

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Martina Joklíková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza hořkých kyselin v pivu s využitím extrakce na míchací tyčince

Bc. Martina Joklíková

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Joklíková**
Osobní číslo: **C17484**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Analýza hořkých kyselin v pivu s využitím extrakce na míchací tyčince**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Vypracujte literární rešerši zabývající se rozvojem technik mikroextrakce využívajících tuhé sorbenty. Zaměřte se především na metodu extrakce na míchací tyčince (Stir Bar Sorptive Extraction - SBSE) a její modifikace. Popište možnosti kombinace uvedených technik se separačními, a to především s technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Dále se zaměřte na analýzu složek piva, a to včetně rozdílů ve složení piv vyrobených klasickým způsobem chmelení a postupem tzv. studeného chmelení.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek extrakční techniky SBSE pro izolaci α - a β - hořkých kyselin ze vzorků piva s následnou analýzou pomocí HPLC. Provéřte různé varianty dané metody (klasický postup vs. rozpouštědlem asistovaný postup). Navržené metody vzájemně porovnejte prostřednictvím analýzy piv vyrobených výše zmíněnými postupy chmelení a proveřte, zda je možné na základě analýzy hořkých kyselin dokázat, že byl při výrobě piva použit postup tzv. studeného chmelení.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.


Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a 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 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

.....

Bc. Martina Joklíková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady, ochotu a čas při konzultacích a pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a příteli za velkou morální podporu a motivaci po celou dobu mého studia.

Anotace

Tato diplomová práce je zaměřena na využití mikroextrakce na míchací tyčince ve spojení s kapalinovou chromatografií s UV detekcí pro stanovení α - a β -hořkých kyselin v klasických pivech a v pivech za studena chmelených. V teoretické části jsou popsány různé metody mikroextrakce tuhou fází, zejména mikroextrakce na míchací tyčince, její modifikace a spojení s kapalinovou chromatografií. Diplomová práce je zaměřena i na výrobu piva, popis a analýzu látek obsažených v tomto nápoji. V experimentální části byly nejprve optimalizovány podmínky extrakce míchací tyčinkou pro izolaci α - a β -hořkých kyselin s následnou analýzou pomocí HPLC. Nejvhodnější podmínky mikroextrakce hořkých kyselin byly následně aplikovány na reálné vzorky piv. Byly porovnány výsledky analýz piv chmelených klasicky a piv chmelených za studena.

Klíčová slova

Mikroextrakce na míchací tyčince, kapalinová chromatografie, pivo, chmelení za studena, hořké kyseliny

Title

Analysis of bitter acids in beer using stir bar sorptive extraction

Annotation

This thesis deals with the use of stir bar sorptive extraction followed by liquid chromatography with UV detection for the determination of α - and β -bitter acids in classical beer and dry-hopped beer. In the theoretical part there are described various methods of solid phase microextraction, in particular, the stir bar sorptive extraction, its modifications and its connection with liquid chromatography. The thesis is also focused on beer production and description and analysis of substances contained in this beverage. In the experimental part, the conditions of the stir bar sorptive extraction were optimized for isolation of α - and β -bitter acids followed by HPLC analysis. The best conditions for microextraction of bitter acids were subsequently applied to real beer samples. The results of the analysis of classical beers and dry-hopped beers were compared.

Keywords

Stir bar sorptive extraction; Liquid chromatography; Beer; Dry-hopping; Bitter acids.

OBSAH

Úvod	15
1 Teoretická část.....	16
1.1 Pivo	16
1.1.1 Suroviny	16
1.1.1.1 Voda	16
1.1.1.2 Slad	17
1.1.1.3 Chmel	18
1.1.1.4 Pivovarské kvasinky	19
1.1.2 Výroba piva	20
1.1.2.1 Šrotování sladu	20
1.1.2.2 Vystírání a rmutování	21
1.1.2.3 Scezování mladiny	23
1.1.2.4 Chmelovar	23
1.1.2.5 Separace hrubých kalů a chlazení mladiny	23
1.1.2.6 Kvašení, dokvašování a zrání mladiny	24
1.1.2.7 Filtrace	24
1.1.3 Složky piva a jejich analýza	25
1.1.3.1 Složky piva	25
1.1.3.2 Analýzy piva	30
1.2 Mikroextrakční techniky využívající tuhou fázi	34
1.2.1 Princip mikroextrakce tuhou fází	34
1.2.2 Faktory ovlivňující sorpci	36
1.2.3 Mikroextrakce se sorbentem v mikrostříkačce	37
1.2.3.1 Popis mikrostříkačky	37
1.2.3.2 Popis extrakce	39
1.2.3.3 Srovnání s jinými mikroextrakčními metodami	39

1.2.4	Mikroextrakce na míchací tyčince.....	40
1.2.4.1	Popis mikroextrakce na míchací tyčince	41
1.2.4.2	Derivatizace pro mikroextrakci na míchací tyčince	42
1.2.4.3	Rozpouštědlem asistovaná extrakce	43
1.2.4.4	Zakoncentrování mrazem	45
1.2.4.5	Extrakce v otevřeném/uzavřeném systému	47
1.2.4.6	Typy desorpce	48
1.2.4.7	Mikroextrakce při analýze nápojů	49
1.3	Kapalinová chromatografie.....	51
2	Experimentální část	53
2.1	Instrumentace a chemikálie.....	53
2.1.1	Kapalinový chromatograf s detekcí diodovým polem.....	53
2.1.2	Ostatní zařízení.....	53
2.1.3	Chemikálie a standardy	53
2.2	Vzorky piva.....	55
2.3	Pracovní postupy.....	56
2.3.1	Příprava kalibrační řady pro kvantifikaci	56
2.3.2	Extrakce na míchací tyčince s povrchem z polydimethylsiloxanu.....	56
2.3.3	Extrakce na míchací tyčince s povrchem z ethylenglykolu.....	56
2.3.4	Rozpouštědlem asistovaná extrakce na míchací tyčince	57
2.3.5	Extrakce vzorků pív.....	57
2.4	Analýza extraktů	58
3	Výsledky a diskuze	59
3.1	Kalibrační závislosti.....	59
3.2	Optimalizace metod	69
3.2.1	Výběr desorpčního rozpouštědla po extrakci na míchadélku s vrstvou polydimethylsiloxanu	69

3.2.2	Výběr desorpčního rozpouštědla po extrakci na míchadélku s vrstvou ethylenglykolu	70
3.2.3	Optimalizace podmínek extrakce	71
3.2.4	Optimalizace rozpouštědlem asistované extrakce na míchadélku.....	72
3.3	Obsah hořkých kyselin ve vzorcích piva	74
4	Závěr.....	84
5	Použitá literatura	85
Přílohy	92

Seznam zkratek

ASBC	American Society of Brewing Chemists; Americká společnost pivovarských chemiků
BIN	Barrel Insert and Needle Assembly; sestava jehly se sorbentem
DAD	Diode Array Detector; detektor s diodovým polem
DI – SPME	Direct Immersion Solid Phase Microextraction; přímá mikroextrakce tuhou fází
DVB	Divinylbenzene; divynilbenzen
EBC	European Brewery Convention; Evropská pivovarská konvence
EBU	European Bitter Units; Evropské jednotky hořkosti
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector; detektor rozptylu světla
FC	Freeze Concentration; zakoncentrování mrazem
ET	Electronic Tongues; elektronický jazyk
FLD	Fluorescence Detector; fluorescenční detektor
GC	Gas Chromatography; plynová chromatografie
GC-FID	Gas Chromatography Flame Ionization Detector; plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry; plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS – SPME	Headspace Solid Phase Microextraction; headspace mikroextrakce tuhou fází
HSSE	Headspace Sorptive Extraction; headspace extrakce na míchací tyčince
ICECLES	Ice Concentration Linked with Extractive Stirrer; zakoncentrování mrazem s extrakcí na míchací tyčince
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy; atomová emisní spektrometrie s indukčně vázanou plasmou
IPA	India Pale Ale
IR	Infrared Spectrometry; infračervená spektrometrie
LC	Liquid Chromatography; kapalinová chromatografie

LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
LOD	Limit of Detection; mez detekce
LOQ	Limit of Quantification; mez stanovitelnosti
MESCO	Membrane Enclosed Sorptive Coating; membránou uzavřená sorpční vrstva
MEPS	Microextraction by Packed Sorbent; mikroextrakce se sorbentem v mikrostríkačce
MF	Mobile Phase; mobilní fáze
MIP	Molecularly Imprinted Polymer; molekulárně vtištěný polymer
NEIPA	New England India Pale Ale
NMR	Nuclear Magnetic Resonance; nukleární magnetická resonance
PA	Polyacrylate; polyakrylát
PAH	Polyaromatic Hydrocarbons; polyaromatické uhlovodíky
PDMS	Polydimethylsiloxane; polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylene Glycol; polyethylenglykol
PET	Polyethylene Terephthalate; polyethylentereftalát
RSD	Relative Standard Deviation; relativní směrodatná odchylka
SA-SBSE	Sorbent Assisted Stir Bar Sorptive Extraction; rozpouštědlem asistovaná mikroextrakce na míchací tyčince
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction; mikroextrakce na míchací tyčince
SHS	Static Headspace Sampling; statické headspace vzorkování
SPE	Solid Phase Extraction; extrakce tuhou fází
SPME	Solid Phase Microextraction; mikroextrakce tuhou fází
TD	Thermal Desorption; termální desorpce
TDU	Thermal Desorption Unit; termodesorpční jednotka
UA-DLLME-SFO	Ultrasound Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on the Solidification of a Floating Organic Droplet; ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce s využitím ztuhnutí organické kapky

