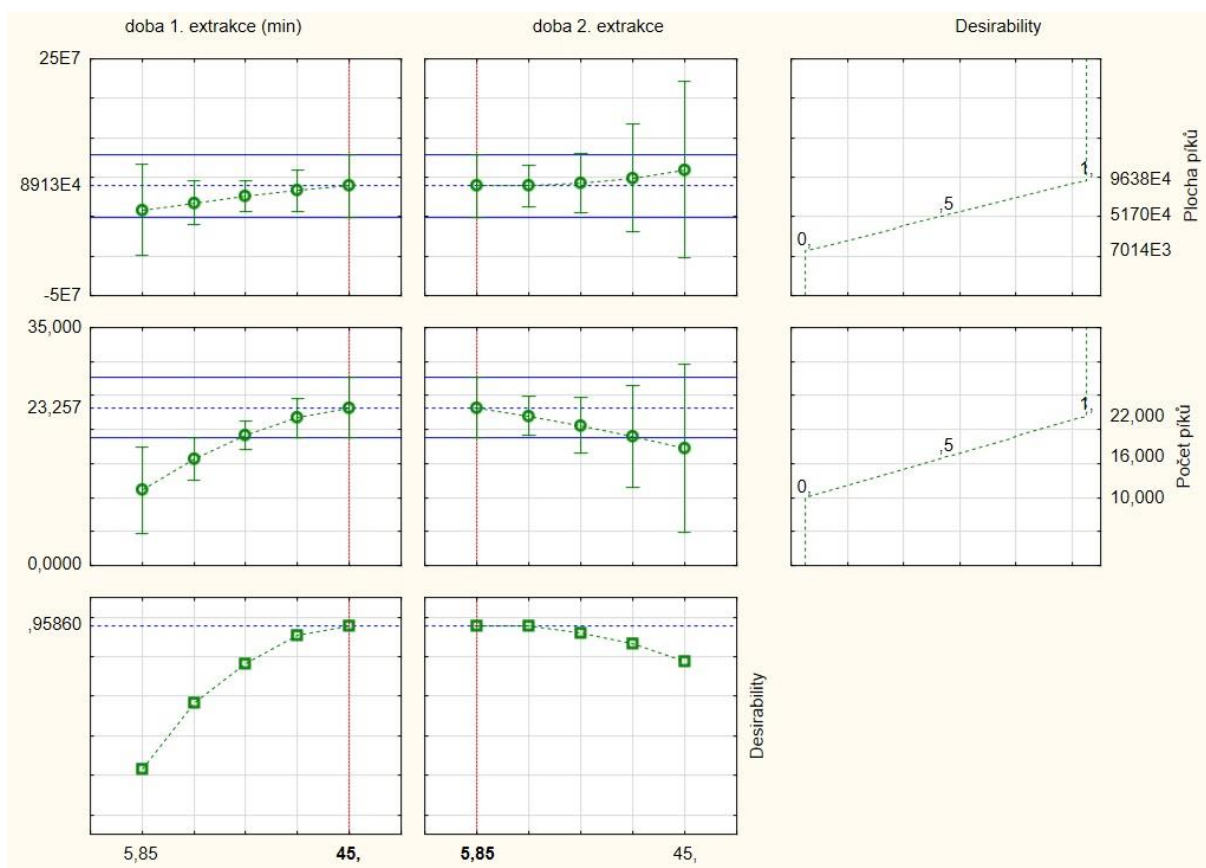


Obrázek 22 Odezvvové profily pro šedé vlákno a kombinace doby 1. a 2. extrakce

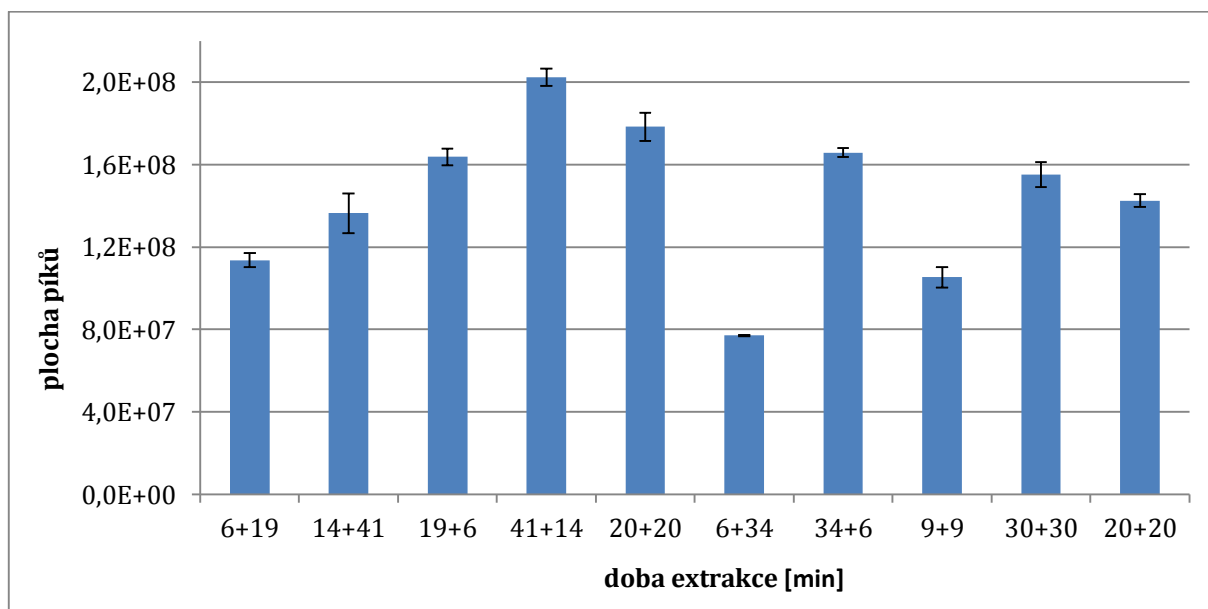


Obrázek 23 Odezvové profily pro černé vlákno a kombinace doby 1. a 2. extrakce

Na obrázku 23 je uveden odezvoový a vhodnostní profil pro černé vlákno určující kombinaci optimální doby jednotlivých kroků extrakce. Na obrázku 24 na následující straně je vhodnostní profil pro červené vlákno.



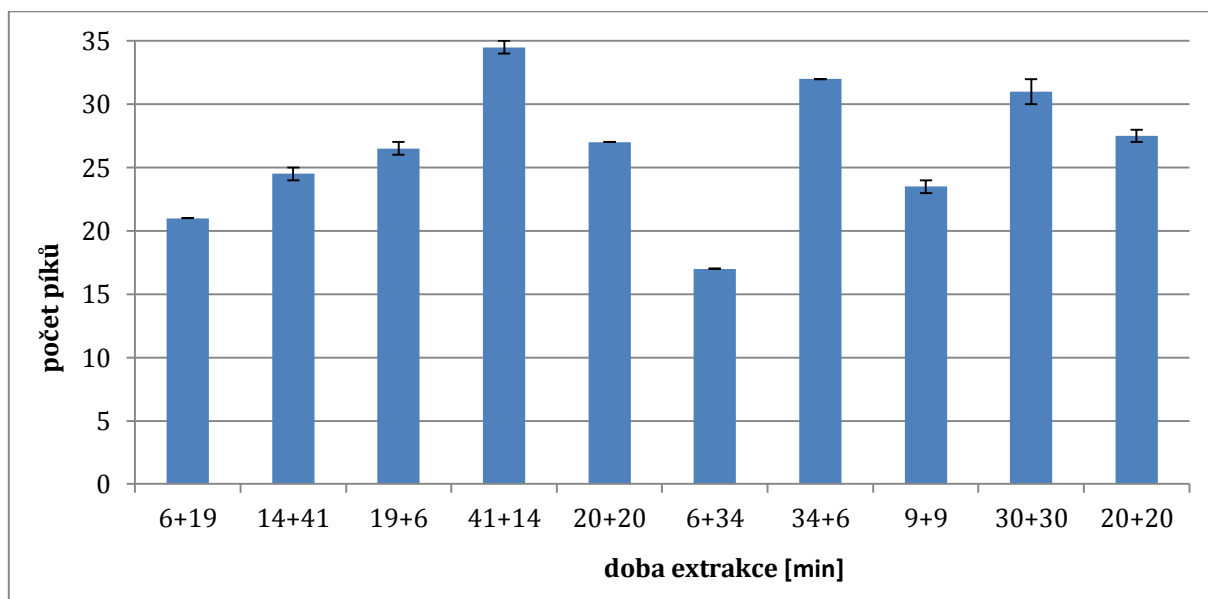
Obrázek 24 Odezvové profily pro červené vlákno a kombinace doby 1. a 2. extrakce



Obrázek 25 Doba extrakce pro šedé vlákno (n = 3)

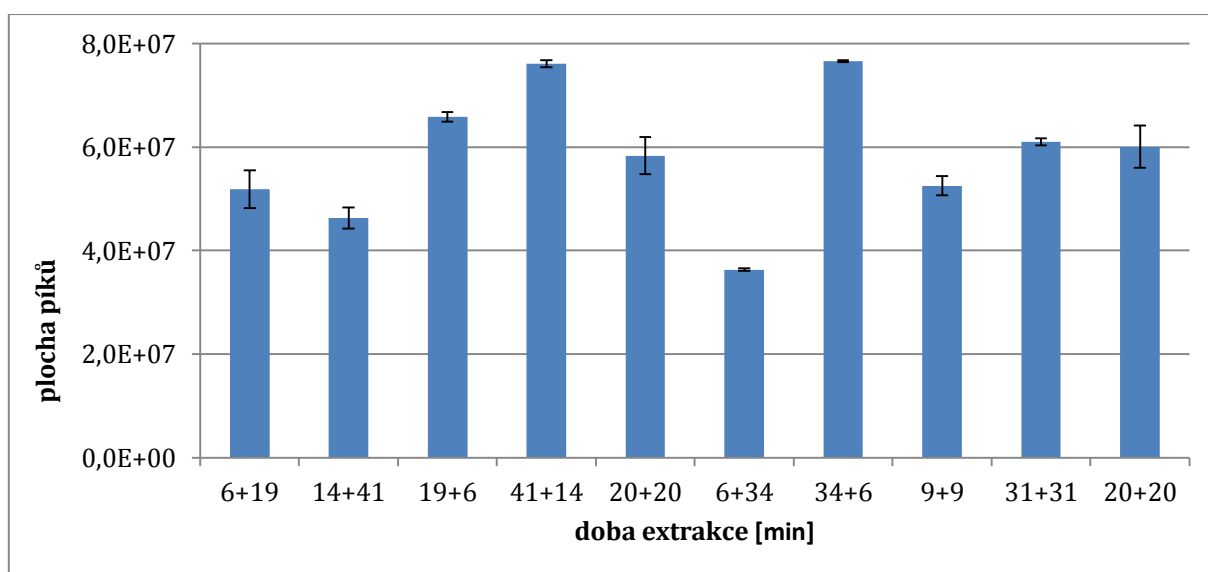
Na obrázku 25 je zanesena průměrná plocha píkú při extrakci na šedé vlákno. Nejvyšší naměřená plocha píku byla dosažena při navázce 550 mg, teplotě 90 °C a 30 °C při době extrakce 41 + 14 minut. Celková doba je 55 minut stejně jako u doby 14 + 41 minut, přesto plocha píkú u druhé jmenované kombinace je o přibližně 40 % nižší. Na obrázku 25,

stejně jako ve všech ostatních obrázcích v kapitole 3.4 vidět dvakrát 20 + 20 minut trvající extrakce. Přestože podmínky extrakce byly vždy stejné, plocha a počet píků je mnohdy různá.



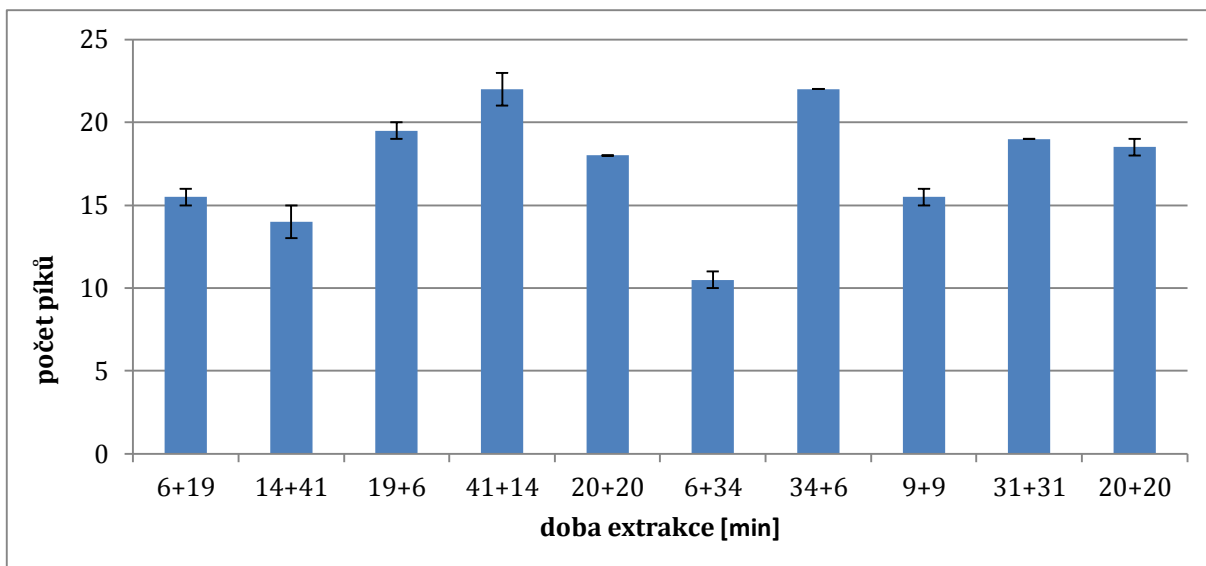
Obrázek 26 Doba extrakce pro šedé vlákno dle počtu píků (n = 3)

Na obrázku 26 lze pozorovat u doby 20 + 20 minut rozdíl pouze o jeden pík. Při porovnání plochy uvedené doby 20 + 20 minut je však rozdíl plochy píků přibližně 20 %.



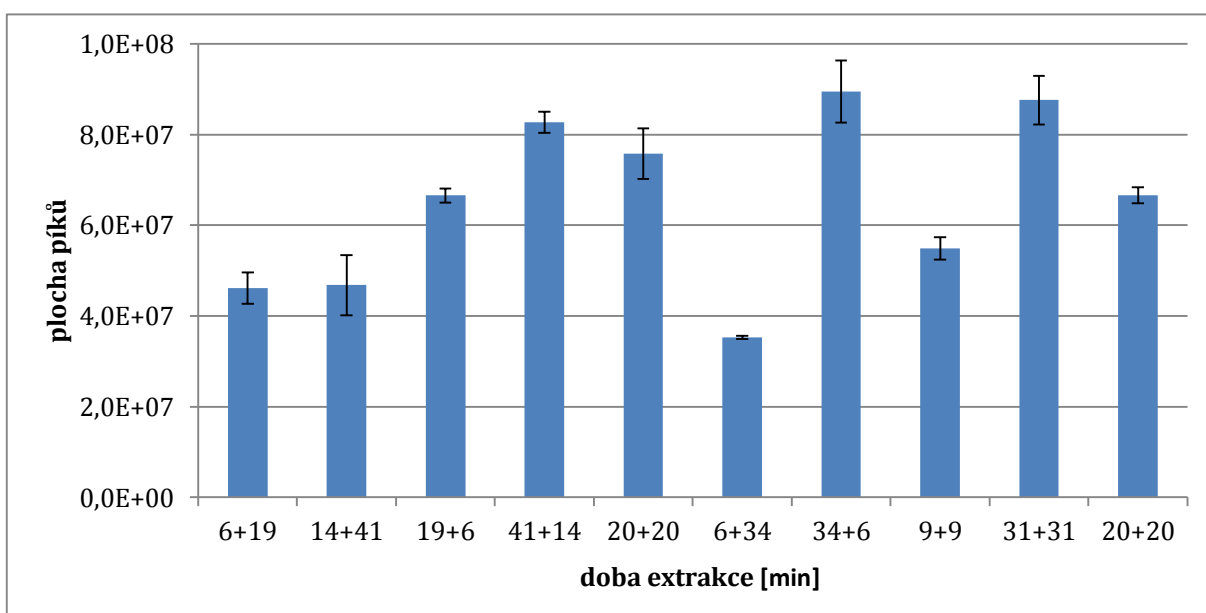
Obrázek 27 Doba extrakce pro černé vlákno (n = 3)

Na obrázku 27 je obdobná situace pro černé vlákno. Toto vlákno dosahuje maximální plochy píků při časech 34 + 6 minut. Prakticky shodně velká plocha byla naměřena i při době 41 + 14 minut. Z toho pohledu lze konstatovat, že na extrakci na černé vlákno má vliv zejména čas první extrakce, což lze vidět na vhodnostním profilu obrázek 23, kdy je doba 2. extrakce statisticky nevýznamným parametrem.