Seznam tabulek

Tabulka 1- Tvrdost vody [4]	17
Tabulka 2- Vlastnosti a složení sladů [5].....	18
Tabulka 3- Porovnání svrchního a spodního kvašení [4, 16]	24
Tabulka 4- Anorganické složky piva [19]	26
Tabulka 5- Složky piva [19]	26
Tabulka 6- Nefermentované cukry v pivu [19]	27
Tabulka 7- Vitamíny skupiny B v pivu [19].....	27
Tabulka 8- Alkoholy přítomné v pivu [19].....	28
Tabulka 9- Chmelové silice v pivu [19]	29
Tabulka 10- Srovnání metod extrakce tuhou fází [42]	40
Tabulka 11- Absorbovaná rozpouštědla na PDMS před a po SA-SBSE [54]	45
Tabulka 12- Složení standardu ICE-3 a retenční časy hořkých kyselin	59
Tabulka 13- Rovnice regrese s koeficientem determinace jednotlivých kalibračních závislostí	61
Tabulka 14- Rovnice regrese s koeficientem determinace jednotlivých kalibračních závislostí po extrakci SBSE-PDMS	63
Tabulka 15- Rovnice regrese s koeficientem determinace jednotlivých kalibračních závislostí po extrakci SBSE-EG	66
Tabulka 16- Rovnice regrese s koeficientem determinace jednotlivých kalibračních závislostí po extrakci SA-SBSE-PDMS	68
Tabulka 17- Hodnoty limitů detekce a kvantifikace.....	68
Tabulka 18- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Bakalář (n = 6)	75
Tabulka 19- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Lobkowitz (n = 6)	76
Tabulka 20- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Primátor (n = 6).....	77
Tabulka 21- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Krušovice (n = 6)	78
Tabulka 22- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Svijany (n = 6).....	79
Tabulka 23- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Postřižinské (n = 6)	80
Tabulka 24- Obsah α -hořkých kyselin v pivu New England IPA (n = 6)	81

Seznam ilustrací

Obrázek 1- Rozdělení pryskyřic chmele [7]	18
Obrázek 2- Izomerace α -hořkých kyselin [9]	19
Obrázek 3- Technologie výroby piva [12].....	20
Obrázek 4- Schéma dvourmutového postupu [15]	22
Obrázek 5- Schéma třířmutového postupu [15].....	22
Obrázek 6- Chemická struktura složek silic chmele [20]	29
Obrázek 7- Chromatogram analýzy složek piva pomocí GC-FID [22].....	30
Obrázek 8- Chromatogramy Cu (a), Fe (b)[23].....	31
Obrázek 9- Chromatogramy (a) standarda, (b) reálného vzorku piva [25]	32
Obrázek 10- Chromatogramy vyšších alkoholů a esterů v pivu extrahované metodou (A) SHS, (B) SPME [27].....	33
Obrázek 11- Schéma extrakce-počátek sorpce [36]	35
Obrázek 12- Schéma extrakce-rovnovážný stav [36]	35
Obrázek 13- Přímá a headspace extrakce [38].....	36
Obrázek 14- Schéma MEPS [42].....	38
Obrázek 15- Znázornění práce s MEPS [45]	39
Obrázek 16- Míchadélka pro SBSE techniku [49, 50]	42
Obrázek 17- Způsoby derivatizace [35].....	43
Obrázek 18- Srovnání nabobtnané SA-SBSE a komerční SBSE s PDMS povrchem [54]	44
Obrázek 19- Příprava SA-SBSE [55]	44
Obrázek 20- Schéma metody ICECLES [57]	46
Obrázek 21- Srovnání chromatogramů po extrakci zeleného čaje metodou ICECLES a SBSE [59]	46
Obrázek 22- Pasivní vzorkovač MESCO [38, 62].....	47
Obrázek 23- Znázornění tepelné desorpce [66]	48
Obrázek 24- Znázornění desorpce do kapaliny [68].....	49
Obrázek 25- Schéma HPLC [74]	51
Obrázek 26- Detektor s diodovým polem [77]	52
Obrázek 27- Fluorescenční detektor [78]	52
Obrázek 28- Vzorky piv	55

Obrázek 29- Kalibrační závislost pro kohumulon bez extrakce	60
Obrázek 30- Kalibrační závislost pro adhumulon + humulon bez extrakce.....	60
Obrázek 31- Kalibrační závislost pro kolupulon bez extrakce	60
Obrázek 32- Kalibrační závislost pro adlupulon + lupulon bez extrakce.....	61
Obrázek 33- Kalibrační závislost pro kohumulon po extrakci SBSE-PDMS	62
Obrázek 34- Kalibrační závislost adhumulon + humulon po extrakci SBSE-PDMS.....	62
Obrázek 35- Kalibrační závislost pro kolupulon po extrakci SBSE-PDMS	63
Obrázek 36- Kalibrační závislost pro adlupulon + lupulon po extrakci SBSE-PDMS	63
Obrázek 37- Kalibrační závislost pro kohumulon po extrakci SBSE-EG	64
Obrázek 38- Kalibrační závislost pro adhumulon + humulon po extrakci SBSE-EG.....	65
Obrázek 39- Kalibrační závislost pro kolupulon po extrakci SBSE-EG	65
Obrázek 40- Kalibrační závislost roztoku pro adlupulon + lupulon po extrakci SBSE-EG.....	65
Obrázek 41- Kalibrační závislost pro kohumulon po extrakci SA-SBSE-PDMS	66
Obrázek 42- Kalibrační závislost pro adhumulon + humulon po extrakci SA-SBSE-PDMS..	67
Obrázek 43- Kalibrační závislost pro kolupulon po extrakci SA-SBSE-PDMS	67
Obrázek 44- Kalibrační závislost pro adlupulon + lupulon po extrakci SA-SBSE-PDMS.....	67
Obrázek 45- Porovnání desorpce ve směsi aceton/voda o různých obj. % (n = 6)	69
Obrázek 46- Porovnání desorpce ve směsi acetonitril/voda o různých obj. % (n = 6).....	70
Obrázek 47- Vliv doby desorpce (n = 6)	70
Obrázek 48- Závislost účinnosti desorpce na čase a typu rozpouštědla (n = 6).....	71
Obrázek 49- Porovnání SA-SBSE dle použitého rozpouštědla pro α -hořké kyseliny (n = 6)..	73
Obrázek 50- Porovnání SA-SBSE dle použitého rozpouštědla pro β -hořké kyseliny (n = 6)..	73
Obrázek 51- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Bakalář (n = 6)	75
Obrázek 52- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Lobkowitz (n = 6)	76
Obrázek 53- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Primátor (n = 6).....	77
Obrázek 54- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Krušovice (n = 6)	78
Obrázek 55- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Svijany (n = 6).....	79
Obrázek 56- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Postřižinské (n = 6)	80
Obrázek 57- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku u všech 14 analyzovaných piv (n = 6)	82
Obrázek 58- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku u 8 druhů piv chmelených za studena (n = 6).....	82
Obrázek 59- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku u 6 druhů piv chmelených klasickým způsobem (n = 6).....	83

Úvod

Pivo je nápoj známý již z dob Mezopotámie. Jedná se o alkoholický nápoj vyráběný z ječného sladu, vody, chmele a pivovarnických kvasinek. Pomocí těchto kvasinek je nápoj prokvašen a vzniká alkohol a oxid uhličitý. Dle způsobu kvašení se piva dělí na spodně a svrchně kvašená.

Chmel je přidáván do piva v chmelovaru, kdy do tohoto nápoje přechází hořké kyseliny, které se vyšší teplotou izomerují. Hořké kyseliny jsou zodpovědné za výslednou hořkost a aroma piva. Jestliže je chmel přidáván až po procesu kvašení do studeného piva, jedná se o tzv. chmelení za studena. Piva chmelená za studena pak mají výraznější aroma.

Tato práce je zaměřena na stanovení těchto hořkých kyselin v pivech chmelených klasickým způsobem a v pivech chmelených za studena. Hořké kyseliny jsou extrahovány pomocí mikroextrakční metody, kdy se analyt extrahuje tuhou fází na míchací tyčince a následně je analyzován kapalinovou chromatografií s detekcí diodovým polem.

1 Teoretická část

1.1 Pivo

Tento oblíbený kvašený nápoj je známý již po mnohá staletí. Pivo je vařeno z obilí, a proto panuje domněnka, že vzniklo jako vedlejší produkt při výrobě chleba. Nejstarší nálezy pochází z období 4000 až 3000 let př. n. l. z Mezopotámie. Odtud se nápoj rozšířil do celého světa a jeho největší rozvoj byl zaznamenán v 19. století. Po mnohá staletí se pivo vařilo z rýže, špaldy nebo kukuřice. Pivo, tak jak ho známe dnes, je vyráběno z ječmenného sladu, chmele a vody.

1.1.1 Suroviny

Nároky na suroviny pro výrobu piva jsou vysoké. Pivo je popsáno v zákoně o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb. Je definováno jako „pěňivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, chmelových hlávek, upraveného chmele nebo chmelového extraktu, který vedle kvasným procesem vzniklého ethanolu (ethylalkoholu) a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu“. Vyhláškou jsou definovány požadavky na jakost a výrobu, rozdělení jednotlivých druhů piv a jejich označování. Při výrobě piva se klade důraz na kvalitu používané vody, ječmene, chmele a pivovarnických kvasinek [1, 2].

1.1.1.1 Voda

Používaná voda se dá rozdělit na dvě skupiny. První je voda užitková, jenž je určena k mytí a čištění provozu. Druhou skupinou je voda varná, která musí splňovat všechny požadavky na pitnou vodu dle legislativy [3, 4].

Hlavním kritériem při posuzování kvality vody je její tvrdost (obsah iontů alkalických zemin, zejména pak vápníku a hořčíku), viz Tabulka 1. Lze rozlišit tvrdost stálou (nekarbonátovou), za kterou jsou odpovědné především sírany (síran vápenatý CaSO_4 a síran hořečnatý MgSO_4), a tvrdost přechodnou (karbonátovou) tvořenou hydrogenuhličitanem, a to především hydrogenuhličitanem vápenatým $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ a hydrogenuhličitanem hořečnatým $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ [3, 4].

Dalším kritériem je, že varná voda nesmí obsahovat chlor, alkalické uhličitany a nadměrné množství železa, manganu a dusičnanů. Mimo jiné musí být voda odplyněna, aby se zamezilo negativnímu vlivu kyslíku na výsledný produkt [2, 4].

Tabulka 1- Tvrdost vody [4]

	Tvrdost vody [mmol/l]	Tvrdost vody [°N]
Měkká	do 1,4	do 8
Středně tvrdá	do 2,1	do 12
Tvrdá	do 5,3	do 30
Velmi tvrdá	nad 5,3	nad 30

°N- německý stupeň tvrdosti (1 °N = 10 mg CaO)

1.1.1.2 Slad

Slad je důležitou složkou pro výrobu piva, neboť je zdrojem sacharidů, které jsou posléze přeměněny na alkohol. Nejčastěji se využívá sladovnického dvouřadového ječmene nebo pšenice, ale může být použita kukuřice, čirok, žito nebo oves [4].

Ječmen určený pro výrobu piva by měl obsahovat 60-65 % škrobu, 10-11 % bílkovin a obsah sušiny by měl tvořit 80-88 %. V České republice se pěstují odrůdy jarního dvouřadého ječmene, např. Forum, Rubín nebo Jubilant. Sladování je proces, kdy je zrno máčeno v takovém množství vody, aby mohlo dojít k následnému klíčení. Tento proces se provádí v náduvnících, poté jsou zrna po dobu cca 6-7 dní za neustálého obracení rozprostřena na vysoké vrstvy, které mají maximálně 30 cm, jinak poté dochází k „přehřátí zrna“. Po vyklíčení jsou zrna přemístěna na hvozď, kde dochází k sušení (tzv. hvozďění). Dobou hvozďění a teplotou je ovlivněna barva a chuť sladu [3, 4].

Dle technologie máčení a klíčení obilovin (zejména ječmene), lze slad rozdělit do skupin. Nejvíce vyráběné jsou světlé slady plzeňského typu, které jsou používány při výrobě světlých piv typu ležák. Vídeňské a dortmundské slady jsou tmavší barvy a jsou jakýmsi přechodem mezi světlými a tmavými slady. Slady mnichovského typu, taktéž nazývány bavorské, jsou používány při výrobě piv tmavých, mají vyšší obsah bílkovin a výrazné aroma. Mezi speciální slady patří karamelové slady, jež dodávají pivu vysoký obsah aromatických a barevných látek, nebo slady nakuřované používané v oblasti Německa [2-4].

Pšeničné slady se využívají při výrobě světlých pšeničných piv typu Lambic. Pro výrobu sladu se používá pšenice s menším obsahem lepku, klíčí kratší dobu a suší se při nižších teplotách než ječmen [3-5].

Pro snížení nákladů se dnes setkáme i s pivy, kde je slad nahrazen jiným zdrojem sacharidů, např. maltózovým cukrem. Pro srovnání je v Tabulce 2 uvedeno složení a vlastnosti různých druhů sladu [2, 4, 5].

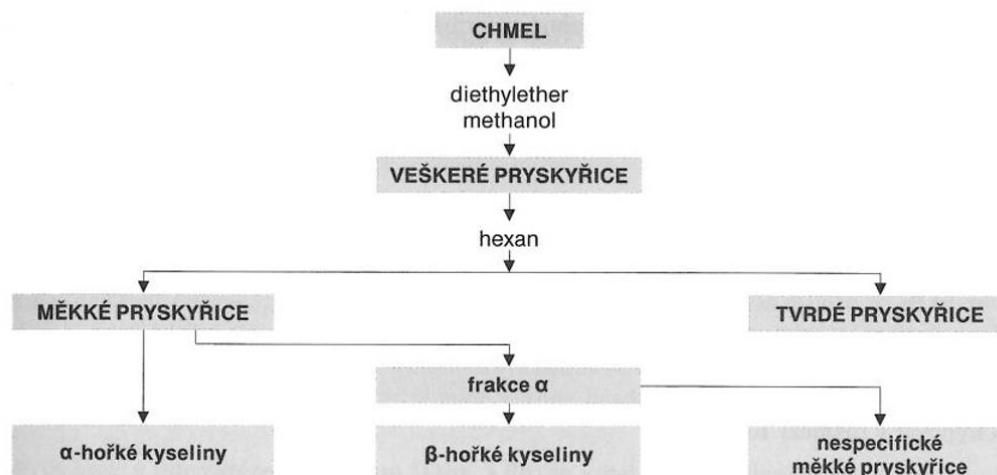
Tabulka 2- Vlastnosti a složení sladů [5]

Druh sladu	Glukóza	Fruktóza	Sacharóza	Maltóza	Vlhkost [%]	Barva [EBC]
Ječný	0,24	-	0,96	10,70	13,7	-
Zelený	1,74	0,39	-	11,94	46,0	-
Světlý I	3,15	0,34	2,69	42,02	4,7	5
Světlý II	3,71	0,40	3,68	19,46	4,8	5
Karamelový	5,40	0,23	2,73	13,91	7,9	16

EBC- (European Brewery Convention) barevné jednotky

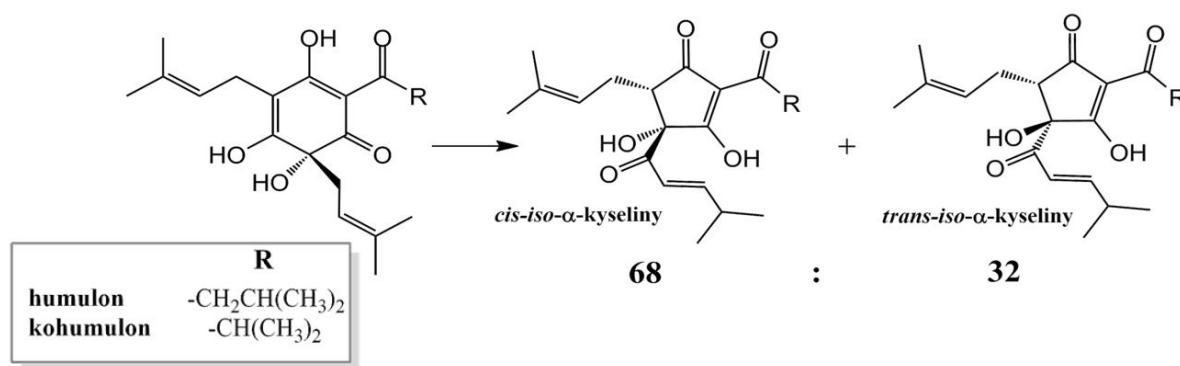
1.1.1.3 Chmel

Z velké části se na chuti piva, zvláště pak na jeho hořkosti, podílí chmel. Chmel otáčivý latinským názvem *Humulus lupulus* L. je dvoudomá rostlina, k výrobě piva se používají pouze jeho samičí hlávky. Odrůdy chmele dělíme na jemně aromatické (žatecké odrůdy s příjemným chmelovým aroma) a hořké odrůdy s vysokým obsahem pryskyřic a hrubým aroma. Dále se dělí dle zbarvení na červeňáky (žatecké odrůdy) a zeleňáky (odrůdy používané v Anglii, Belgii nebo Německu). Chmel obsahuje mnoho prospěšných látek, proto je někdy označován jako léčivá rostlina. Cennými složkami jsou pryskyřicové oleje (viz Obrázek 1), polyfenolické látky a silice [4, 6].



Obrázek 1- Rozdělení pryskyřic chmele [7]

Kyseliny obsažené v chmelech poskytují pivu jeho charakteristickou hořkost, dodávají mu aroma, ovlivňují pěnivost, mají baktericidní účinek a působí jako srážecí činidlo vysokomolekulárních dusíkatých látek tvořících se z mladiny. Tyto kyseliny dělíme na α -hořké kyseliny (humulon, adhumulon a kohumulon) a β -hořké kyseliny (lupulon, adlupulon a kolupulon). Varným procesem se tyto kyseliny přeměňují na své iso-formy (iso- α -hořké kyseliny a iso- β -hořké kyseliny), viz Obrázek 2. Nepřeměněné kyseliny jsou sensoricky bez chuti a vůně, jejich izomeráty díky tomuto procesu získávají nahořklou chuť. Dále tyto izomery mohou být v poloze cis- nebo trans-, tyto analogy mají však jiné fyzikální vlastnosti [4, 6, 8].



Obrázek 2- Izomerace α -hořkých kyselin [9]

1.1.1.4 Pivovarské kvasinky

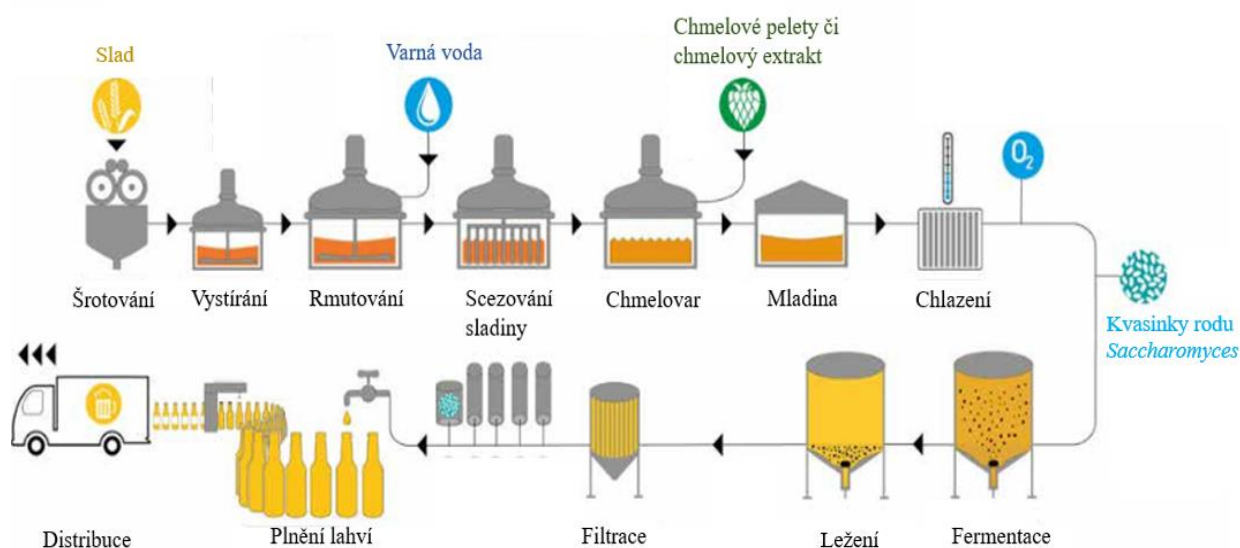
K výrobě piva se mohou použít dva druhy kvasinek, *Sacharomyces cerevisiae* (kvasinky svrchního kvašení) a *Sacharomyces carlsbergensis* (kvasinky spodního kvašení). Tyto kvasinky mají rozdílné vlastnosti, jež jsou využity při procesu kvašení. Hlavním rozdílem je teplota, za níž probíhá kvašení [4, 10].