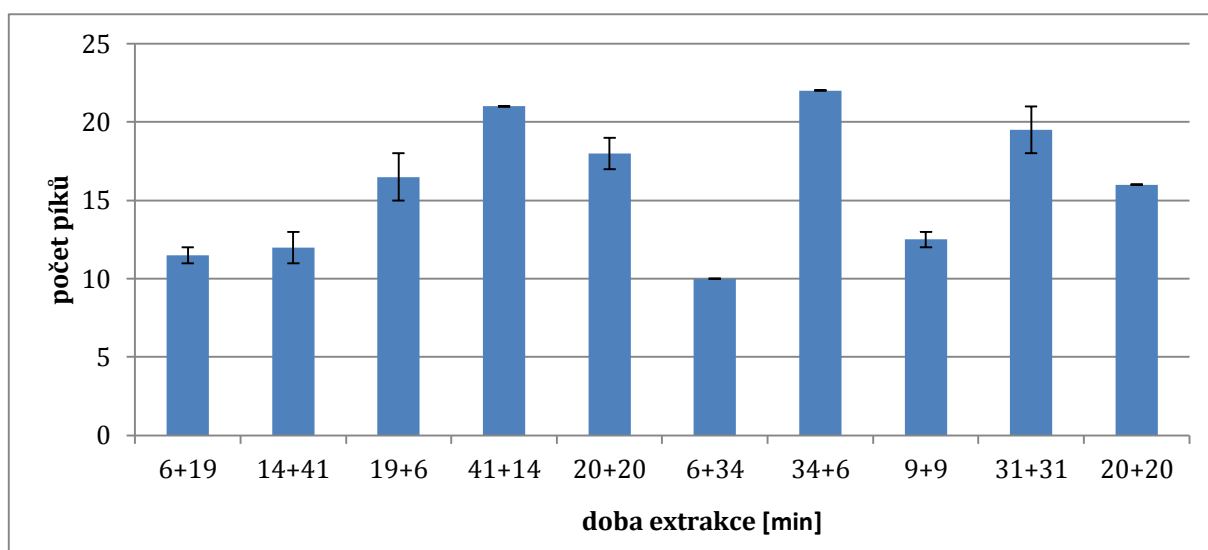
Obrázek 28 Doba extrakce pro černé vlákno podle počtu píků (n = 3)

Rozdíl v kombinaci 20 + 20 minut pro černé vlákno je ze všech tří typů vláken nejmenší, viz obrázek 28. Rozdíl je pouze jeden pík, při porovnání plochy píků 20 + 20 minut je rozdíl přibližně 3 %.



Obrázek 29 Doba extrakce pro červené vlákno (n = 3)

Na obrázku 98 je plocha píků u červeného vlákna. Při extrakci na toto vlákno byla teplota druhé extrakce vyšší o 10 °C než u šedého a černého vlákna. Největší plocha píků byla naměřena při době extrakce 34 + 6 minut. Celková doba extrakce 40 minut je také při kombinaci 20 + 20 minut a 6 + 34 minut. Poslední dvě kombinace teplot však nedosahují plochy píků jako u kombinace 34 + 6 minut. Tento fakt, že vyšší teplota první extrakce dosahuje vyšších ploch, je pozorovatelný u všech tří typů vláken.



Obrázek 30 Doba extrakce pro červené vlákno dle počtu píků ($n = 3$)

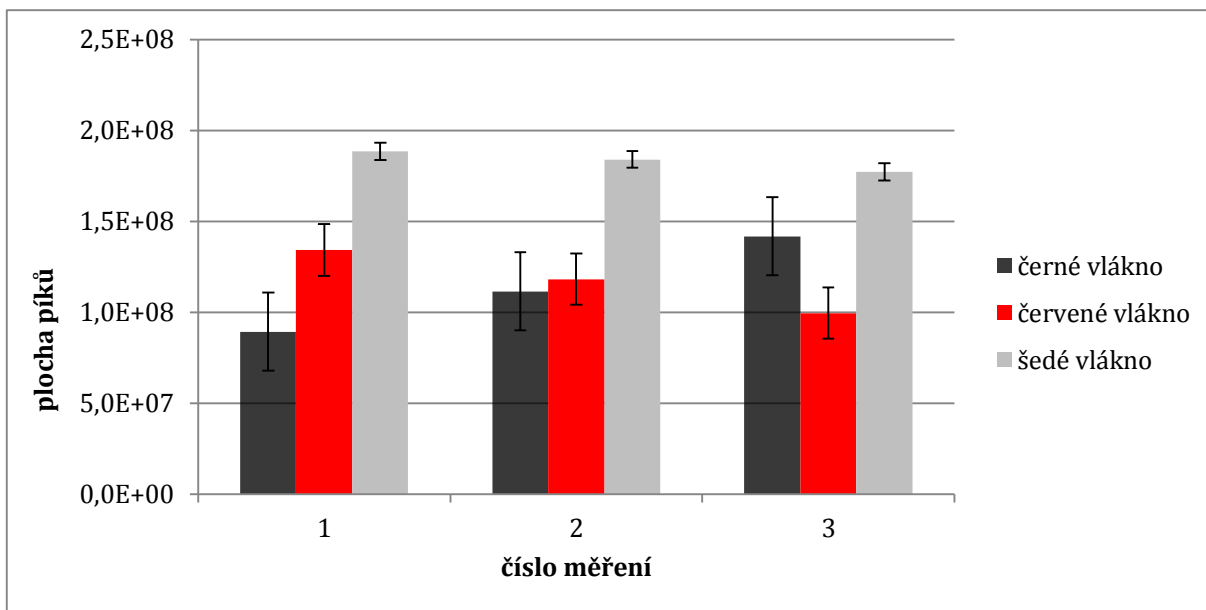
Na obrázku 30 je vidět rozdíl počtu píků pro kombinace 20 + 20 minut dva píky. Tyto dva píky tvoří rozdíl přibližně 13 % vyjádřeno v ploše píků u doby 20 + 20 minut. Největší počet píků byl nalezen při extrakci trvající celkem 40 minut v poměru 34 + 6 minut.

Z odezvoových a vhodnostních profilů uvedených v kapitole 3.4 lze jednoznačně tvrdit, že teplota druhého extrakčního kroku je vždy statisticky nevýznamným parametrem.

3.5 Porovnání vláken

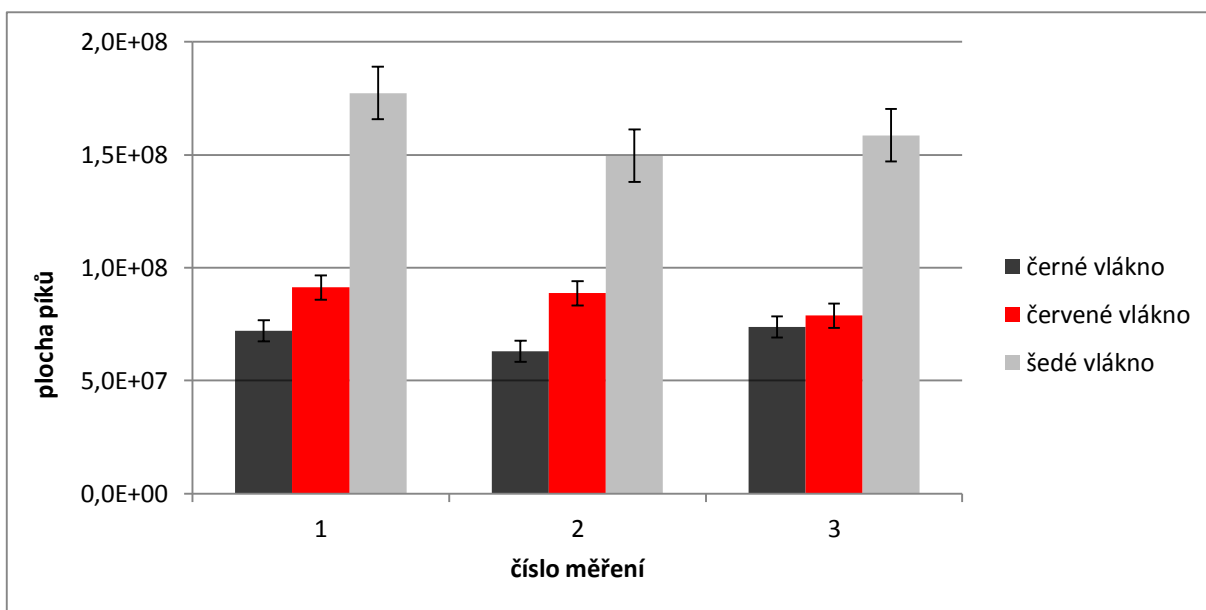
Jak je uvedeno výše, při experimentech byla použita tři různá SPME vlákna. Každé vlákno se lišilo složením stacionární fáze a její tloušťkou. Aby se dalo mezi vlákny rozlišit, označují se určitými barvami, každá druh stacionární fáze je přitom vhodný pouze pro určitý druh chemických látek.

Z pěti odrůd chmele byly pro porovnání vláken vybrány dvě odrůdy, konkrétně Kazbek a Mandarina. U těchto dvou odrůd byl následně určen počet píků a celková plocha píků extrahovaných látek. Srovnávaným parametrem byla opět plocha píků, která reprezentuje množství všech látek, které se podařilo extrahovat ze vzorku. Při experimentu byly zvoleny dvě metody extrakce. První metoda extrakce (značena I) byla prováděna jednokrokovou extrakcí při 90 °C po dobu 60 minut. Druhá metoda extrakce (značena II) extrakce byla prováděna ve dvou extrakčních krocích, a to 1. extrakce při 90 °C po dobu 41 minut, následována 2. extrakcí při 30 °C po dobu 14 minut. Obě metody měly shodnou navážku vzorku 550 mg. Každé měření bylo opakováno třikrát, aby byla dosažena reprodukovatelnost výsledků.



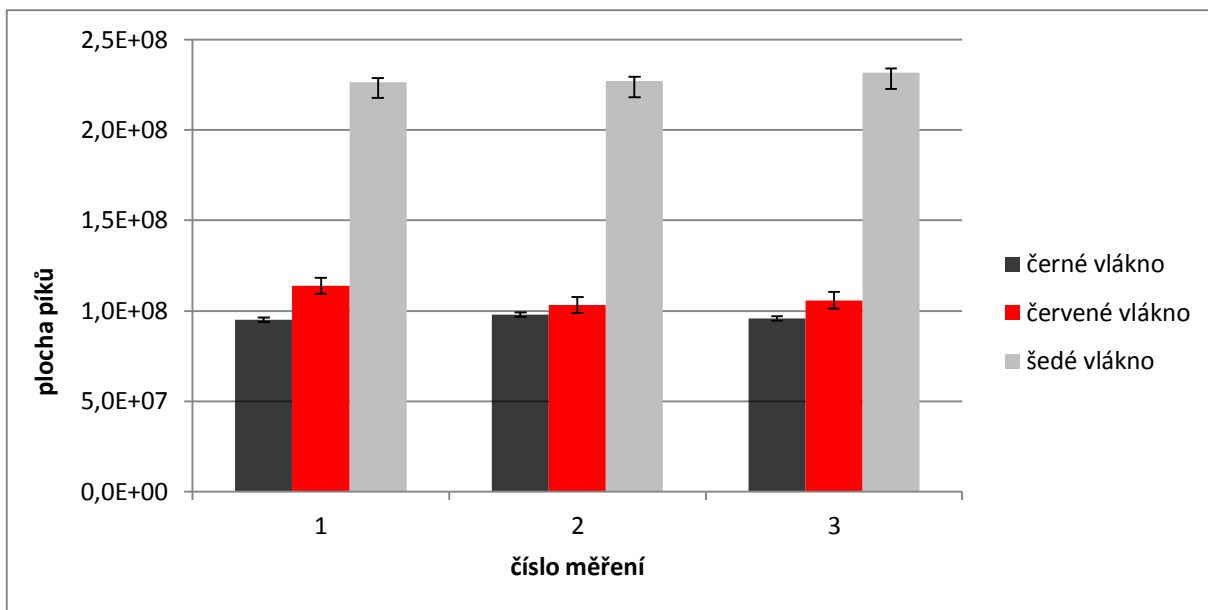
Obrázek 31 Porovnání vláken na odrůdě Kazbek metodou I (n = 3)

Obrázek 31 zobrazuje porovnání tří typů použitých vláken pro odrůdu chmele Kazbek metodou I, tedy extrakci provedenou v jednom kroku při 90 °C a době extrakce 60 minut. Hned v prvním grafu je zřetelně vidět, že šedé vlákno vykazuje největší plochu píků, tudíž nejlepší extrakční schopnosti.



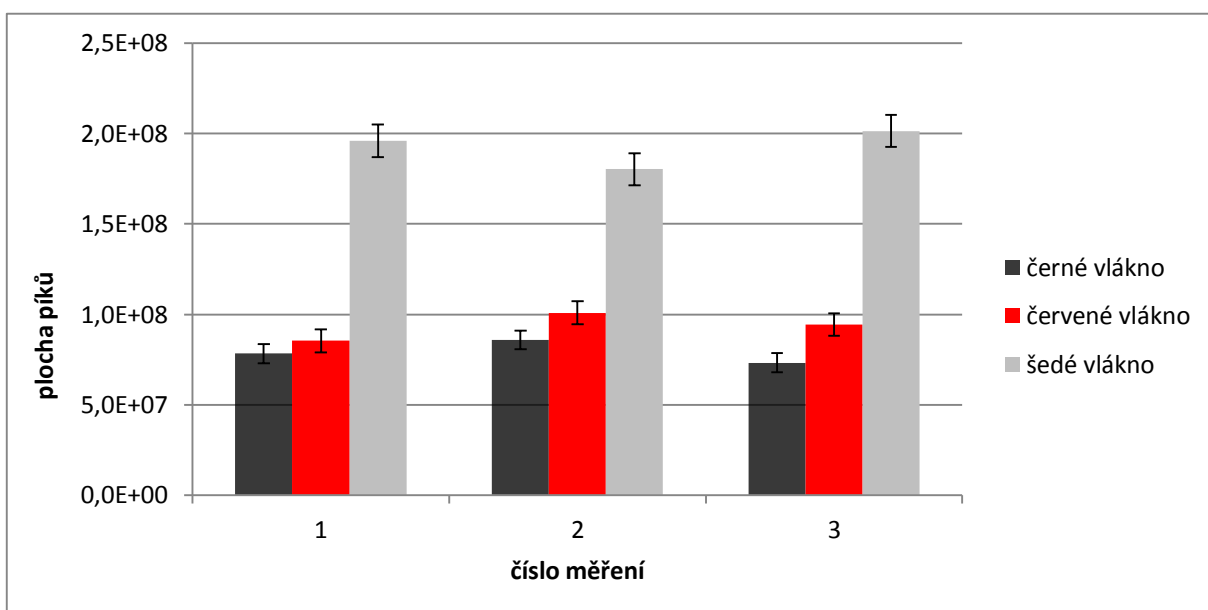
Obrázek 32 Porovnání vláken na odrůdě Mandarin metodou I (n = 3)

Obrázek 32 zobrazuje stejnou metodu měření při zachování totožných podmínek, pouze pro chmel odrůdy Mandarin. I na tomto grafu lze pozorovat lepší extrakční vlastnosti šedého vlákna.