U Kvasinek svrchního kvašení je optimální teplota v rozmezí 15-23 °C, při teplotách pod 10 °C nastává konec kvašení. Tyto kvasinky jsou používány při výrobě pšeničných piv a piv typu „ale“, „porter“ a „stout“. Po ukončení kvašení vynášejí typickou „deku“ na hladinu vlivem vznikajícího oxidu uhličitého [10, 11].

Kvasinky spodního kvašení vyžadují teploty 6-14 °C, při teplotách pod 4 °C je kvašení zastaveno. Jsou využívány pro vaření piv plzeňského typu (ležáků). V České republice se zejména užívá těchto kvasinek [2, 4, 10, 11].

1.1.2 Výroba piva

Technologie výroby piva má tyto základní části: šrotování sladu, rmutování, scezování a výroba mladiny, separace kalů, chlazení, provzdušňování a zakvašení mladiny, fermentace (hlavní kvašení), ležení piva v ležáckých sklepech a sudování. Ve většině případů je konečným krokem výroby filtrace a zároveň pasterace piva, avšak u nefiltrovaných piv se tento krok vynechává. Hotové pivo se poté plní do tanků, sudů nebo PET (Polyethylene Terephthalate) a skleněných lahví. Celý postup je znázorněn na Obrázku 3 [4].



Obrázek 3- Technologie výroby piva [12]

1.1.2.1 Šrotování sladu

Před samotným mletím sladu musí být zrna zbavena nežádoucích příměsí, kamínků a nečistot, které by mohly poškodit zařízení. Používá se čističky sladu a odkaménkovač. Po této fázi je slad odměřen na daný podíl vody, a tím je určen obsah extraktu ve vyráběné mladině. Zpravidla se navažuje 25 kg sladu na 100 l varné vody nebo 50 kg sladu na 200 l varné vody. Následuje samotné šrotování sladu za účelem rozrušení zrn tak, aby látky uvnitř byly přístupnější vodě. Plucha by měla zůstat neporušena, naproti tomu endosperm obsahuje látky, které jsou při varném procesu extrahovány [4, 13].

Šrotování může probíhat za sucha, se zvlhčeným sladem (kondicionování) nebo za mokra. Pro šrotování za sucha se používá dvou, čtyř nebo šestiválcových šrotovacích zařízení. Dvouválcové zařízení jsou oblíbeny v restauračních pivovarech, kdy je namleto cca 200 kg za

hodinu. Čtyřválcové šrotovnice jsou výkonnější, namelou až 4 tuny sladu za hodinu. Šestiválcové přístroje mají všechny tři páry mlecích válců umístěny horizontálně, výkon je až 12 tun sladového šrotu za hodinu [4, 13, 14].

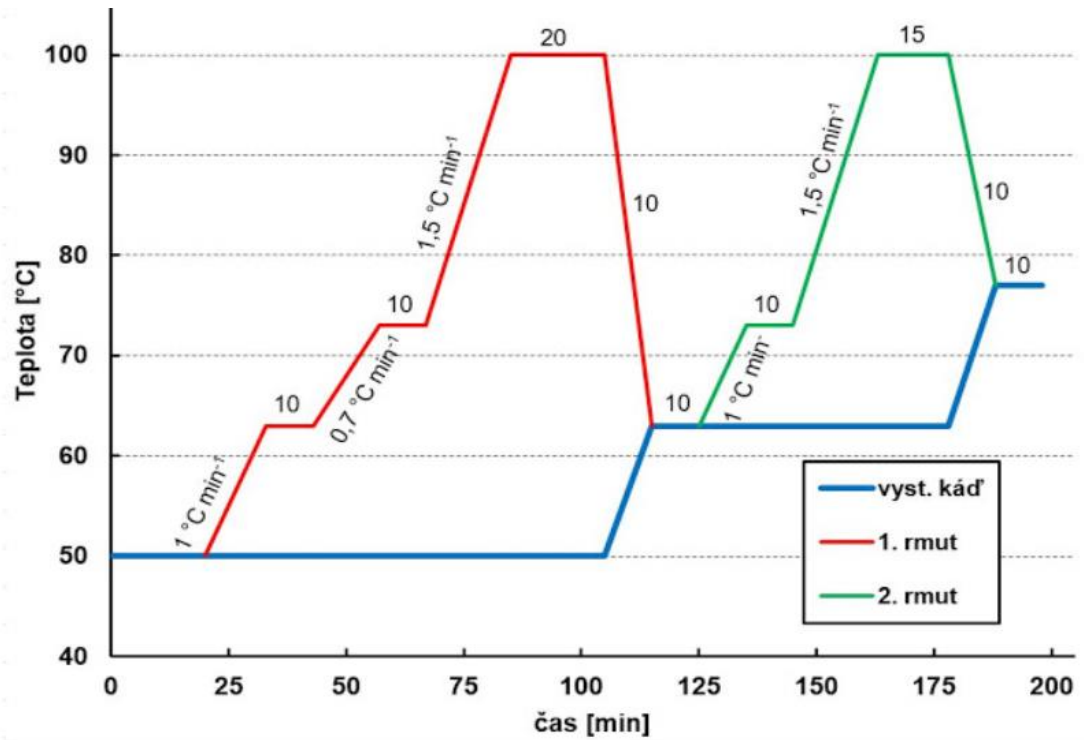
Šrotování se zvlhčeným sladem, neboli kondicionování sladu, se provádí za účelem zvýšení pevnosti pluch, které poté slouží jako základ filtrační vrstvy. Slad se zvlhčuje varnou vodou těsně před samotným mletím. Teplota vody je okolo 30 °C a po její absorpci během 2 minut je ve sladu zvýšena vlhkost o necelé 2 %. Druhým způsobem zvlhčení je pomocí vodní páry, která kondenzuje na povrch zrn. Nevýhodou je možné lokální přehřátí sladu a vyšší energetické náklady [4, 13, 14].

Mokrého šrotování sladu se moc nevyužívá. Slad je máčen po dobu 50-70 sekund ve vodě o teplotě 50-70 °C. Po mletí je mokřý šrot veden čerpadlem do rmutovací pánve [4].

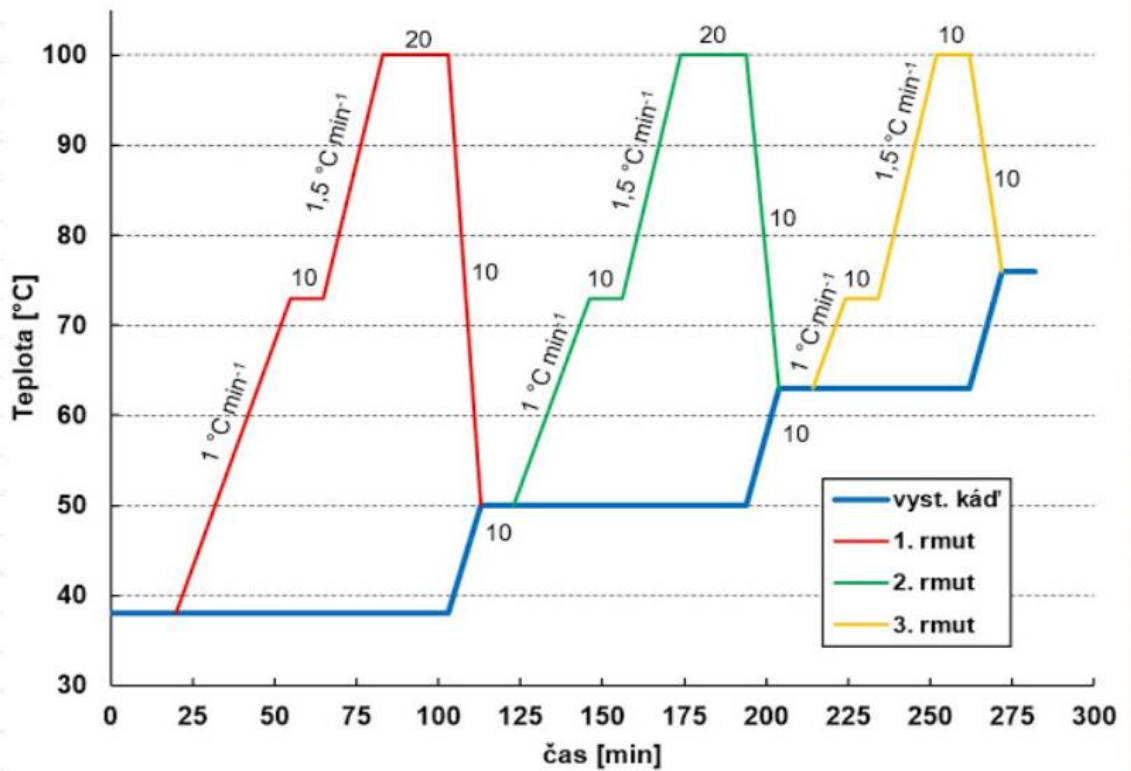
1.1.2.2 Vystírání a rmutování

Nadrcený slad se míchá s vodou o teplotě 35-38 °C (tzv. nálev), kdy část složek sladu přechází do extraktu, ale většina je stále nerozpuštěna. Škrob je činností sladových enzymů postupně rozštěpen na zkvasitelné cukry (glukózu, maltózu a dextriny). Při zvýšení teploty na 50-55 °C škrob nabobtná, zmazová a vytváří hustou viskózní kapalinu (vystírku), jež je vedena do rmutovací pánve. Mezi rmutovací teploty patří 37 °C, při které se ovlivňuje kyselost piva, a 52 °C, při které jsou štěpeny bílkoviny. Proces rmutování se provádí dekokčním nebo infuzním způsobem. Infuzní rmutování je jednodušším rmutovacím postupem ve varně, pro který postačuje jediná ohřívaná rmutovací nádoba. Pivo se poté vyznačuje světlejší barvou a méně výraznou chutí [1, 3, 4].