Obrázek 33 Porovnání vláken na odrůdě Kazbek metodou II (n = 3)

Obrázek 33 zobrazuje odrůdu chmele Kazbek metodou II, tedy pro dvoukrokovou metodu extrakce prováděnou při 90 °C a 30 °C s časem extrakce 41 + 14 minut. I na tomto obrázku je patrná dvojnásobně větší plocha píkú šedého vlákna.



Obrázek 34 Porovnání vláken na odrůdě Mandarina metodou II (n = 3)

Poslední obrázek 34 ze srovnávacích testů vláken zobrazuje metodu II pro odrůdu Mandarina. Výhoda šedého vlákna je i při tomto provedení zřejmá. Podobně jako u odrůdy Kazbek tato dvoukroková metoda vykazuje největší plochy píkú pro šedé vlákno. Z toho lze usoudit, že na extrakci má vliv zejména provedení extrakce z hlediska teplotního režimu, nikoliv koncentrace jednotlivých těkavých látek, která je v uvedených odrůdách různá.

Při provedení extrakce metodou II bylo u šedého vlákna vždy dosaženo větší plochy píků, než u vlákna černého nebo červeného. Tohoto efektu bylo dosaženo u obou testovaných odrůd. Lze tak tvrdit, že účinnost extrakce je závislá pouze na vnějších podmínkách a nezávisí na odrůdě. U černého a červeného vlákna nelze jednoznačně určit, která z metod poskytuje lepší výsledky. S jistotou lze pouze konstatovat, že červené vlákno má lepší sorpční vlastnosti pro daný vzorek než černé vlákno.

3.6 Identifikace látek

Z předchozích experimentů byly získány optimální podmínky extrakce uvedené v tabulce 12 tak, aby bylo dosaženo sorpce co největšího množství těkavých látek. Další sérií experimentů byla extrakce těkavých látek z pěti vzorků chmele s jejich následnou identifikací. Každá odrůda byla podrobena extrakci, za optimalizovaných podmínek, na šedé SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50 μm /30 μm .

Tabulka 12 Optimalizované podmínky pro šedé SPME vlákno

Parametr	Hodnota
doba první extrakce	41 minut
doba druhé extrakce	14 minut
kombinace teplot	90 a 30 °C
doba desorpce	1 minuta
navážka vzorku	550 mg
objem nádoby na vzorek	20 ml

Chromatografické podmínky a doba desorpce byly převzaty z diplomové práce Dominiky Šuhajové [69]. Při desorpci na GC-MS byl získán chromatogram s příslušným množstvím píků, jejichž hmotnostní spektra byla porovnána s databází spekter a na základě tohoto porovnání byly identifikovány chemické látky ve chmelu. Identifikace látek byla následně potvrzena pomocí retenčních indexů.

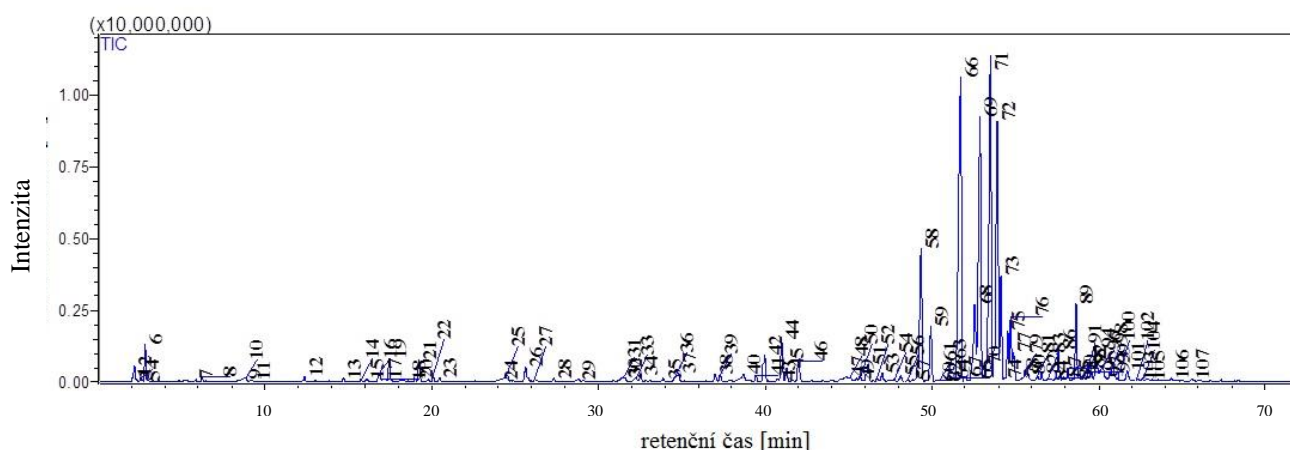
Aby bylo možné získat retenční indexy chemických látek ve chmelu, bylo nejprve nutné proměřit retenční časy n-alkanů, které dále posloužily k výpočtu retenčních indexů. Retenční čas je veličina, která je závislá na okolních podmínkách, proto není zcela vhodná při srovnání s databázemi. Retenční index je však veličina nezávislá na podmínkách chromatografické analýzy a lze ji tak použít pro srovnání a identifikaci chemických látek.

V kapitole 3.6.1 až 3.6.5 jsou uvedeny vybrané těkavé látky extrahované ze vzorků chmele, které mají obsah alespoň 0,10 % relativních, tzn. plocha píků příslušných látek vztažená k celkové ploše všech nalezených píků.

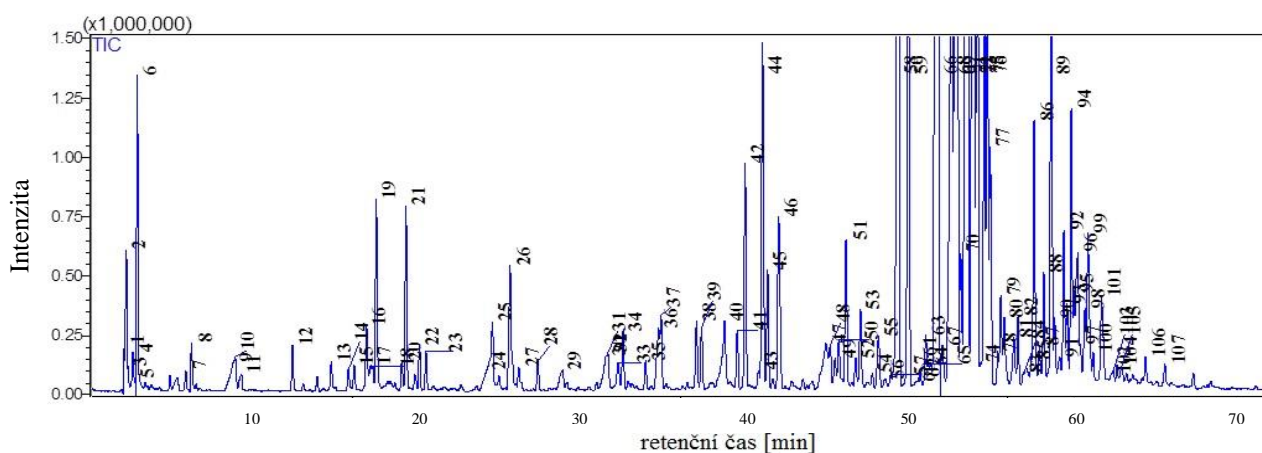
Při desorpci na GC-FID za podmínek uvedených v kapitole 2.3 byly spočítány relativní plochy píků v chromatogramech jednotlivých vzorků. Chromatogramy jsou uvedené v příloze III obrázek III/1 až obrázek III/5, pro jednotlivé vzorky chmelů. Ze získaných chromatogramů a po přepočtu retenčních časů na retenční indexy byly vypracovány tabulky, ve kterých jsou uvedeny detekované píky s relativní plochou větší než 0,1 %, tyto tabulky jsou uvedeny v příloze IV tabulka IV/1 až tabulka IV/5.

3.6.1 Identifikace látek chmele odrůdy Mandarinina

Z chromatogramu na obrázku 36 a 37 získaného metodou GC-MS bylo celkem detekováno 107 píků. Bylo provedeno porovnání hmotnostních spekter s knihovnami spekter i s databázemi NIST, WEBBOOK a VCF. Na základě porovnání bylo identifikováno celkem 45 látek se shodou alespoň 85 %. Odrůda chmele Mandarinina obsahuje významné množství α -humulenu (15,28 %), β -bisabolenu (13,40), α -kurkumenu (11,11 %) a α -selinenu (10,05 %). Kompletní seznam látek je uveden v příloze V tabulka V/1.



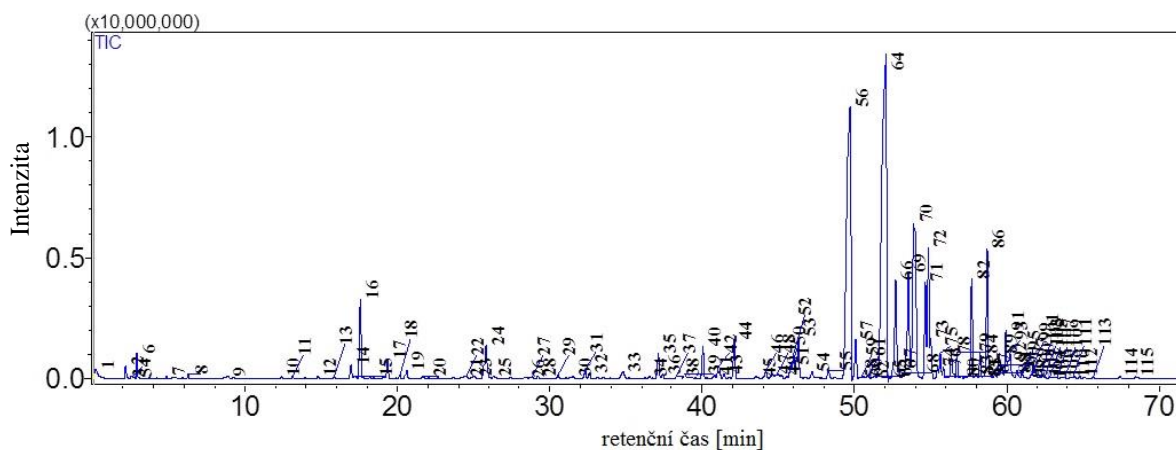
Obrázek 35 10x přiblížený chromatogram chmele odrůdy Mandarinina



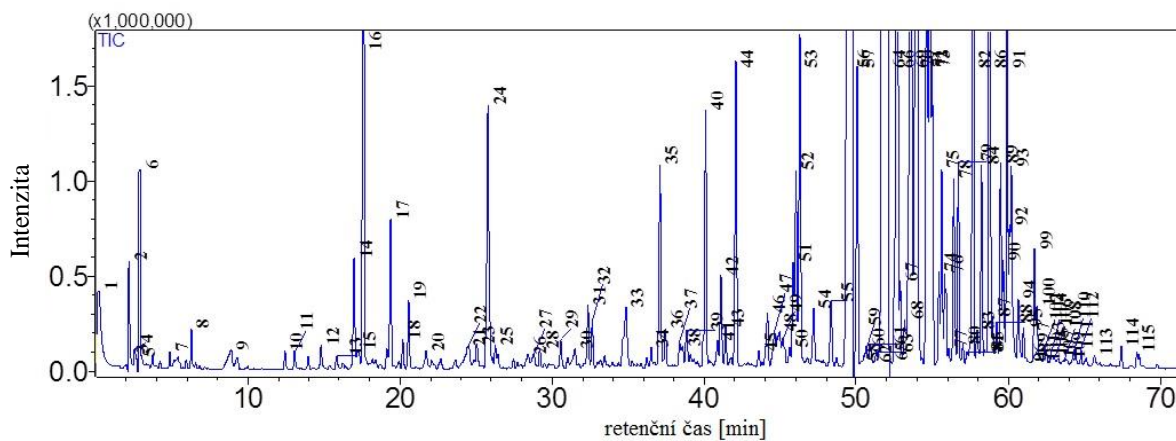
Obrázek 36 Chromatogram odrůdy chmele Mandarinina

3.6.2 Identifikace látek chmele odrůdy Kazbek

Z chromatogramu na obrázku 37 a 38 získaného metodou GC-MS bylo celkem detekováno 115 píků. Bylo provedeno porovnání hmotnostních spekter s knihovnami spekter i s databázemi NIST, WEBBOOK a VCF. Na jejich základě bylo identifikováno celkem 47 látek se shodou alespoň 85 %. Odrůda Kazbek obsahuje významné množství α -humulenu (23,12 %) a β -karyofillenu (17,52 %). Kompletní seznam látek je uveden v příloze V tabulka V/2.



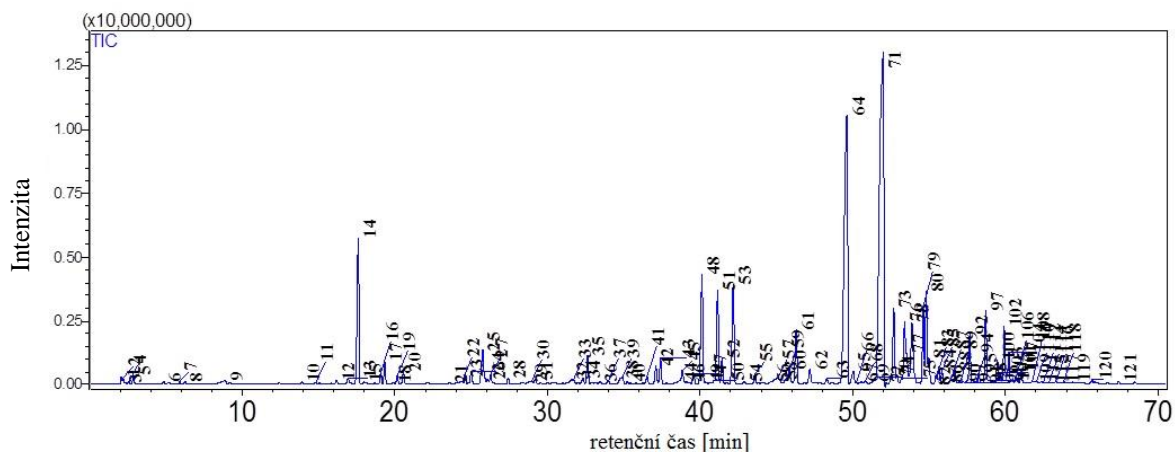
Obrázek 37 Chromatogram odrůdy chmele Kazbek



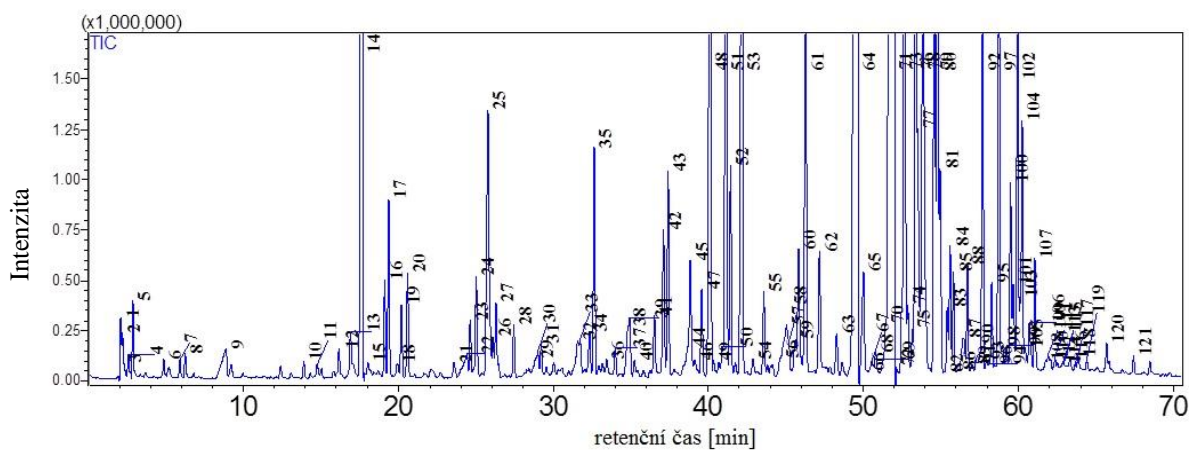
Obrázek 38 10x přiblížený chromatogram odrůdy chmele Kazbek

3.6.3 Identifikace látek chmele odrůdy Simcoe

Z chromatogramu na obrázku 39 a 40 získaného metodou GC-MS bylo celkem detekováno 121 píků. Bylo provedeno porovnání hmotnostních spekter s knihovnami spekter i s databázemi NIST, WEBBOOK a VCF. Na jejich základě bylo identifikováno celkem 48 látek se shodou alespoň 85 %. Odrůda chmele Simcoe obsahuje významné množství α -humulenu (23,37 %) a β -karyofillenu (15,00 %). Kompletní seznam látek je uveden v příloze V tabulka V/3.



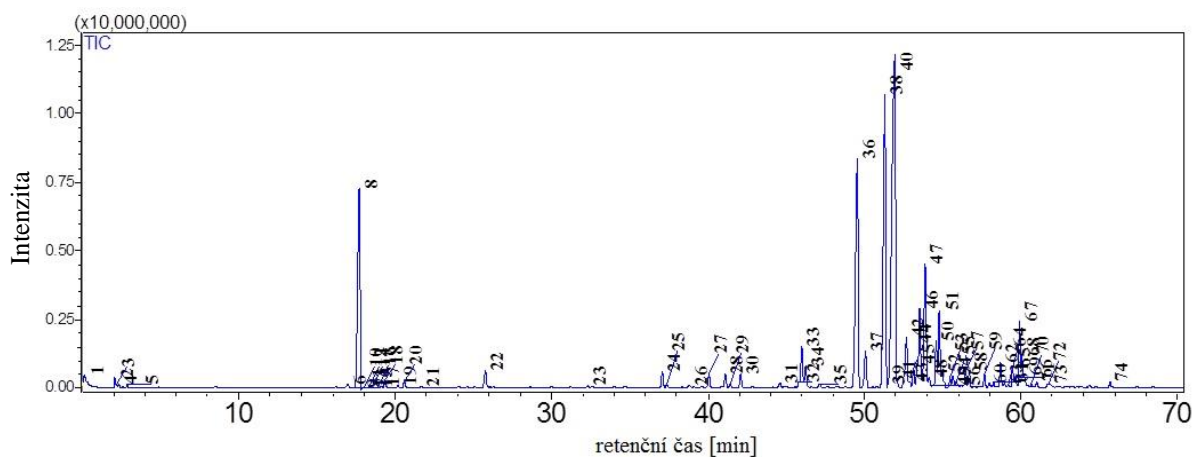
Obrázek 39 10x přiblížený chromatogram chmele odrůdy Simcoe



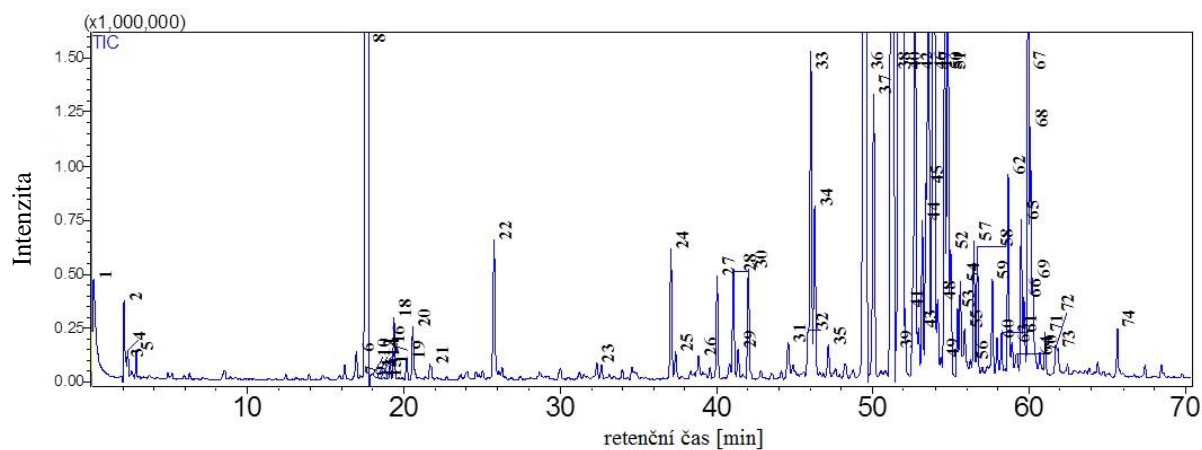
Obrázek 40 Chromatogram chmele odrůdy Simcoe

3.6.4 Identifikace látek chmele odrůdy Cascade

Z chromatogramu na obrázku 41 a 42 získaného metodou GC-MS bylo celkem detekováno 74 píků. Bylo provedeno porovnání hmotnostních spekter s knihovnami spekter i s databázemi NIST, WEBBOOK a VCF. Na jejich základě bylo identifikováno celkem 32 látek se shodou alespoň 85 %. Odrůda chmele Cascade obsahuje významné množství α -humulenu (24,74 %), β -farnesenu (13,94 %) a β -karyofillenu (12,01 %). Kompletní seznam látek je uveden v příloze V v tabulce V/4.



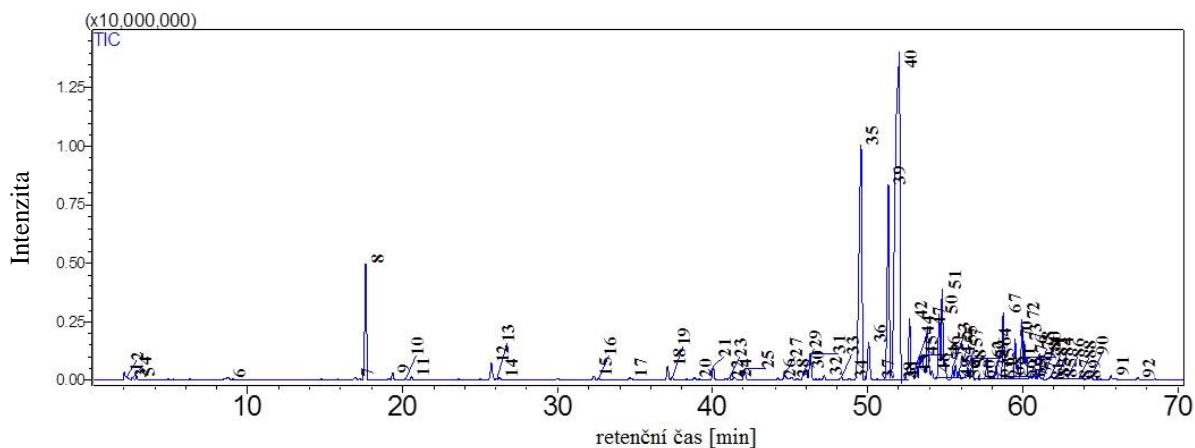
Obrázek 41 Chromatogram chmele odrůdy Cascade



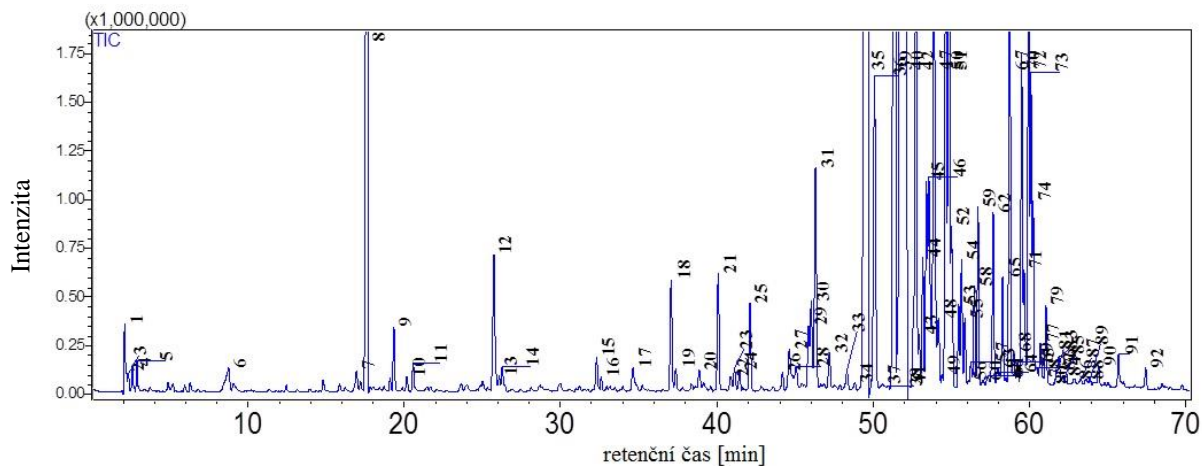
Obrázek 42 10x přiblížený chromatogram chmele odrůdy Cascade

3.6.5 Identifikace látek chmele odrůdy Amarillo

Z chromatogramu na obrázku 43 a 44 získaného metodou GC-MS bylo celkem detekováno 92 píků. Bylo provedeno porovnání hmotnostních spekter s knihovnami spekter i s databázemi NIST, WEBBOOK a VCF. Na jejich základě bylo identifikováno celkem 42 látek se shodou alespoň 85 %. Odrůda chmele Amarillo obsahuje významné množství α -humulenu (30,39 %) a β -karyofillenu (13,35 %). Kompletní seznam látek je uveden v příloze V tabulka V/5.



Obrázek 43 Chromatogram chmele odrůdy Amarillo



Obrázek 44 10x přibližný chromatogram chmele odrůdy Amarillo

4 ZÁVĚR

Cílem práce bylo stanovení těkavých látek chmele metodou mikroextrakce tuhou fází. Při experimentech byly optimalizovány tři podmínky mající velký vliv na kvantitativní průběh extrakce těkavých látek ze vzorku. Pro experimenty byla testována tři SPME vlákna.

Extrakce těkavých látek probíhaly při kombinaci dvou různých teplot. Bylo zjištěno, že první extrakce prováděna při vyšší teplotě, následována druhou extrakcí při nižší teplotě, vede k účinnější sorpci látek ze vzorku než naopak. Vysvětlením může být to, že při první extrakci dojde k sorpci látek méně těkavých, které zároveň z vlákna obtížněji desorbují. Druhá extrakce při nižší teplotě nezpůsobuje desorpci méně těkavých látek sorbovaných v prvním kroku, zároveň však vede k sorpci látek více těkavých. Tento efekt lze pozorovat u všech tří typů SPME vláken použitých při experimentu.

Při experimentech a porovnání odrůd Kazbek a Mandarina bylo zjištěno, že SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50 μm /30 μm vykazuje mnohem lepší extrakční schopnosti oproti vláknu CAR/PDMS 75 μm , nebo PDMS 100 μm . Pro stanovení těkavých látek chmele je tak vhodné šedé vlákno DVB/CAR/PDMS 50 μm /30 μm .

Při měřeních optimalizující dobu extrakce bylo zjištěno, že při stejně dlouhé celkové době extrakce s delší první dobou se vždy extrahuje více látek, než naopak. Nebylo prokázáno, že s rostoucí celkovou dobou extrakce dojde k nárůstu plochy píků. Při dlouho trvajících extrakcích bylo sice dosaženo relativně velké plochy, přesto u každého ze tří typů vláken nejdelší doba extrakce nevedla k největší ploše.

Při optimalizovaných podmínkách byly na šedé vlákno extrahovány těkavé látky z pěti zvolených odrůd chmele. V souladu se teorií byl hlavní těkavou složkou všech pěti odrůd chmele α -humulen. Všech pět odrůd obsahovalo také β -karyofillen a β -myrcen. U odrůdy Simcoe se podařilo nalézt nejvíce látek ze všech pěti odrůd. Celkem se podařilo nalézt 121 látek, z toho 48 jich bylo identifikováno. Naproti tomu nejméně nalezených látek bylo u odrůdy Cascade, a to pouze 74 píků. Z toho se jich 32 podařilo identifikovat.

5 LITERATURA

- [1] MICHALEC, Z. *Člověk a rostliny*. Praha. Práce, 1977.
- [2] KUBÁT, K. *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia, 2002. ISBN 9780-200-0836-5.
- [3] KLIKA, J. *Klíč k určování rostlin: pom. kniha pro žáky stř. všeobec. vzdělávacích škol, pro učitele 1. a 2. cyklu a příručka pro stud. pedagog. fakult.* Praha: SPN, 1965. ISBN 14-854-66.
- [4] PILÁT, A., UŠÁK, O. *Atlas rostlin*. 2. nezm. vyd. Praha: SPN, 1960.
- [5] GRAU, J, JUNG, R, MÜNKER, R. *Bobulovité, užitkové a léčivé rostliny*. Praha. Knižní klub, 1996. Průvodce přírodou. ISBN 9780-7176-369-1.
- [6] RANDUŠKA, D., HÁBEROVÁ, I., ŠOMŠÁK L. *Barevný atlas rostlin*. 3. (2. čes., opr.) vyd. Bratislava: Obzor, 1986. Obrázky z přírody.
- [7] STARÝ, F. *Rostliny a jejich půvab v ilustracích Karla Svolinského*. Praha, Aventinum, 2006. ISBN 9780-868-5824-3.
- [8] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration_Humulus_lupulus0.jpg, 26.2 2019.
- [9] LUTZ, A., KNIEDL, J., KAMMHUBER, K., SINGER, E. *Trends in hop breeding – new aroma and bitter qualities at the Hop Research Center Huell*. International Hop Growers Convention I.H.G.C. – Proceedings of the Scientific Commission, 2011.
- [10] PRUGAR, J. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČZV, 2008. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [11] NESVADBA, V. *Rajonizace hybridních genotypů chmele*. Chmelařství. 2000, (9-10), 107-113.
- [12] NESVADBA, V. *New Varieties Bohemia and Saaz Late*. Zech journal of genetics and plant breeding. 2012, C 48(2), 98-99.
- [13] ALTOVÁ, M. *Český chmel: Czech hops = Der tschechische Hopfen*. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky ve spolupráci se Svazem pěstitelů chmele České republiky, 2003. ISBN 978-80-7434-003-1.
- [14] ČEPIČKA, J., KUBÍČEK J. *Chmel a chmelové výrobky*. Praha. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, ISBN 9780-902-6586-3.
- [15] KOSAŘ, K., PROCHÁZKA S. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 9780-902-658-6-3.