Dekokční způsob může být proveden rmutováním na jeden, dva nebo tři rmuty. U dekokčních způsobů rmutování se po vystření oddělí část objemu vystírky, která je ohřívána a povařena nezávisle na zbylé části díla. Klasický dvourmutový postup je vhodný pro výrobu světlých piv plzeňského typu. Používané teploty u rmutování na dva a na tři rmuty jsou znázorněny v Obrázku 4 a Obrázku 5 [3, 4].



Obrázek 4- Schéma dvourmutového postupu [15]



Obrázek 5- Schéma třírmutového postupu [15]

1.1.2.3 Scezování mladiny

Následuje scezování, při kterém se oddělí kapalná sladina od tuhé fáze zvané mláto. Využívá se scezovacích kádí, na dně sedimentuje mláto, přes které protéká sladina. Ze začátku je sladina kalná, proto se vrací zpět do scezovací kádě. Sleduje se průzračnost sladiny, a když dosáhne sladina (zvaná předek) dostatečné čirosti je vedena do mladinové kádě. Po skončení průtoku předku zbývá mláto s vysokým obsahem extraktu cukrů. Je nutné tento extrakt vysladit prolitím horkou vodou. Takto vzniká „výstřelek“, jehož stupňovitost je měřena sacharometrem [4, 14].

1.1.2.4 Chmelovar

Dalším krokem je varný proces, kdy se smíchá scezená sladina s výstřelky a chmelem. Zpravidla se používá chmelových granulí, chmelových extraktů nebo jejich kombinace. Považením sladiny s chmelem vzniká mladina. Celý proces chmelovaru trvá přibližně 90 minut a jeho účelem je extrakce hořkých kyselin chmele, odstranění nežádoucích těkavých látek, inaktivace enzymů, koagulace bílkovin a sterilizace mladiny. Po skončení chmelovaru se testuje stupňovitost mladiny a „mladinový lom“, jenž je známkou vysrážených bílkovin tvořících klky v jinak čiré mladině [4, 13].

Izomerace hořkých kyselin je nejdůležitější chemický proces při procesu chmelovaru. V čistém stavu jsou α -hořké kyseliny sensoricky téměř bez chuti a aroma, po jejich izomeraci na iso- α -hořké kyseliny získávají hořkost, kterou předávají výslednému produktu. Iso- α -hořké kyseliny se podílí i na stabilitě pěny, která je stálejší, pružnější a zpomaluje se její opadávání. β -Hořké kyseliny nemají takový vliv na výslednou chuť piva, jsou však zodpovědné za hořké bylinné aroma. Chmel, jenž obsahuje vyšší množství β -hořkých kyselin, se označuje jako aromatický a je zpravidla přidáván v posledních minutách chmelovaru nebo při tzv. chmelení za studena [13, 14].

1.1.2.5 Separace hrubých kalů a chlazení mladiny

V této fázi je nutné odstranění hrubých kalů (vysrážených bílkovin) od mladiny, jelikož mají špatný vliv na kvašení. Užívá se vířivých nebo usazovacích kádí, odstředivek nebo dekantérů. U všech těchto zařízení se hrubé kaly oddělí od mladiny, která je stále velmi horká (až 98 °C) a je nutné ji zchladit před dalším krokem [4, 13].

Mladina je zchlazena na zákvasnou teplotu 6 °C pomocí chladiče, tvořeného výměníky. Zároveň je mladina provzdušňována sterilním vzduchem nebo kyslíkem tak, aby kyslík dosáhl hodnoty cca 6 mg/l [13].

1.1.2.6 Kvašení, dokvašování a zrání mladiny

Hlavním účelem kvašení je převedení cukrů na alkohol a oxid uhličitý, zároveň se vyvíjí teplo, což je nežádoucí jev. Do mladiny se zaočkují pivovarské kvasinky, které se začnou pomnožovat a po spotřebování kyslíku přecházejí do anaerobního metabolismu, při kterém produkují alkohol. Teplota a doba hlavního kvašení se liší dle druhu použitých kvasnic, viz Tabulka 3 [14-16].

Tabulka 3- Porovnání svrchního a spodního kvašení [4, 16]

	Svrchně kvašená piva	Spodně kvašená piva
Teplota kvašení	15-20 °C	6-10 °C
Doba kvašení	3-9 dní	6-12 dní
Typ kvasinek	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , var. <i>cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces carlbergensis</i>
Typ vyráběných piv	Ale, Porter, Stout, Altbier, Trappist a pšeničná piva	Ležák

Kvašení má čtyři základní stádia. Po uplynutí 12-24 h lze pozorovat tzv. zaprašování, což je jev, kdy se vytváří pěna na povrchu mladiny vlivem uvolňujícího se oxidu uhličitého. Poté se pěna stahuje směrem ke středu kádě. Ve druhém stádiu kvašení, jenž trvá 2 až 3 dny, se tvoří bílé kroužky. Třetím stádiem je změna barvy kroužků na hnědou, což je dáno vynášením kalů a tříslobílkovinových sloučenin na povrch. Taktéž dochází k zastavení pomnožování kvasinek, neboť ubývá živin, zejména kyslíku, a narůstá obsah alkoholu. Posledním čtvrtým stádiem je propadávání kroužků a vznik souvislé pokrývky na hladině piva [4, 14-16].

Po hlavním kvašení je pivo přečerpáno do ležáckých tanků, kde při teplotě 0-3 °C dosáhne chuťové zralosti a dostatečně se nasytí oxidem uhličitým, jenž dává pivu říz. Dříve se používaly ležácké sudy, v dnešní době pivo dokvašuje v cylindricko-kónických tancích [4].

1.1.2.7 Filtrace

Filtrace zajišťuje vyšší stabilitu u piva a zvyšuje průzračnost tohoto nápoje. Filtrované pivo se ještě zpravidla pasteruje. Piva nefiltrovaná a nepasterizovaná jsou doménou hlavně

minipivovarů a restauračních pivovarů. Tato piva jsou méně stabilní, ale jsou vyhledávána pro svou plnou chuť a pro prospěšné látky (živé kvasinky), jsou však nevhodné pro distribuci [4, 16].

Existují různé přístroje na filtraci. Mezi nejpoužívanější patří deskové filtry, větší účinnost má svíčkový křemelinový naplavovací filtr nebo moderní crossflow filtr. Pro dosažení vysoké odolnosti nápoje se mimo primární filtrace zařazuje i sekundární mikrofiltrace. Lze docílit stejných výsledků jako při pasteraci piva, ale bez tepelného poškození nápoje [4, 14].

Pasterace následuje ihned po filtraci nebo je zařazena do výrobního procesu samostatně. Pasterací dochází k usmrcení živých organismů (kvasinek). U sudů se provádí tzv. blesková pasterace při teplotě 68-72 °C po dobu 30 sekund, v případě pivních lahví se naopak používá tzv. tunelová pasterace, která trvá od 10 do 20 minut a pivo je zahřáto pouze na teplotu okolo 60° C. Závěrečným krokem je plnění piva do obalů (skleněných nebo plastových lahví, sudů a plechovek). Při balení musí být zachována kvalita piva, a proto je pivo plněno pod tlakem, jenž omezuje jeho pěnivost [4, 15, 17].

1.1.3 Složky piva a jejich analýza

1.1.3.1 Složky piva

Pivo obsahuje složky, které přecházejí do nápoje z použitých surovin, jako jsou voda, chmel, ječmen a kvasinky. Voda tvoří největší komponentu při výrobě piva, obvykle je to 90-94 % finálního produktu. Obsah minerálů použité vody má tedy velký vliv na vlastnosti piva, přispívá k výsledné chuti produktu. Všechny přírodní vody obsahují soli, jenž jsou rozpuštěny z geologické vrstvy, jíž musí projít, proto se obsah těchto solí liší dle lokality. Například voda v Mnichově (Německo) je chudá na sírany a chloridy, a naopak je bohatá na uhličitany, které jsou ideální pro výrobu tmavších ležáků. České město Plzeň má vodu měkkou a vyrábí se zde pivo s komplexním charakterem a chmelovým aroma. Voda v Dortmundu (Německo) obsahuje značné množství hydrogenuhličitanů a chloridů, které pomáhají při výrobě plných těl ležáků, které jsou méně aromatické než plzeňské typy. Hlavní přítomné složky jsou vápník, hořčík, sodík, draslík, sírany, chloridy, hydrogenuhličitany, uhličitany a dusičnany. Jiné složky jsou přítomny, ale jen v malých množstvích a jsou známé jako stopové prvky (viz Tabulka 4) [18, 19].

Tabulka 4- Anorganické složky piva [19]

Anorganické látky	Koncentrace [mg/l]	Anorganické látky	Koncentrace [mg/l]
Draslík (K)	200-450	Fluor (F)	0,08-0,71
Sodík (Na)	20-350	Vodík (H)	0,2-0,3
Vápník (Ca)	25-120	Železo (Fe)	0,01-0,3
Hořčík (Mg)	50-90	Mangan (Mn)	0,03-0,2
Chloridy (Cl ⁻)	120-500	Nikl (Ni)	0,03-0,2
Sírany (SO ₄ ²⁻)	100-430	Dusitany (NO ₂ ⁻)	0-2
Oxalát (C ₂ O ₄ ²⁻)	170-600	Dusík (N ₂)	1-14
Dusičnany (NO ₃ ⁻)	13-43	Kyslík (O ₂)	0,4-4
Hliník (Al)	0,1-2	Fosfor (P)	90-400
Arsen (As)	0,02-0,05	Zinek (Zn)	0,01-1,48
Brom (Br)	0,2-0,4	Vanad (V)	0,03-0,15
Kadmium (Cd)	0,03-0,68	Cín (Sn)	0,01-0,02
Kobalt (Co)	0,01-0,11	Měď (Cu)	0,01-1,55

Některé tyto ionty mohou být sráženy během procesu vaření, jiné jsou absorbovány kvasinkami. Proto přítomnost anorganických solí se v pivu liší od solí v použité varné vodě. Přítomnost některých minerálů (např. železa) má negativní účinek. Hlavní složky piva jsou uvedeny v Tabulce 5. Některé sloučeniny přecházejí do piva ze surovin beze změny, jiné jsou vytvořeny během varného procesu [19].

Tabulka 5- Složky piva [19]

Sloučenina	Koncentrace	Zdroj
Voda	90-94 % v/v	-
Ethanol	3-5 % v/v	Kvasinky, slad
Uhlovodíky	1-6 % w/v	Slad
Oxid uhličitý	3,5-4,5 g/l	Kvasinky, slad
Anorganické soli	500-4000 mg/l	Voda, slad
Celkový dusík	300-1000 mg/l	Kvasinky, slad
Organické kyseliny	50-250 mg/l	Kvasinky, slad
Vyšší alkoholy	100-300 mg/l	Kvasinky, slad
Aldehydy	30-40 mg/l	Kvasinky, chmel
Estery	25-40 mg/l	Kvasinky, slad, chmel
Sírné látky	1-10 mg/l	Kvasinky, slad, chmel
Složky chmele	20-60 mg/l	Chmel
Vitámín B1	5-10 mg/l	Kvasinky, slad

v/v- objemová procenta (volume/volume); w/v- hmotnostní procenta (weight/volume)

Na výrobu 1 hektolitrů piva se používá 15-20 kg ječného sladu, ten je primárním zdrojem bílkovin, lipidů, cukrů a polyfenolů piva. Je zřejmé, že většina cukrů je zkvašena na ethanol kvasinkami, ale některé cukry jsou přítomny i v hotovém pivě (Tabulka 6). Obsah cukrů v pivech se pohybuje okolo 1-6 %. Jedná se o nezkrasitelné dextriny nebo α -glukany, zbytky

enzymatické hydrolýzy škrobu, a některé polysacharidové sloučeniny pocházející z buněčných stěn nebo endospermu ječmene. α -Glukany mohou mít pozitivní vliv na hladkost piva a stabilitu pěny, nicméně je důležité, aby jejich koncentrace nebyla příliš vysoká [18-20].

Tabulka 6- Nefermentované cukry v pivu [19]

Cukry	Koncentrace [g/l]
Fruktóza	0-0,19
Glukóza	0,04-1,1
Sacharóza	0-3,3
Maltóza	0,7-3
Maltotrióza	0,4-3,4

Ječmen a slad jsou bohatými zdroji několika vitamínů, zejména vitamíny skupiny B (zejména biotin a kys. pantotenová, viz Tabulka 7), které jsou důležité jako růstový faktor kvasinek. Některé vitamíny jsou přítomny ve sladu ve vázaných formách a uvolněny během rmutování enzymaticky. Riboflavin, kyselina pantothenová a pyridoxin se zvyšují během sladování, taktéž i kyselina askorbová, která je později zcela zničena vysokou teplotou během vaření. Některá piva mohou obsahovat kyselinu askorbovou (vitamín C), protože do pív může být přidána jako antioxidant [19, 21].

Tabulka 7- Vitamíny skupiny B v pivu [19]

Vitamíny skupiny B	Koncentrace [mg/l]
Riboflavin (B ₂)	0,02-0,1
Biotin (B ₇)	<0,015
Niacin (B ₃)	0,3-5
Kyselina listová (B ₉)	0,04-0,6
Pyridoxin (B ₆)	0,07-1,7
Kyselina pantotenová (B ₅)	0,04-2
Thiamin (B ₁)	0,08
Kyanokobalamin (B ₁₂)	<0,03
Kyselina aminobenzoová	0,01-0,15

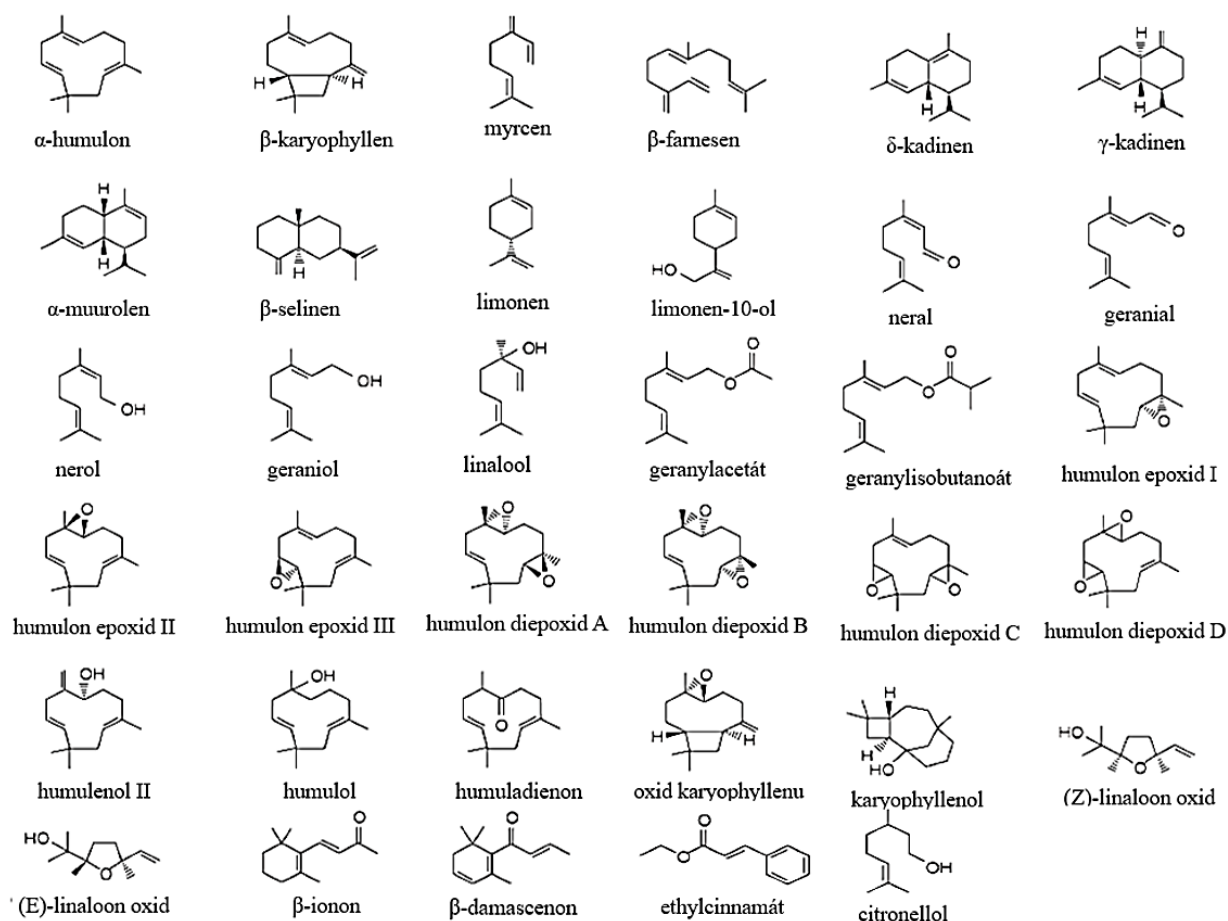
Ethanol je nejdůležitější alkohol v pivu, jeho koncentrace se průměrně pohybuje v rozmezí od 20 do 80 g/l. Nicméně mnoho různých stylů piva může obsahovat méně (např. piva lehká) nebo více alkoholu (např. belgická trapistická piva nebo německé doppelbok). Kromě ethanolu obsahuje pivo i další alkoholy, které se tvoří metabolismem kvasinek (Tabulka 8). Tyto vyšší alkoholy ve velkém množství mohou způsobovat bolesti hlavy. Hlavními vyššími alkoholy v pivu jsou 3-methylbutanol (isoamylalkohol), 2-methylbutanol (amylalkohol),

2-methylpropanol (isobutylalkohol), propanol (propylalkohol) a fenylethanol (fenethylalkohol). Menší počet primárně fenolických alkoholů vzniká rozpadem polyfenolů sladu a chmele a může přispět ke struktuře piva v ústech (pocit v ústech) [19-21].