- [16] VENT, L. *Zelené zlato*. Praha. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2002. ISBN 80-86576-03-5.
- [17] WHITTOCK, S., KOUTOULIS A. *New hop (Humulus Lupulus L.) aroma varieties from Australia*. 1. Australia. International Hop Growers Convention I.H.G.C. – Proceeding soft the Scientific Commission, 2011.
- [18] KERMANSHAHI, R., ESFAHANI B., POUR A., ASGHARI G., SERKANI, J. *The Study of Antibacterial Effect of Humulus lupulus on some of Gram Positive & Gram Negative Bacteria*. Journal of Medicinal Plant. 2009, 30(2), 92-97.
- [19] VAN CLEEMPUT, M., CATTOOR, K., DE BOSSCHER, K., HAEGEMAN, G., DE KEUKELEIRE, D., HEYERICK, A. *Hop (Humulus lupulus)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds*. Journal of Natural Products. 2009, 72(6), 1220-1230.
- [20] ČEPIČKA, J. *Kvantifikace chmelového aroma v pivu: Pivovarnický kalendář*. Praha. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 9780-902-6583-9.
- [21] BASAŘOVÁ, G. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha. Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [22] ŠNOBL, J. *Rostlinná výroba IV: (Chmel, len, konopí, využití biomasy k energetickým účelům)*. Praha. Česká zemědělská univerzita, 2004. ISBN 80-213-1153-3
- [23] KARABÍN, M., BRÁNYIK, T., KRULIŠ, T., DVOŘÁKOVÁ, M., DOSTÁLEK, P., *Application of Chemically Modified Bitter Compounds in Brewing*. Chemické listy. 2009, 103(9), 721-728.
- [24] OLŠOVSKÁ, J., JURKOVÁ, M., ČEJKŮ, P. *Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin: Část 2. Stanovení cis/trans-izomerů iso- α -hořkých kyselin v pivu metodou Ultraúčinné kapalinové chromatografie*. Kvasný průmysl. 2012, 58(4), 94-99
- [25] KROFTA, K. *Hodnocení kvality chmele. Metodika pro praxi*. Žatec. Chmelařský institut, 2008.
- [26] KROFTA, K., VRABCOVÁ, S., MIKYŠKA, A., JURKOVÁ, M. *Vliv oxidačních produktů β -kyselin chmele na hořkost piva*. Kvasný průmysl. 2013, 59(10-11), 306-312.
- [27] MOŠTEK, J., ČEPIČKA J. *Chemical nature of unspecified soft resins present in hop bitter substance and their effects on beer*. Kvasny Prumysl. 1969, 15(7), 145-151.
- [28] VRZALOVÁ, J., FRIC, V. *Rostlinná výroba IV: (Přadné plodiny, chmel)*. Praha. Česká zemědělská univerzita, 1994. ISBN 9788021301559.

- [29] KATSIOTIS, S., LANGEZAAL, C.R., SCHEFFER, V., VERPOORTE, R., *Comparative study of the essential oils from hops of various Humulus lupulus L. Cultivars*. Flavour and Fragrance Journal. 1989, 4(4), 187-191.
- [30] BASAŘOVÁ, G., ČEPIČKA, J. *Sladařství a pivovarnictví*. Praha. SNTL, 1985.
- [31] FRANČÁKOVÁ, H., TOTH, Z., *Sladovnictví a pivovarnictví*. Nitra. SPU Nitra, 2005.
- [32] NEUGEBAUEROVÁ, J. *Aktuální otázky pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin*. Odborný seminář s mezinárodní účastí. Brno. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2008. ISBN 978-80-7375-245-3.
- [33] KOPEC, K. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Praha. Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN 80-861-5364-9.
- [34] ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha. Grada, 2000. ISBN 9780-716-9704-4.
- [35] DEWELL, A., WEIDNER, G., SUMNER, D.M., *Relationship of Dietary Protein and Soy Isoflavones to Serum IGF-1 and IGF Binding Proteins in the Prostate Cancer Lifestyle Trial*. Nutrition and Cancer. 2007, 58(1), 35-42.
- [36] MEDJAKOVIC, S., JUNGBAUER, A. *Red clover isoflavones biochanin A and formononetin are potent ligands of the human aryl hydrocarbon receptor*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2008, 108(1-2), 171-177.
- [37] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin*. Tábor. ISBN 978-808-6659-176.
- [38] <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=65489>, 2.3 2019.
- [39] ŠTĚRBA, K., DOSTÁLEK, P., KARABÍN, M. *Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů esterů a kyselin v pivu*. Chemické listy. 2011, 105, 603-610.
- [40] PREEDY, V. *Beer in Health and Disease Prevention*. Burlington. Academic Press, 2008. ISBN 9780123738912.
- [41] BASAŘOVÁ, G. *Pivovarsko-sladařská analytika I*. Praha. Merkanta, 1992.
- [42] ALPENDURADA, F. *Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis*. Journal of Chromatography. 2000, 889(1-2), 3-14.
- [43] https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-10%20SPME_1008%20rev%20022015.pdf, 11.3 2019.
- [44] POLIAK, M., KOCHMAN, M., GORDIN, A., AMIRAV, A. *A Comparison of Snif Probe and SPME for Aroma Sampling*. Chromatographia. 2006, 64(7-8), 487-493.
- [45] <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/11200/11122.pdf>, 3.3 2019.

- [46] SIGMA ALDRICH, Bulletin 923. *Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions*.
- [47] MÜLLER, L., GÓRECKI, T., PAWLISZYN, J. *Solid-Phase Microextraction in Analysis of Pollutants in the Field*. Chichester, Wiley, 2006.
- [48] Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions. Bulletin 923, Sigma-Aldrich Co., Bellefonte, USA.
- [49] SEMENOV, S., KOZIEL, J., PAWLISZYN, J., *Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm*. Journal of Chromatography A. 2000, 873(1), 39-51.
- [50] BEDRUNKOVÁ, R. Využití mikro-extrakce na pevnou fázi pro analýzu pevných environmentálních vzorků. Brno, 2013. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí. Vedoucí práce Mgr. Bc. Lucie Bielská.
- [51] HUANG, J., LIN, B., YU, Q.W., FENG, Y.Q. *Determination of fluoroquinolones in egg using in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2006, 384(5), 1228-1235.
- [52] POPP, P. a PASCHKE, A. *Solid phase microextraction of volatile organic compounds using carboxen-polydimethylsiloxane fibers*. Chromatographia. 1997, 46(7-8), 419-424
- [53] LORD, H., PAWLISZYN, J. *Evolution of solid-phase microextraction technology*. Journal of Chromatography A. 2000, 885(1-2), 153-193.
- [54] PAWLISZYN, J. *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Elsevier, 2012, 61-97
- [55] KATAOKA, H., LORD, H., PAWLISZYN, J.. *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. Journal of Chromatography A. 2000, 880(1-2), 35-62.
- [56] MAYER, P., VAES, H.J.W., WIJNKER, F., LEGIERSE, K., KRAAIJ, R., TOLLS, J., HERMENS, J. *Sensing Dissolved Sediment Pore water Concentration of Persistent and Bioaccumulative Pollutants Using Disposable Solid-phase Microextraction Fibers*. Environmental Science & Technology, 2000, 34(24), 5177-5183
- [57] SCOTT, W., P., R. *Introduction to Analytical Gas Chromatography*. Chromatographic Science Series, 1997, 76, ISBN 978-0824-700-164
- [58] ZENG, Y.E., NOBLET, J.A. *Theoretical Considerations on the Use of Solid-Phase Microextraction with Complex Environmental Samples*. Environmental Science & Technology, 2002, 36(15), 3385-3392.

- [59] BALTUSSEN, E., SANDRA, P., DAVID, F., CRAMERS, C. *Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles*. Journal of Microcolumn Separations, 1999, 11(10), 737-747
- [60] HEIDEN, C., HOFFMANN, A., KOLAHGAR, B. *Comparison of the Sensitivity of Solid Phase MicroExtraction (SPME) and Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water and Soil samples*. Linthicum: GerstelGmbH& Co.KG, 2001.
- [61] POITROWICZ, A. *Identification of volatile compounds from a brewery with SPME technique*. Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology. 2016, 21(1-2), 97 – 106.
- [62] KROFTA, K., ČEPIČKA, J. *Stanovení chmelových silic metodou mikroextrakce na tuhou fázi (SPME)*. Kvasný průmysl. 2000, 46(9), 235-242.
- [63] RICHTER, M.T., EYRES, T.G., SILCOCKS, P., BREMER, J.P. *Comparison of four extraction methods for analysis of volatile hop – derived aroma compounds in beer*. Separation science, 2017, 40(22), 4366–4376.
- [64] ARAÚJAO, V.L., SOLANA, R.R., CORTÉZ, M.S., DOMINGUEZ, M.J. *Use of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction to characterize the volatile composition of different hop cultivars*. Science of Food and Agriculture, 2013, 93(10), 2568–2574.
- [65] KLEINOVÁ J. *Studium těkavých látek v pivovarských surovinách, v meziproduktech při výrobě piva a v pivu*. Brno. 2014. Disertační práce. Mendelova Univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chemie a biochemie. Vedoucí práce prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.
- [66] OLŠOVSKÁ, J., KROFTA, K., JANDOVSKÁ, V., PATZAK, J., ŠTĚRBA, K. *Methods for verifying the authenticity of hops – an effective tool against falsification*. Kvasný Průmysl. 2016, 62(10), 294-305.
- [67] PISTELLI, L., FERRI, B., CIONI, P.L., KOZIARA, M., AGACKA, M., SKOMRA, U. *Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (Humulus lupulus L.) of five healthy and infected Polish cultivars*. IndustrialCrops and Products. 2018, 124, 653-662.
- [68] PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction – theory and practice*. 1. New York. New York: Wiley-VCH, 1997.
- [69] ŠUHAJOVÁ D. *Využití mikroextrakce tuhou fází pro analýzu aromaprofilu piva*, Pardubice, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.

6 PŘÍLOHY

Příloha I: Podmínky pokusů vygenerovaných pro extrakci

Příloha II: Celkové vhodnostní profily šedého, černého a červeného vlákna

Příloha III: Chromatogramy získané metodou GC-FID

Příloha IV: Detekované sloučeniny metodou GC-FID

Příloha V: Detekované sloučeniny metodou GC-MS

Příloha I Podmínky pokusů vygenerovaných pro extrakci

Tabulka I/1 Podmínky pokusů vygenerovaných pro optimalizaci extrakce

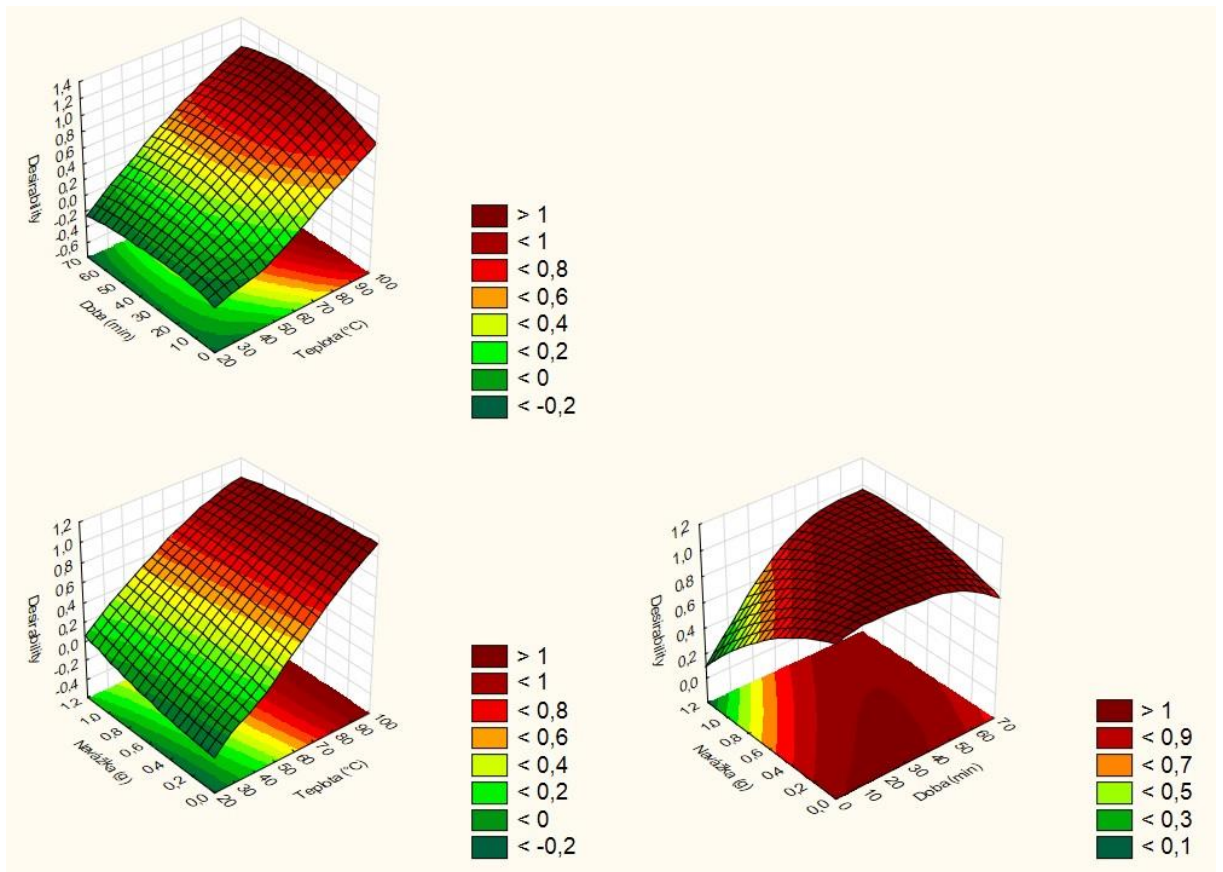
Číslo pokusu	Teplota [°C]	Doba [min]	Navážka [g]
1	41,6	19:42	0,28
2	41,6	50:18	0,83
3	78,4	19:42	0,83
4	78,4	50:18	0,28
5 C	60,0	35:00	0,55
6 C	60,0	35:00	0,55
7	41,6	19:42	0,83
8	41,6	50:18	0,28
9	78,4	19:42	0,28
10	78,4	50:18	0,83
11 C	60,0	35:00	0,55
12 C	60,0	35:00	0,55
13	30,0	35:00	0,55
14	90,0	35:00	0,55
15	60,0	10:00	0,55
16	60,0	59:59	0,55
17	60,0	35:00	0,10
18	60,0	35:00	1,00
19 C	60,0	35:00	0,55
20 C	60,0	35:00	0,55