Tabulka 8- Alkoholy přítomné v pivu [19]

Alkohol	Koncentrace [mg/l]	Popis aroma
Ethanol	20 000-80 000	Alkoholický, silný
Methanol	0,5-3	Alkoholický, rozpouštědlo
1-Propanol	3-16	Alkoholický
2-Propanol	3-6	Alkoholický
2-Methylbutanol	8-30	Alkoholický, vinný, banánový
3-Methylbutanol	30-70	Alkoholický, vinný, banánový
2-Fenylethanol	8-35	Růže, hořká, parfémová
1-Okten-3-ol	0,03	Čerstvá tráva, parfém
2-Dekanol	0,005	Kokosový ořech, anýz
Glycerol	1 200-2 000	Sladký, viskózní

Aroma piva závisí zejména na sloučeninách, které přecházejí z chmele, ten obsahuje 0,5-3 % esenciálních olejů (Obrázek 6). Esenciální oleje (silice) chmele jsou komplexní směsí několika stovek sloučenin. Dělí se na dvě hlavní frakce: první patří do skupiny uhlovodíků, z nichž terpenové uhlovodíky tvoří přibližně 70 %. Zbývajících 30 % jsou sloučeniny obsahující kyslík (kyslíková frakce, která je obecně aromatictější a méně těkavá), jako jsou estery, aldehydy, ketony, kyseliny a alkoholy (viz Tabulka 9). Chmelové silice ovlivňují jak aroma, tak vůni piva, i když většina olejů přidaných do vroucí mladiny je ztracena destilací s vodní párou. Část této ztráty je žádoucí, protože některé složky chmelového oleje mají nepříjemný zápach a způsobují, že pivo nebude pitné. Obecně se však většina chmele přidává blízko konce varu mladiny, aby se minimalizovaly ztráty nebo se využije tzv. chmelení za studena [19].



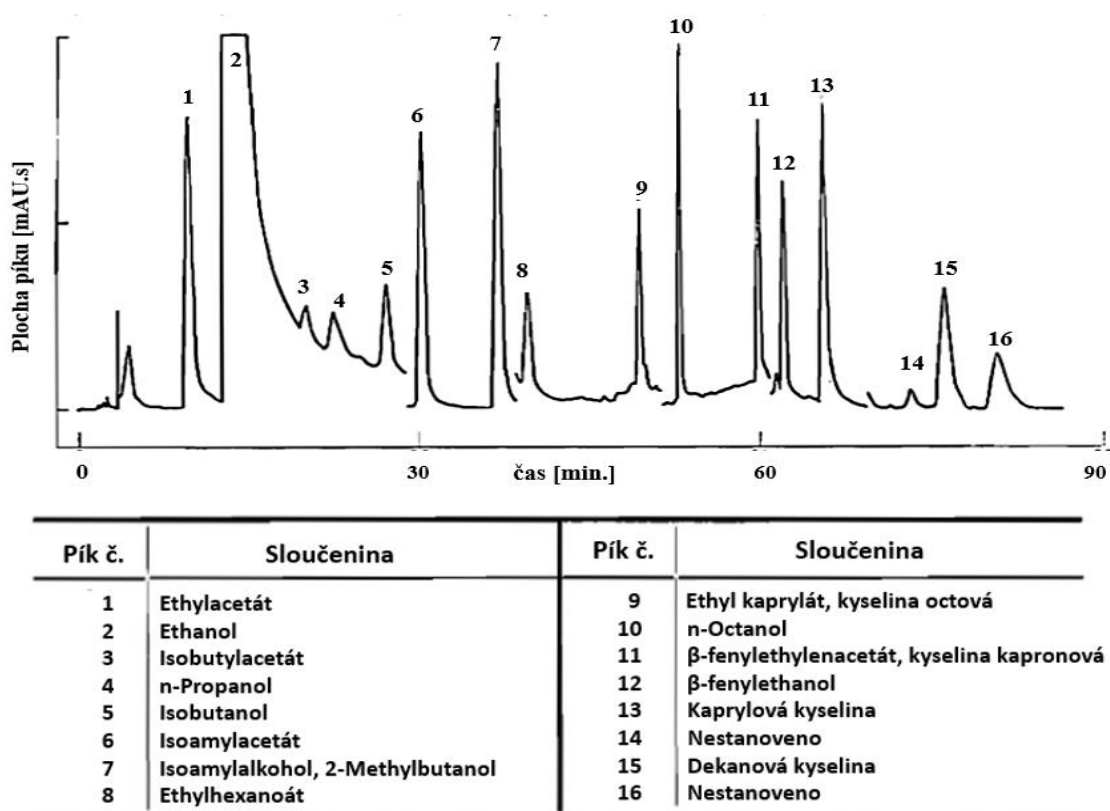
Obrázek 6- Chemická struktura složek silic chmele [20]

Tabulka 9- Chmelové silice v pivu [19]

Sloučeniny	Koncentrace [$\mu\text{g/l}$]
Linalool	1-470
Citronellol	1-90
Geraniol	1-90
Geranyl acetát	35
α -Terpineol	1-75
Humulon epoxid I	125
Humulon epoxid II	1,9-270
α -Eudesmol	1-100
Humulenol	1-1 150
Humuladienone	43
Humulol	220
Clovanediol	51-677

1.1.3.2 Analýzy piva

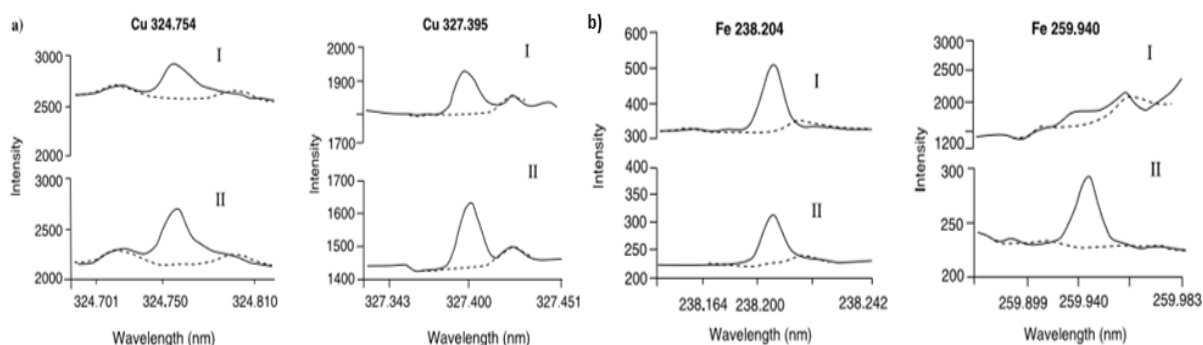
Jednou z metod pro analýzu více složek piva je analýza pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID). Jedná se o rutinní analýzu organických složek piva. K pivu se přidá chlorid sodný a následně jsou složky piva extrahovány malým objemem sirouhlíku, poté je organická fáze oddělena centrifugací a zavedena přímo do plynového chromatografu. Za popsanych podmínek je dosaženo uspokojivé reprodukovatelnosti, citlivosti a rychlosti. Získá se alespoň 16 jasně rozlišených píků (viz Obrázek 7) [22].



Obrázek 7- Chromatogram analýzy složek piva pomocí GC-FID [22]

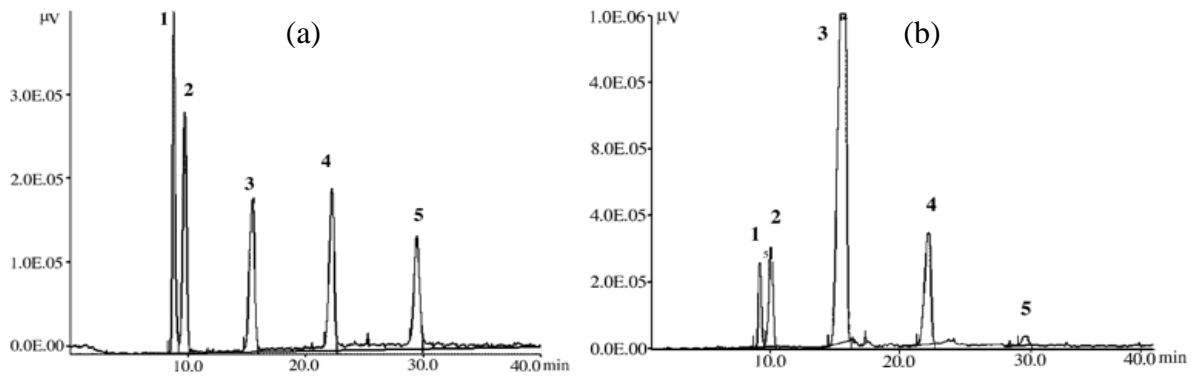
Makroelementy, mikroelementy a stopové kovy jsou důležité při fermentaci piva, protože poskytují vhodné prostředí pro růst kvasinek a ovlivňují metabolismus kvasinek. Sleduje se zejména obsah mědi (Cu) a železa (Fe), které se podílejí na úpravě piva a jeho stárnutí, které vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Reaktivní druhy kyslíku snadno oxidují organické sloučeniny přítomné v pivu, mění kvalitu pěny a chuťovou stabilitu piva. Měď a železo lze stanovit a frakcionovat metodou atomové emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES). Metoda je založena na mikrovlnném rozkladu, kdy se k vzorku piva přidává kyselina dusičná a peroxid vodíku. Po rozkladu jsou vzorky naředěny a proměřeny metodou

ICP-AES, kdy pro každý prvek jsou sledovány 2 emisní čáry (Cu: 324,754 nm; 327,395 nm; Fe: 238,204 nm; 259,940 nm). Typické signály pro tyto prvky jsou znázorněny na Obrázku 8 [23, 24].