C - centrální bod

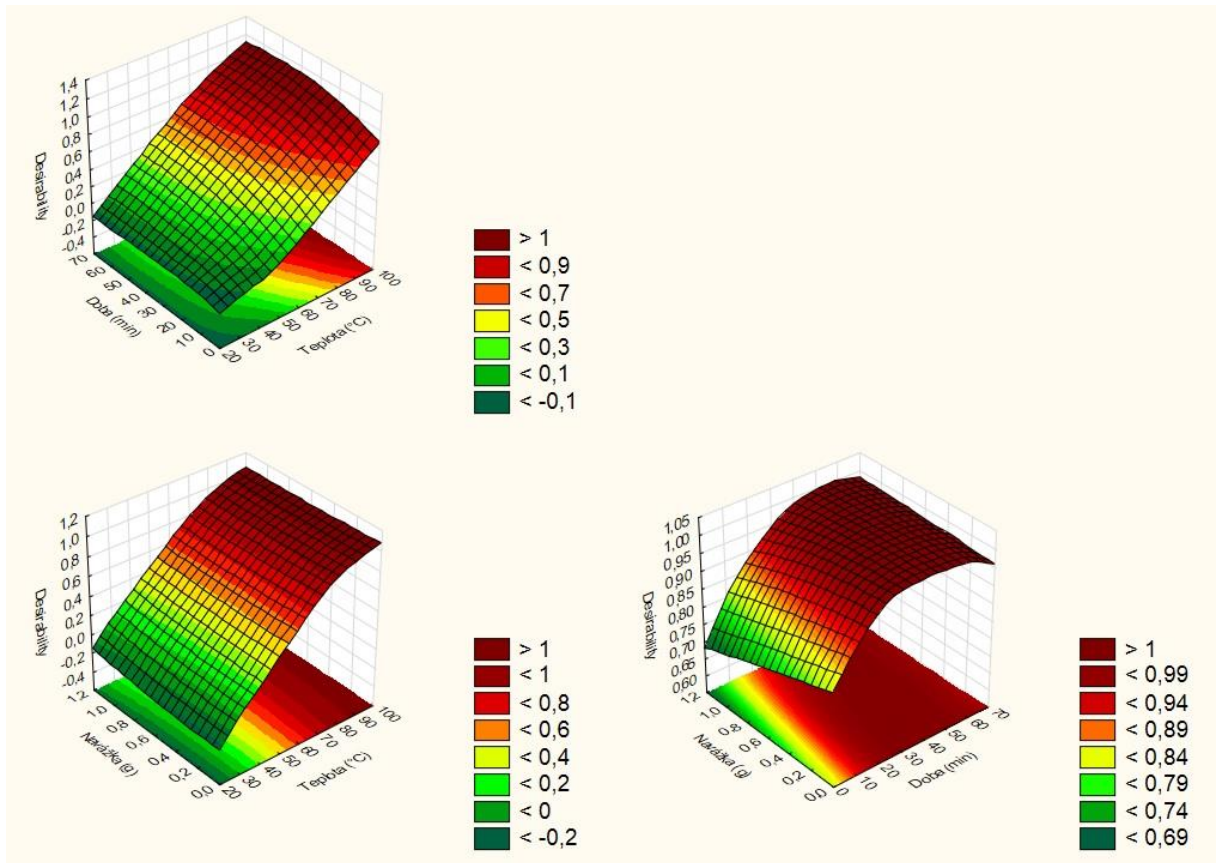
Tabulka I/2 Poměr doby první a druhé extrakce

1. krok	2. krok	celkem
06:15	18:45	25:00
13:45	41:15	55:00
18:45	06:15	25:00
41:15	13:45	55:00
20:00	20:00	40:00
05:51	34:08	40:00
34:08	05:51	40:00
09:23	09:23	18:47
30:36	30:36	1:01:12
20:00	20:00	40:00

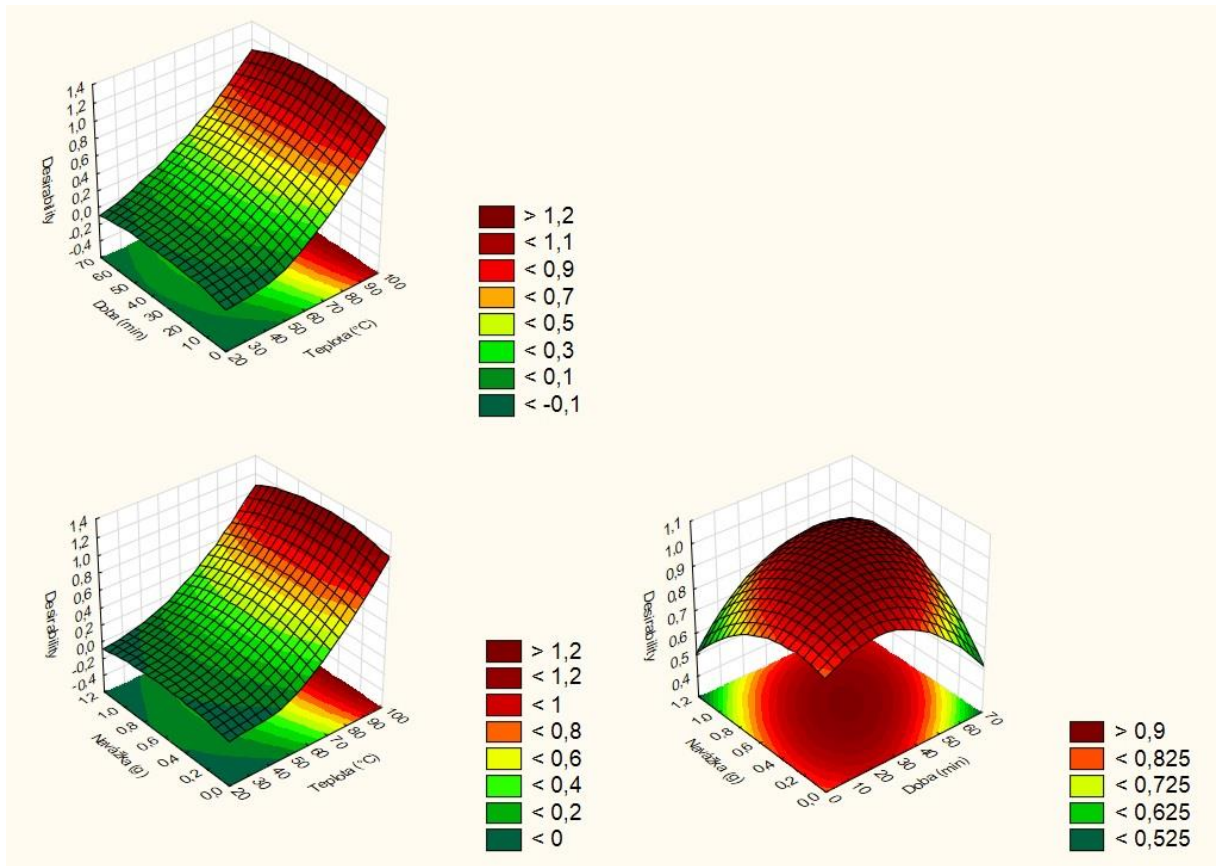
Příloha II Celkové vhodnostní profily šedého, černého a červeného vlákna



Obrázek II/1 Celkový vhodnostní profil pro šedé vlákno

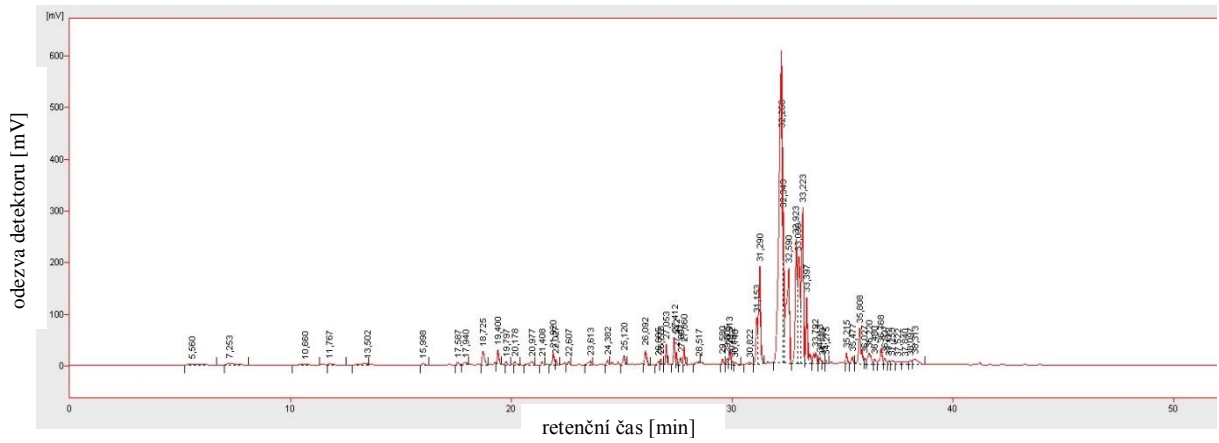


Obrázek II/2 Celkový vhodnostní profil pro černé vlákno

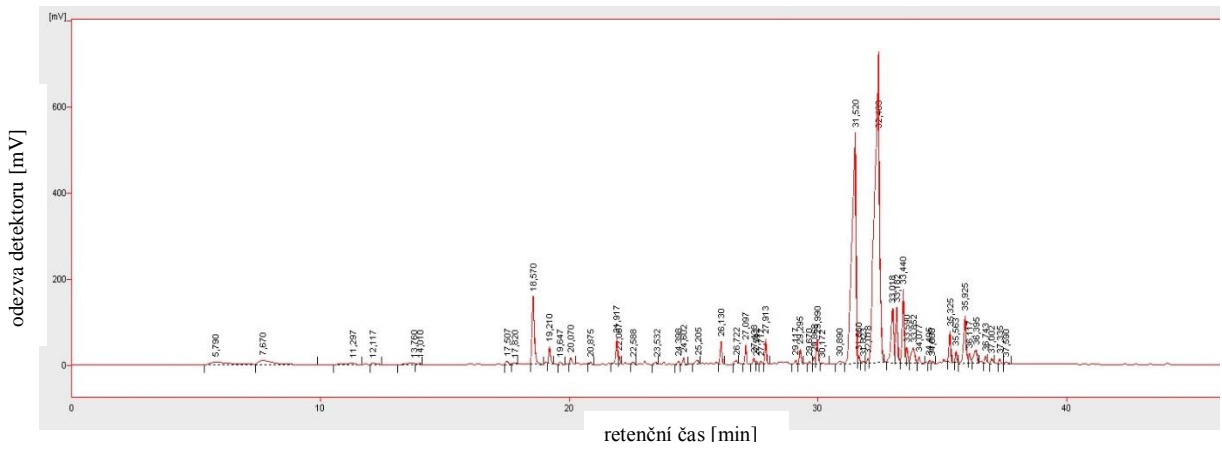


Obrázek II/3 Celkový vhodnostní profil pro červené vlákno

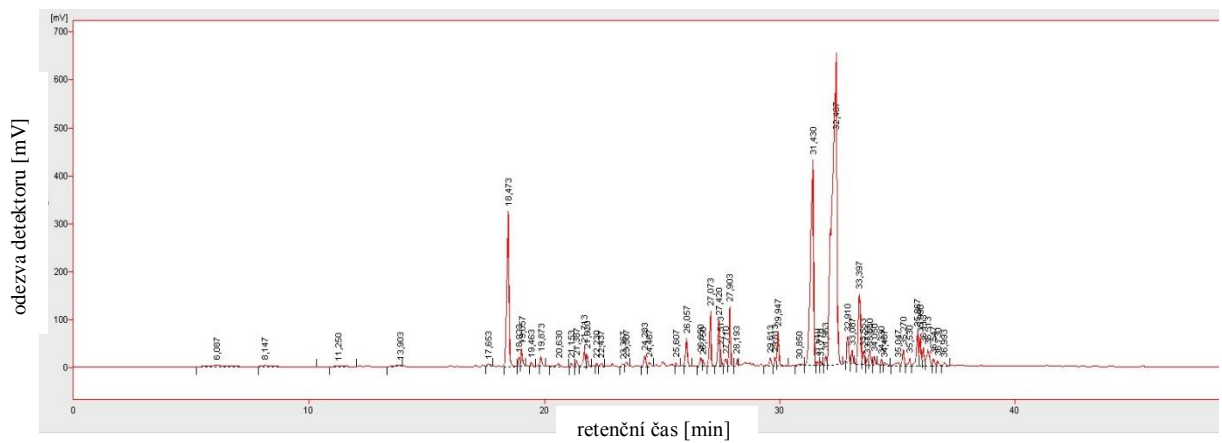
Příloha III Chromatogramy získané metodou GC-FID



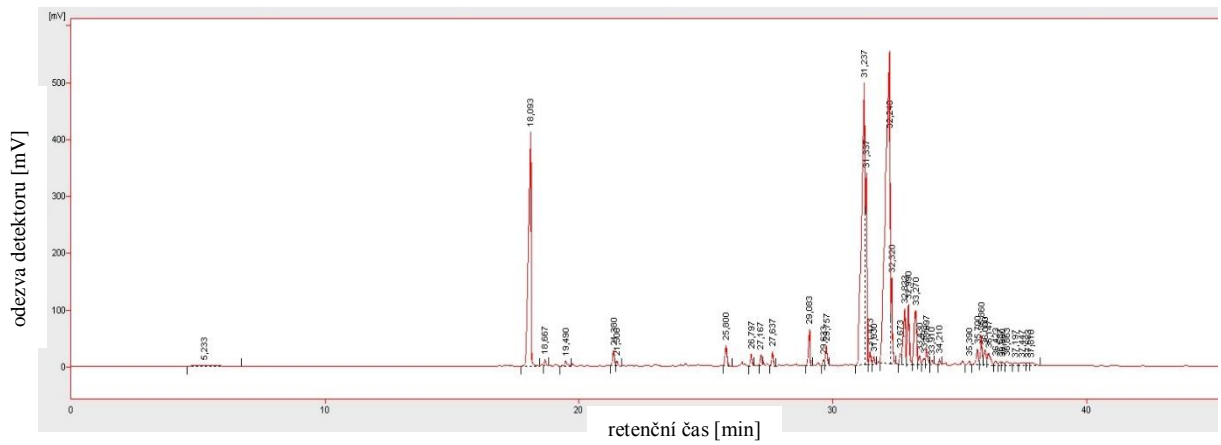
Obrázek III/1 GC-FID chromatogram odrůdy chmele Mandarin



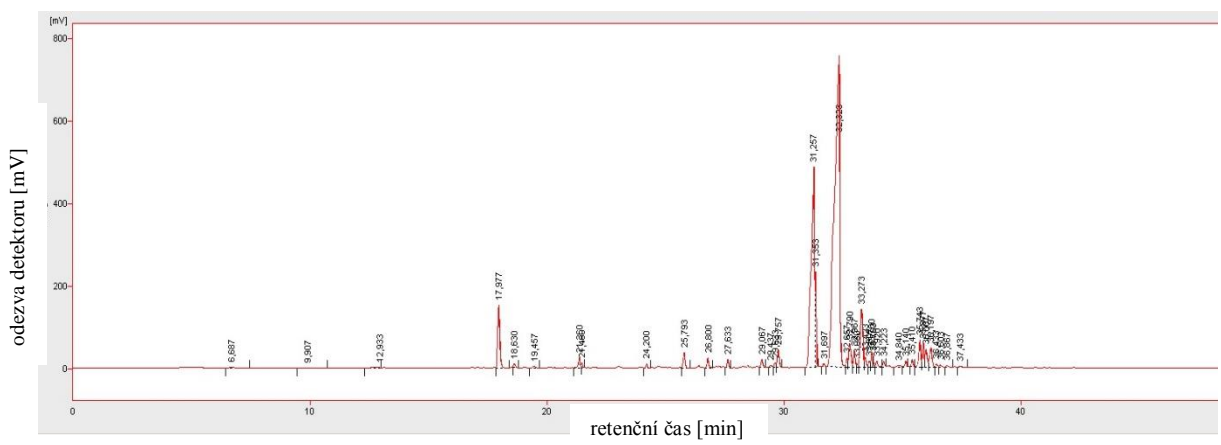
Obrázek III/2 GC-FID chromatogram odrůdy chmele Kazbek



Obrázek III/3 GC-FID chromatogram odrůdy chmele Simcoe



Obrázek III/4 GC-FID chromatogram odrůdy chmele Cascade



Obrázek III/5 GC-FID chromatogram odrůdy chmele Amarillo

Příloha IV Detekované sloučeniny metodou GC-FID

Tabulka IV/1 Retenční indexy a plochy píků detekovaných látek metodou GC-FID u odrůdy Mandarina

Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]
1	840	0,4	22	1213	0,9	43	1306	0,4
2	893	0,4	23	1215	0,4	44	1308	0,2
3	961	0,3	24	1217	0,3	45	1310	0,3
4	982	0,2	25	1220	0,6	46	1324	0,5
5	1012	0,4	26	1229	0,3	47	1328	0,5
6	1074	0,2	27	1230	0,1	48	1333	2,5
7	1079	0,3	28	1231	0,1	49	1336	0,3
8	1091	0,9	29	1244	0,2	50	1339	1,1
9	1101	0,7	30	1247	0,2	51	1342	0,4
10	1112	0,2	31	1248	0,6	52	1347	1,0
11	1123	0,4	32	1252	0,2	53	1349	0,4
12	1136	0,5	33	1261	0,2	54	1352	0,2
13	1138	0,2	34	1266	1,9	55	1354	0,4
14	1146	0,2	35	1268	5,4	56	1358	0,5
15	1160	0,3	36	1281	25,6	57	1362	0,6
16	1171	0,2	37	1283	4,9	58	1366	0,3
17	1181	0,5	38	1286	8,5	59	1369	1,0
18	1195	0,7	39	1291	5,6	60	1391	0,2
19	1203	0,2	40	1295	8,3	61	1413	0,2
20	1204	0,2	41	1297	3,5	62	1475	0,2
21	1208	0,7	42	1303	1,0			

RI^a - retenční index vypočítaný podle Van den Doola

Tabulka IV/2 Retenční indexy a plochy píků detekovaných látek metodou GC-FID u odrůdy Kazbek

Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]
1	847	1,3	20	1182	0,3	39	1284	35,2
2	903	1,6	21	1195	0,9	40	1292	3,5
3	973	0,4	22	1204	0,2	41	1294	2,5
4	989	0,2	23	1209	0,7	42	1298	4,3
5	1016	0,3	24	1214	0,2	43	1300	0,8
6	1020	0,1	25	1215	0,1	44	1304	1,4
7	1073	0,2	26	1217	0,1	45	1307	0,4
8	1077	0,2	27	1220	0,9	46	1313	0,2
9	1089	3,7	28	1237	0,2	47	1315	0,2
10	1098	0,8	29	1240	0,6	48	1326	1,4
11	1105	0,1	30	1245	0,2	49	1329	0,5
12	1110	0,3	31	1248	0,3	50	1334	3,0
13	1122	0,2	32	1249	1,1	51	1337	0,5
14	1136	1,1	33	1252	0,1	52	1341	1,2
15	1138	0,3	34	1262	0,3	53	1346	0,3
16	1146	0,1	35	1271	21,0	54	1350	0,3
17	1159	0,2	36	1273	0,3	55	1355	0,2
18	1171	0,1	37	1275	0,2	56	1359	0,2
19	1174	0,3	38	1278	0,2			

RI^a - retenční index vypočítaný podle Van den Doola

Tabulka IV/3 Retenční indexy a plochy píků detekovaných látek metodou GC-FID u odrůdy Simcoe

Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]
1	856	1	21	1172	0,2	41	1291	1,6
2	913	0,6	22	1180	0,2	42	1293	0,5
3	972	0,3	23	1204	0,3	43	1297	4,2
4	995	0,2	24	1208	2,5	44	1300	0,7
5	1018	0,3	25	1213	1,8	45	1302	0,2
6	1075	0,2	26	1215	0,5	46	1304	0,7
7	1087	7,9	27	1217	0,4	47	1307	0,4
8	1094	0,4	28	1220	2,4	48	1311	0,3
9	1096	0,8	29	1224	0,2	49	1313	0,3
10	1102	0,2	30	1229	0,3	50	1321	0,3
11	1108	0,4	31	1244	0,4	51	1325	0,7
12	1118	0,3	32	1247	0,3	52	1329	0,4
13	1129	0,2	33	1249	1,4	53	1333	1,7
14	1133	0,9	34	1262	0,1	54	1335	1,1
15	1135	0,5	35	1270	16	55	1337	0,7
16	1144	0,2	36	1272	0,2	56	1340	1,3
17	1159	0,3	37	1274	0,2	57	1343	0,3
18	1194	1,2	38	1277	0,4	58	1346	0,3
19	1202	0,4	39	1283	35,5	59	1350	0,2
20	1169	0,5	40	1289	0,2			

RI^a - retenční index vypočítaný podle Van den Doola

Tabulka IV/4 Retenční indexy a plochy píků detekovaných látek metodou GC-FID u odrůdy Cascade

Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]
1	829	0,6	15	1268	6,7	29	1309	0,3
2	1081	12,6	16	1270	0,5	30	1313	0,2
3	1090	0,3	17	1273	0,4	31	1318	0,3
4	1102	0,3	18	1275	0,2	32	1326	0,3
5	1129	0,7	19	1281	29,1	33	1331	0,8
6	1130	0,2	20	1282	3	34	1333	1,2
7	1175	0,2	21	1287	0,5	35	1335	0,8
8	1191	0,8	22	1289	2,8	36	1338	0,9
9	1205	0,4	23	1292	2,4	37	1342	0,3
10	1210	0,4	24	1296	2,9	38	1348	0,5
11	1216	0,5	25	1298	0,5	39	1353	0,3
12	1237	1,4	26	1300	0,3	40	1357	0,4
13	1246	0,8	27	1302	0,9	41	1362	0,4
14	1267	18,7	28	1305	0,3			

RI^a - retenční index vypočítaný podle Van den Doola

Tabulka IV/5 Retenční indexy a plochy píků detekovaných látek metodou GC-FID u odrůdy Amarillo

Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]	Pořadí	RI ^a	Plocha [%]
1	946	0,2	15	1249	0,9	29	1307	0,2
2	1004	0,2	16	1269	18,7	30	1309	0,3
3	1080	3,6	17	1271	3,6	31	1313	0,2
4	1090	0,2	18	1282	0,3	32	1318	0,4
5	1128	0,6	19	1287	46,5	33	1323	0,4
6	1130	0,2	20	1289	0,4	34	1327	0,4
7	1171	0,2	21	1291	1,7	35	1332	1,5
8	1199	0,7	22	1293	0,8	36	1334	1,2
9	1210	0,4	23	1296	0,2	37	1336	1,1
10	1220	0,4	24	1298	0,7	38	1338	1,6
11	1228	0,3	25	1300	0,3	39	1342	0,2
12	1239	0,5	26	1302	0,7	40	1344	0,3
13	1244	0,2	27	1303	0,4	41	1348	0,3
14	1246	0,2	28	1305	0,4	42	1356	0,2

RI^a - retenční index vypočítaný podle Van den Doola

Příloha V Detekované sloučeniny metodou GC-FID

Tabulka V/1 Identifikace látek chmele odrůdy Mandarinina

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
1	NI			704 !		0,11
2	NI			706 !		0,45
3	NI			708 !		0,08
4	NI			714 !		0,19
5	NI			716 !		0,05
6	NI			720 !		1,27
7	NI			782 !		0,07
8	NI			789 !		0,17
9	NI			792 !		0,22
10	Kyselina 3-methylbutanová	503-74-2	87	844	844	0,14
11	Kyselina 2-methylbutanová	116-53-0	85	852	851	0,10
12	Isobutyl isobutyřát	97-85-8	93	912	913	0,15
13	4,4-dimethylkrotonolakton	20019-64-1	86	947	945	0,11
14	NI			963		0,09
15	Isoamyl propionát	105-68-0	93	969	969	0,08
16	β -Pinen	127-91-3	93	980	980	0,27
17	NI			985		0,11
18	NI			987		0,08
19	Myrcen	123-35-3	96	989	989	0,70
20	Pentyl isobutyřát	2445-72-9	90	1011	1012	0,10
21	Isoamyl isobutyřát	2050-01-3	96	1014	1014	0,61
22	NI			1025		0,15
23	L-limonen	5989-54-8	91	1031	1031	0,14
24	NI			1050		0,13
25	NI			1085		0,46
26	Linalool	78-70-6	92	1100	1100	0,67
27	Kyselina isovalerová	2445-77-4	90	1107	1107	0,09
28	Metyl kaprylát	111-11-5	92	1123	1123	0,11
29	NI			1135		0,15
30	NI			1142		0,23
31	NI			1156		0,03
32	NI			1168		0,13
33	NI			1180		0,15
34	2-Dekanon	693-54-9	88	1192	1192	0,23

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
35	NI			1210		0,11
36	NI			1221		0,35
37	Methyl nonanoát	1731-84-6	89	1223	1224	0,27
38	Geraniol	106-24-1	91	1252	1252	0,28
39	NI			1257		0,24
40	Kyselina nonanová	112-05-0	85	1276	1276	0,51
41	NI			1286		0,22
42	2-Undekanon	112-12-9	97	1293	1293	0,86
43	NI			1301		0,08
44	NI			1308		1,38
45	NI			1315		0,44
46	Methyl geranát	1189-09-9	93	1322	1321	0,82
47	NI			1335		0,50
48	NI			1350		0,24
49	Kyselina kaprinová	334-48-5	83	1374	1374	0,17
50	d-Ilangen	14912-44-8	87	1377	1377	0,23
51	α -kopaen	3856-25-5	93	1384	1384	0,66
52	Seskvitužen	58319-06-5	84	1392	1392	0,17
53	2-dodekanon	6175-49-1	92	1397	1397	0,40
54	NI			1405		0,12
55	NI			1414		0,36
56	NI			1418		0,14
57	NI			1425		0,11
58	β -karyofillen	87-44-5	95	1434	1434	5,28
59	2-norpinen	17699-05-7	94	1444	1440	2,15
60	NI			1450		0,09
61	NI			1455		0,06
62	NI			1457		0,14
63	1,6,10-dodekatrien	18794-84-8	90	1461	1461	0,34
64	NI			1465		0,11
65	NI			1469		0,14
66	α -humulen	6753-98-6	96	1473	1473	15,28
67	NI					0,35
68	Eremofilen	10219-75-7	90	1487	1486	3,64
69	α -kurkumen	644-30-4	96	1492	1492	11,11
70	β -bergamoten	15438-94-5	92	1496	1493	0,65
71	β -bisabolen	495-61-4	88	1504	1504	13,40
72	α -Selinen	473-13-2	94	1513	1513	10,05
73	β -bisabolene	495-61-4	95	1518	1518	3,19
74	NI			1521		0,11

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
75	γ -kadinen	39029-41-9	94	1528	1528	1,57
76	β -kadinen	523-47-7	94	1533	1530	1,89
77	T-kalamenen	73209-42-4	88	1537	1536	1,06
78	NI					0,20
79	α -kadinen	24406-05-1	89	1552	1546	0,45
80	α -kalakoren	21391-99-1	93	1557	1554	0,46
81	NI			1566		0,40
82	NI			1577		0,33
83	NI			1581		0,10
84	NI			1592		0,23
85	NI			1598		0,11
86	NI			1603		1,09
87	NI			1610		0,23
88	NI			1618		0,49
89	NI			1632		2,37
90	Neiontermedol	5945-72-2	85	1638	1631	0,30
91	NI			1645		0,24
92	NI			1655		0,62
93	NI			1662		0,39
94	NI			1669		0,97
95	Aplotaxen	10482-53-8	81	1673	1675	0,32
96	Kongol	16641-47-7	85	1680	1676	0,87
97	NI			1685		0,15
98	NI			1691		0,4
99	α -bisabolol	515-69-5	92	1699	1698	0,80
100	NI			1715		0,16
101	Methyl tetradekanoát	124-10-7	90	1729	1729	0,57
102	NI			1732		0,06
103	NI			1745		0,09
104	NI			1758		0,11
105	NI			1795		0,15
106	NI			1838		0,14
107	Diisobutyl ftalát	84-69-5	86	1870	1870	0,11

! Mimo homologickou řadu alkanů, NI - neidentifikováno, RI^a - retenční index vypočítaný dle Van den Doola, RI^b - retenční index nalezený, A - relativní plocha, CAS – registrační číslo

Tabulka V/2 Identifikace látek chmele odrůdy Kazbek

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
1	NI			704 !		0,45
2	NI			706 !		0,29
3	NI			710 !		0,05
4	NI			714 !		0,09
5	NI			718!		0,03
6	NI			720 !		0,63
7	NI			762 !		0,04
8	NI			790 !		0,11
9	Kyselina isovalerová	503-74-2	92	845	845	0,16
10	Isobutyl isobutyřát	97-85-8	90	913	913	0,05
11	NI			923		0,05
12	4,4-dimethyl krotonolakton	20019-64-1	86	949	952	0,07
13	Benzaldehyd	100-52-7	86	965	965	0,05
14	β -Pinen	127-91-3	96	982	982	0,37
15	NI			986		0,1
16	β -myrcen	123-35-3	98	991	991	2,07
17	Isoamyl isobutyřát	2050-01-3	95	1016	1015	0,45
18	NI			1027		0,09
19	L-limonen	5989-54-8	94	1032	1031	0,2
20	NI			1039		0,09
21	NI			1057		0,15
22	NI			1060		0,08
23	2-nonanon	821-55-6	88	1092	1092	0,1
24	Linalool	78-70-6	94	1102	1102	1,16
25	Amyl isovalerát	25415-62-7	91	1109	1108	0,06
26	NI			1119		0,09
27	NI			1132		0,09
28	Hexyl isobutyřát	2349-07-7	88	1148	1148,5	0,07
29	NI			1166		0,1
30	NI			1175		0,12
31	NI			1189		0,22
32	2-dekanon	693-54-9	93	1193	1193	0,15
33	NI			1223		0,36
34	Heptyl isobutyřát	2349-13-5	86	1246	1248	0,06
35	Geraniol	106-24-1	94	1254	1254	0,74
36	NI			1262		0,13
37	Geranial	141-27-5	86	1271	1271	0,09
38	NI			1274		0,08
39	NI			1278		0,15

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
40	2-undekanon	112-12-9	96	1294	1294	0,85
41	Perill alkohol	536-59-4	87	1306	1305	0,11
42	NI			1309		0,32
43	NI			1314		0,13
44	Methyl geraniát	2349-14-6	94	1324	1324	1,06
45	Oktyl isobutyrát	109-15-9	83	1346	1348	0,06
46	α -kubeben	17699-14-8	91	1354	1354	0,24
47	NI			1360		0,19
48	NI			1363		0,25
49	NI			1365		0,13
50	NI			1371		0,08
51	Ylangen	14912-44-8	91	1379	1378	0,36
52	Geranyl acetát	105-87-3	95	1382	1382	0,69
53	α -kopaen	3856-25-5	95	1386	1386	1,23
54	NI			1399		0,25
55	Iso karyofillen	118-65-0	82	1417	1416	0,26
56	β -karyofillen	87-44-5	95	1440	1440	17,52
57	β -kopaen	18252-44-3	94	1446	1442	1,33
58	NI			1450		0,12
59	NI			1453		0,07
60	NI			1459		0,32
61	NI			1463		0,39
62	NI			1465		0,04
63	NI			1470		0,3
64	α -humulen	6753-98-6	97	1478	1476	23,12
65	NI			1484		0,18
66	γ -murolen	30021-74-0	94	1489	1489	3,6
67	α -amorfen	20085-19-2	85	1493	1493	0,46
68	1-pentadekaen	13360-61-7	88	1497	1494	0,36
69	β -selinen	17066-67-0	96	1505	1506	3,9
70	α -selinen	473-13-2	93	1513	1513	6,54
71	β -kadinen	39029-41-9	95	1530	1530	2,72
72	δ -kadinen	483-76-1	94	1535	1535	3,6
73	T-kalamenen	73209-42-4	91	1539	1540	1,06
74	E-kadin -1,4- dien	38758-02-0	92	1550	1548	0,55
75	α -kadinen	24406-05-1	89	1554	1546	0,77
76	kalakoren	38599-17-6	95	1559	1560	0,44
77	NI			1567		0,19
78	E-nerolidol	40716-66-3	92	1572	1572	0,96
79	NI			1579		0,77
80	NI			1582		0,27
81	NI			1594		0,22

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
82	Karyofillen oxid	1139-30-6	91	1604	1604	2,8
83	NI			1609		0,34
84	NI			1621		0,75
85	NI			1256		0,13
86	NI			1635		3,4
87	NI			1346		0,25
88	Epikubenol	19912-67-5	85	1650	1643	0,32
89	NI			1658		0,74
90	τ -kadinol	5937-11-1	85	1663	1659	0,49
91	NI			1671		1,17
92	NI			1676		0,4
93	NI			1679		0,95
94	NI			1694		0,41
95	NI			1699		0,26
96	NI			1708		0,07
97	NI			1714		0,06
98	NI			1420		0,03
99	<i>cis</i> -farnesol	3790-71-4	92	1729	1722	0,43
100	NI			1732		0,36
101	NI			1738		0,02
102	NI			1745		0,12
103	Geranil kaproát	10032-02-7	81	1757	1755,7	0,1
104	NI			1759		0,03
105	NI			1763		0,14
106	NI			1778		0,06
107	NI			1788		0,1
108	NI			1794		0,1
109	NI			1805		0,08
110	NI			1818		0,06
111	NI			1830		0,1
112	Farnesyl acetát	4128-17-0	83	1840	1839	0,1
113	Diisobutyl ftalát	84-69-5	83	1872	1871,8	0,07
114	NI			1880		0,06
115	NI			1892		0,05

! Mimo homologickou řadu alkanů, NI - neidentifikováno, RI^a - retenční index vypočítaný dle Van den Doola, RI^b - retenční index nalezený, A - relativní plocha, CAS – registrační číslo

Tabulka V/3 Identifikace látek chmele odrůdy Simcoe

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
1	NI			704 !		0,19
2	NI			707 !		0,12
3	NI			710 !		0,05
4	NI			714 !		0,08
5	NI			720 !		0,22
6	NI			762 !		0,06
7	NI			783 !		0,06
8	NI			790 !		0,07
9	Kyselina isovalerová	503-74-2	94	845	845	0,30
10	α -pinen	80-56-8	90	935	935	0,06
11	4,4-dimethyl krotonolakton	20019-64-1	85	949	952	0,05
12	Isoamyl propionát	105-68-0	92	970	969	0,10
13	β -pinen	127-91-3	89	981	981	0,27
14	β -myrcen	123-35-3	97	991	991	4,57
15	NI					0,10
16	Isoamyl butyrát	106-27-4	93	1012	1013	0,33
17	Isoamyl isobutyřát	2050-01-3	96	1015	1015	0,6
18	Methyl heptanoát	106-73-0	82	1023	1025	0,07
19	NI			1027		0,25
20	Limonen	138-86-3	95	1032	1032	0,34
21	1-octanol	111-87-5	85	1072	1072	0,07
22	Kyselina heptanová	111-14-8	86	1083	1083	0,17
23	NI			1086		0,20
24	2-nonanon	821-55-6	96	1092	1092	0,39
25	Linalool	78-70-6	91	1102	1102	1,41
26	Solusterol	659-70-1	82	1106	1106	0,14
27	Isoamyl isovalerát	25415-62-7	94	1109	1108	0,27
28	Methyl octanoát	111-11-5	92	1124	1124	0,18
29	NI			1136		0,09
30	NI			1140		0,11
31	Hexyl isobutyřát	2349-07-7	88	1148	1148	0,12
32	NI			1153		0,24
33	NI			1169		0,13
34	NI			1189		0,19
35	2-dekanon	693-54-9	85	1193	1193	0,80
36	NI			1204		0,07
37	NI			1211		0,11
38	NI			1219		0,21
39	Methyl nonanoát	1731-84-6	88	1224	1224	0,23
40	NI			1236		0,06
41	Heptyl isobutyřát	2349-13-5	92	1246	1248	0,22

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
42	Geraniol	106-24-1	95	1254	1254	0,55
43	NI			1258		0,71
44	NI			1269		0,14
45	NI			1278		0,50
46	NI			1281		0,08
47	NI			1288		0,32
48	2-undekanon	112-12-9	97	1295	1295	3,58
49	NI			1301		0,06
50	NI			1307		0,10
51	NI			1310		2,96
52	NI			1315		0,74
53	Methyl geraniát	2349-14-6	93	1325	1325	3,30
54	NI			1330		0,06
55	Oktyl isobutyrát	109-15-9	93	1346	1348	0,30
56	NI			1358		0,07
57	2-methyl-1-undekanal	110-41-8	82	1368	1363	0,50
58	NI			1374		0,09
59	Kyselina n-dekanová	334-48-5	80	1376	1376	0,18
60	Ylangen	14912-44-8	93	1379	1378	0,57
61	α -kopaen	3856-25-5	95	1386	1387	1,68
62	2-dodekanon	6175-49-1	94	1399	1401	0,53
63	NI		81	1417	1417	0,18
64	Karyofillen	87-44-5	95	1439	1439	15,00
65	β -kopaen	18252-44-3	92	1445	1442	0,74
66	NI			1447		0,05
67	NI			1452		0,28
68	NI			1459		0,28
69	NI			1463		0,22
70	NI			1470		0,28
71	α -humulen	6753-98-6	97	1477	1476	23,37
72	NI			1483		0,18
73	γ -murolen	30021-74-0	94	1489	1489	2,86
74	α -amorfen	483-75-0	87	1492	1490	0,39
75	1-dodekanol	112-53-8	82	1497	1490	0,31
76	2-tridekanon	593-08-8	94	1501	1500	2,06
77	NI			1507		0,88
78	β -selinen	17066-67-0	89	1512	1509	3,06
79	β -kadinen	39029-41-9	95	1530	1531	2,25
80	δ -kadinen	483-76-1	93	1534	1534	2,64
81	L-kalamenen	483-77-2	92	1538	1538	0,84
82	NI			1545		0,07
83	E-kadin-1,4-dien	38758-02-0	90	1550	1548	0,36

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
84	α -kadinen	24406-05-1	91	1554	1546	0,56
85	α -kalakoren	21391-99-1	92	1559	1560	0,47
86	NI			1563		0,11
87	NI			1570		0,41
88	NI			1579		0,49
89	NI			1587		0,17
90	NI			1592		0,17
91	NI			1600		0,02
92	NI			1603		1,59
93	NI			1610		0,15
94	NI			1616		0,07
95	NI			1621		0,42
96	NI			1628		0,09
97	NI			1634		2,08
98	NI			1645		0,19
99	NI			1650		0,25
100	NI			1657		0,74
101	τ -kadinol	5937-11-1	82	1663	1665	0,43
102	NI			1671		1,51
103	NI			1674		0,2
104	NI			1680		0,93
105	NI			1692		0,19
106	NI			1701		0,37
107	2-pentadekanon	2345-28-0	90	1705	1705	0,47
108	NI			1725		0,11
109	NI			1739		0,13
110	NI			1750		0,09
111	NI			1769		0,13
112	NI			1778		0,07
113	NI			1782		0,08
114	NI			1799		0,02
115	NI			1808		0,05
116	NI			1817		0,15
117	NI			1826		0,07
118	NI			1849		0,11
119	NI			1863		0,09
120	Diisobutyl ftalát	84-69-5	91	1872	1871	0,14
121	NI			1879		0,06

! Mimo homologickou řadu alkanů, NI - neidentifikováno, RI^a - retenční index vypočítaný dle Van den Doola, RI^b - retenční index nalezený, A - relativní plocha, CAS – registrační číslo

Tabulka V/4 Retenční časy a plocha píků detekovaných látek u odrůdy Cascade

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
1	NI			702 !		0,75
2	NI			704 !		0,29
3	NI			706 !		0,07
4	NI			709 !		0,11
5	NI			720 !		0,10
6	β -pinen	127-91-3	83	982	982	0,21
7	NI			985		0,1
8	β -myrcen	123-35-3	97	993	993	9,84
9	NI			995		0,12
10	NI			997		0,17
11	NI			999		0,03
12	NI			1003		0,08
13	NI			1006		0,12
14	NI			1008		0,11
15	NI			1009		0,12
16	NI			1010		0,12
17	Isoamyl isobutyrát	2050-01-3	90	1012	1013	0,19
18	2-methylbutyl isobutyrát	2445-69-4	94	1016	1016	0,39
19	NI			1025		0,17
20	L-limonen	5989-54-8	93	1032	1031	0,37
21	t- β -ocimen	3779-61-1	87	1047	1047	0,07
22	Linalool	78-70-6	92	1102	1102	0,72
23	NI			1186		0,08
24	Geraniol	106-24-1	95	1254	1254	0,58
25	2-methyl-dekanal	19009-56-4	83	1258	1251	0,12
26	NI			1278		0,12
27	2-undekanon	112-12-9	96	1294	1294	0,45
28	NI			1309		0,49
29	NI			1316		0,13
30	Methyl geraniát	2349-14-6	94	1324	1324	0,49
31	NI			1338		0,21
32	NI			1349		0,17
33	Geranyl acetát	105-87-3	95	1382	1382	1,54
34	α -kopaen	3856-25-5	93	1385	1385	0,82
35	2-dodekanon	6175-49-1	90	1399	1397	0,15
36	Karyofillen	87-44-5	95	1437	1437	12,01
37	2-norpinen	17699-05-7	94	1446	1449	1,65
38	β -farnesen	18794-84-8	94	1466	1467	13,94

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
39	NI			1470		0,03
40	α -humulen	6753-98-6	96	1477	1477	24,74
41	NI			1486		0,05
42	γ -murolen	30021-74-0	94	1489	1489	2,41
43	α -amorfen	483-75-0	83	1493	1495	0,25
44	(Z,E)- α -farnesen	26560-14-5	92	1497	1497	0,72
45	2-tridekanon	593-08-8	93	1501	1500	0,76
46	β -selinen	17066-67-0	95	1504	1506	2,99
47	α -selinen	473-13-2	92	1513	1513	5,48
48	β -bisabolen	495-61-4	90	1519	1519	0,41
49	γ -bisabolen	53585-13-0	80	1524	1525	0,11
50	β -kadinen	39029-41-9	94	1530	1530	1,59
51	δ -kadinen	483-76-1	94	1534	1534	2,60
52	NI			1539		0,67
53	E-kadin-1,4-dien	38758-02-0	91	1550	1548	0,33
54	NI			1554		0,45
55	β -kalakoren	50277-34-4	91	1559	1559	0,35
56	NI			1568		0,10
57	NI			1573		0,6
58	NI			1579		0,55
59	NI			1590		0,49
60	NI			1612		0,22
61	NI			1621		0,21
62	NI			1634		0,9
63	NI			1640		0,19
64	NI			1651		0,15
65	NI			1657		0,66
66	τ -kadinol	5937-11-1	82	1663	1660	0,40
67	NI			1671		2,03
68	NI			1675		0,93
69	NI			1680		0,56
70	NI			1693		0,14
71	NI			1725		0,21
72	NI			1769		0,18
73	NI			1812		0,14
74	Diisobutyl ftalát	84-69-5	94	1872	1873	0,20

! Mimo homologickou řadu alkanů, NI - neidentifikováno, RI^a - retenční index vypočítaný dle Van den Doola, RI^b - retenční index nalezený, A - relativní plocha, CAS – registrační číslo

Tabulka V/5 Retenční časy a plocha píků detekovaných látek u odrůdy Amarillo

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
1	NI			704 !		0,23
2	NI			706 !		0,06
3	NI			709 !		0,07
4	NI			714 !		0,09
5	NI			720 !		0,10
6	Kyselina isovalerová	503-74-2	93	842	842	0,22
7	β-pinen	127-91-3	82	981	981	0,11
8	β-myrcen	123-35-3	98	991	991	4,02
9	2-methylbutyl isobutyryát	2445-69-4	95	1015	1015	0,23
10	NI			1025		0,06
11	L-limonen	5989-54-8	93	1032	1031	0,11
12	Linalool	78-70-6	92	1102	1102	0,68
13	NI			1104		0,06
14	Isoamyl isovalerát	25415-62-7	92	1109	1108	0,10
15	NI			1189		0,16
16	2-dekanon	693-54-9	87	1193	1193	0,06
17	2-methyl-2-dekanol	3396-02-9	83	1220	1230	0,12
18	Nerol	106-25-2	94	1254	1254	0,47
19	2-methyl-dekanal	19009-56-4	86	1258	1251	0,10
20	NI			1268		0,11
21	2-undekanon	112-12-9	97	1294	1294	0,48
22	NI			1301		0,07
23	NI			1309		0,10
24	NI			1318		0,09
25	Methyl geranoát	1189-09-9	93	1324	1324	0,37
26	α-kubeben	17699-14-8	84	1355	1355	0,09
27	2-methyl-1-undekanal	110-41-8	83	1361	1363	0,32
28	NI			1369		0,17
29	Ylangen	14912-44-8	87	1379	1379	0,30
30	Geranyl acetát	105-87-3	92	1382	1382	0,40
31	α-kopaen	3856-25-5	94	1386	1385	1,08
32	2-dodekanon	6175-49-1	91	1399	1401	0,24
33	NI			1415		0,21
34	NI			1421		0,14
35	Karyofillen	87-44-5	95	1438	1438	13,35
36	<i>trans</i> -α-bergamoten	13474-59-4	89	1446	1446	1,86
37	NI			1455		0,33
38	NI			1463		0,21

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
39	β -farnesen	18794-84-8	95	1467	1467	7,89
40	α -humulen	6753-98-6	97	1478	1480	30,39
41	NI			1482		0,23
42	γ -murolen	30021-74-0	95	1489	1489	2,96
43	α -amorfen	483-75-0	89	1493	1495	0,44
44	(Z,E)- α -farnesen	26560-14-5	94	1497	1497	0,82
45	2-tridekanon	593-08-8	96	1501	1500	1,04
46	β -selinen	17066-67-0	92	1504	1507	1,27
47	Valenen	4630-07-3	90	1512	1513	2,68
48	β -bisabolen	495-61-4	91	1519	1519	0,61
49	NI			1525		0,22
50	β -kadinen	39029-41-9	95	1530	1530	2,39
51	δ -kadinen	483-76-1	94	1535	1535	3,19
52	T-kalamenen	73209-42-4	85	1539	1540	0,92
53	E-kadin-1,4-dien	38758-02-0	92	1550	1548	0,65
54	α -kadinen	24406-05-1	88	1554	1546	0,68
55	α -kalakoren	21391-99-1	93	1559	1560	0,49
56	NI			1562		0,16
57	NI			1568		0,29
58	NI			1574		0,62
59	NI			1579		0,91
60	NI			1583		0,27
61	NI			1589		0,33
62	NI			1592		1,01
63	NI			1599		0,26
64	NI			1613		0,12
65	NI			1621		0,60
66	NI			1630		0,15
67	NI			1635		2,32
68	NI			1642		0,30
69	Epikubenol	19912-67-5	81	1650	1643	0,29
70	Alloaromadendren	85760-81-2	81	1658	1650	1,40
71	τ -kadinol	5937-11-1	82	1663	1665	0,59
72	NI			1671		1,89
73	Aplotaxen	10482-53-8	83	1676	1675	1,14
74	NI			1680		0,75
75	NI			1690		0,07
76	NI			1699		0,17
77	NI			1715		0,35
78	NI			1729		0,04

Pořadí	Název sloučeniny	CAS	Shoda [%]	RI ^a	RI ^b	A [%]
79	NI			1739		0,48
80	NI			1750		0,08
81	NI			1756		0,08
82	NI			1768		0,15
83	NI			1776		0,25
84	NI			1785		0,12
85	NI			1802		0,15
86	NI			1819		0,18
87	NI			1829		0,11
88	NI			1835		0,11
89	NI			1848		0,09
90	NI			1861		0,13
91	Diisobutyl ftalát	84-69-5	94	1873	1873	0,12
92	Methyl hexadekanoát	112-39-0	86	1930	1930	0,08

! Mimo homologickou řadu alkanů, NI - neidentifikováno, RI^a - retenční index vypočítaný dle Van den Doola, RI^b - retenční index nalezený, A - relativní plocha, CAS – registrační číslo