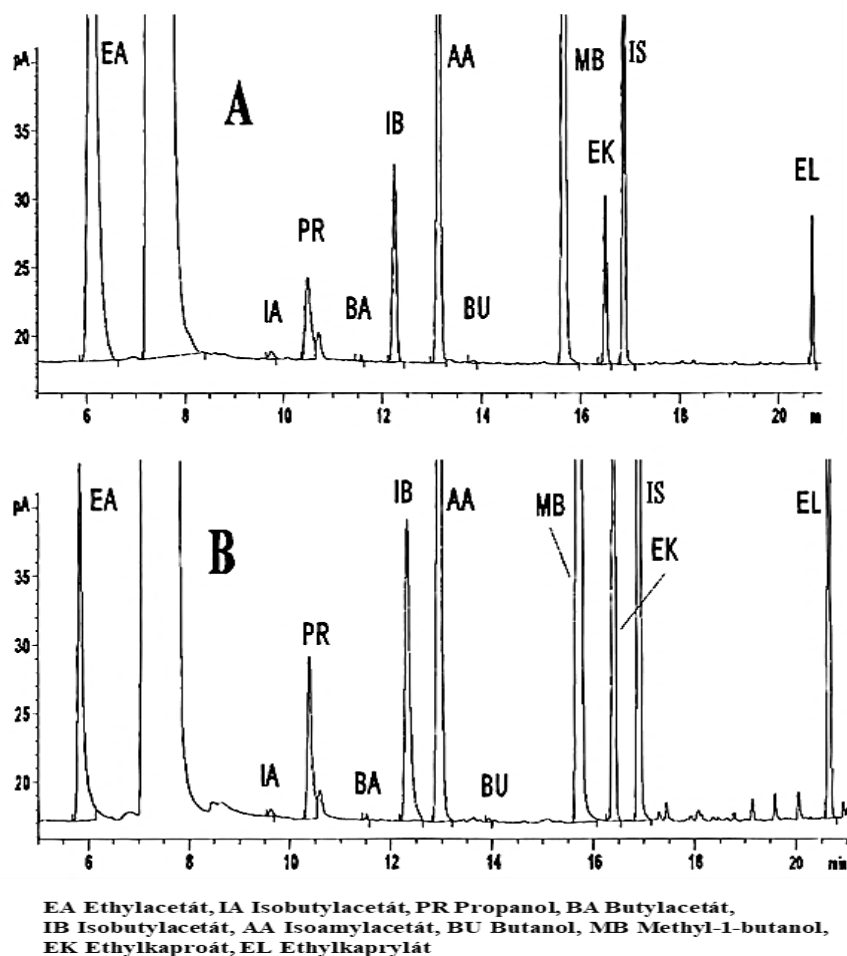
Obrázek 8- Chromatogramy Cu (a), Fe (b)[23]
I- nezředité pivo, II- standardní roztok (50 ng/l Cu, Fe)

Pivo obsahuje cukry, jenž lze fermentovat (fruktóza, glukóza, maltóza a maltotrióza) a oligosacharidy, které se během procesu výroby piva nemění. Kvantitativní hodnocení malto-oligosacharidů poskytuje užitečnou kontrolu komplexního enzymatického systému při vaření piva. Analýza cukrů se obecně provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která může poskytnout nejen kvalitativní, ale také kvantitativní výsledky. Metoda HPLC s detektorem rozptylu světla (ELSD; Evaporative Light Scattering Detector) byla optimalizována a validována pro kvantifikaci sacharidů v pivu. Chromatografické dělení je dosaženo gradientovou elucí směsí acetonitril / voda. Detektor ELSD je vhodný pro detekci látek, jenž neobsahují žádný chromofor nebo fluorofor a na rozdíl od refraktometrického detektoru lze použít gradientovou eluci. Vzorek putuje do zmlžovače, posléze do zmlžovací komůrky, kde dochází k odpaření mobilní fáze. Zmlžený eluent je veden do fotodetektoru, kde dochází k rozptylu optického paprsku. Ukázka chromatogramů analýzy cukrů ve standardu a v reálném vzorku piva je znázorněn na Obrázku 9. Touto metodou lze snadno oddělit a kvantifikovat monosacharidy a malto-oligosacharidy za použití gradientové eluce, není nutná žádná chemická úprava vzorku nebo derivatizace. Citlivost a přesnost je lepší než citlivost dosažená pomocí refraktometrické detekce, jež je často popisována v literatuře [25, 26].



Obrázek 9- Chromatogramy (a) standarda, (b) reálného vzorku piva [25]
 1 fruktóza, 2 glukóza, 3 maltóza, 4 maltotrióza, 5 maltotetraóza

Vyšší alkoholy a estery jsou vedlejšími produkty fermentace ethanolu a jejich výtěžek při výrobě piva závisí na několika faktorech, na složení mladiny, na průběhu fermentace a na kmeni pivovarských kvasinek. Vyšší alkoholy a estery spadají do skupiny těkavých sloučenin, které tvoří hlavní část aroma piva. Pro jejich stanovení se používají celosvětově zavedené metody založené na statické headspace. Jako alternativu lze využít mikroextrakci tuhou fází (SPME) ve spojení s GC (Gas Chromatography). Za použití polyakrylátového vlákna se stanoví až 12 vyšších alkoholů a esterů v pivu. Srovnání těchto 2 metod lze vidět na Obrázku 10 [27].



Obrázek 10- Chromatogramy vyšších alkoholů a esterů v pivu extrahované metodou (A) SHS, (B) SPME [27]

Pro měření hořkosti piva neboli celkového obsahu iso-hořkých kyselin, je využívána metoda ASBC (American Society of Brewing Chemists), HOPS-6, výsledek se udává v jednotkách EBU (European Bitter Units). Jedná se o spektrofotometrickou metodu s detekcí při 275 nm. Metoda ASBC, HOPS-6 je poměrně pomalá v důsledku přípravy vzorku. V posledních třech desetiletích bylo vyvinuto několik snah zaměřených na vývoj rychlé a automatizované techniky pro rutinní měření hořkosti. K měření množství hořkých kyselin v pivu lze použít i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s detekcí v ultrafialové oblasti nebo hmotnostní spektrometrií (HPLC-UV a HPLC-MS). Jedna z alternativních technik, které jsou k dispozici, jsou multisenzory nebo elektronické jazyky (ET; Electronic Tongues). ET typicky obsahují řadu senzorů s částečnou selektivitou nebo křížovou citlivostí měřené sloučeniny. Obsahuje zařízení pro sběr dat a nástroje pro zpracování dat. Snímače jsou založené na různých principech měření: potenciometrických, amperometrických, piezoelektrických nebo optických. Byla popsána aplikace ET na analýzu piv pro predikci sensorických vlastností piva, jako je hladkost, hořkost a svíravost [28-30].

1.2 Mikroextrakční techniky využívající tuhou fázi

Extrakce tuhou fází je technika běžně používaná v analytických laboratořích pro extrakci analytu z matrice. Tato technika umožňuje extrakci, zakoncentrování analytu a jeho vyčištění. Je to technika rychlá, snadno proveditelná a může být automatizována. SPE (Solid Phase Extraction) technik se využívá při práci se složitějšími matricemi, jako jsou např. moč, krev, vzorky potravin, nápojů a vod [31, 32].

Postupným zdokonalováním SPE byly vyvinuty mikroextrakční techniky. Snahou je úspora času, snížení pořizovacích nákladů a nákladů na provoz, zjednodušení a zautomatizování celého procesu a v neposlední řadě minimalizace používaných organických rozpouštědel. Mikroextrakční metody s extrakcí tuhou fází nejsou kvantitativní, ale pouze rovnovážné metody. Pro získání dostatečně přesných výsledků je nutné dodržovat dané experimentální podmínky, tak lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro relativně nízké koncentrace sledovaného analytu [18-20].

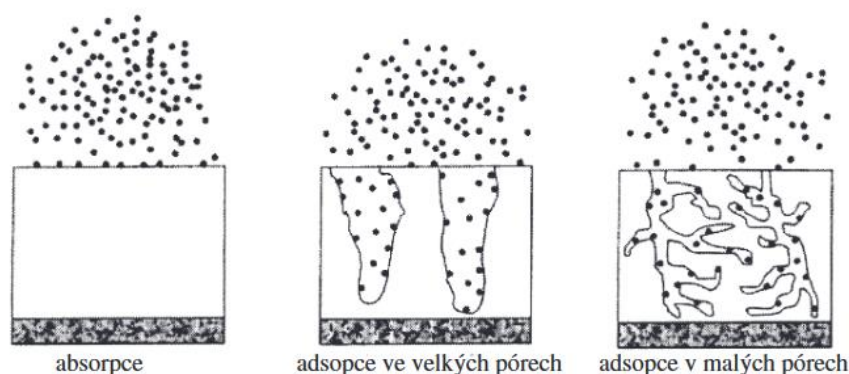
1.2.1 Princip mikroextrakce tuhou fází

SPME metoda (Solid Phase Microextraction) byla vyvinuta profesorem Januszem Pawliszynem na Univerzitě ve Waterloo na počátku 90. let 20. století. Použití SPME metody má velký význam ve spojení GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) nebo s HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [31, 33].

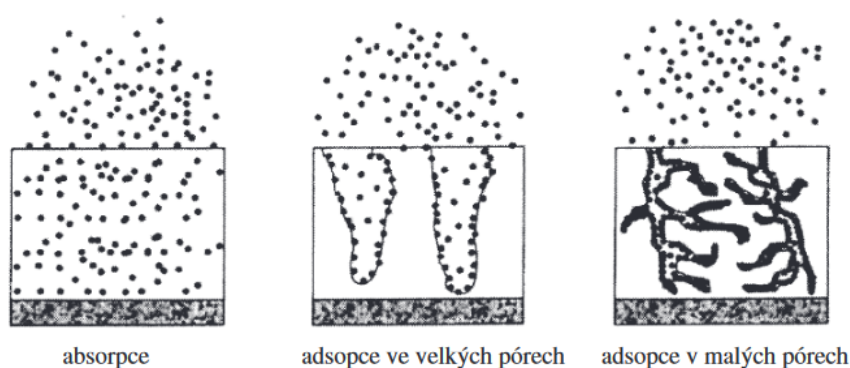
Principem SPME metody je extrakce analytu na křemenné vlákno pokryté stacionární fází, jež se mohou lišit polaritou i sorpčními vlastnostmi. Stacionární fáze může být tvořena homogenními čistými polymery (absorbenty) nebo porézními částicemi suspendovanými do polymeru (adsorbenty). Rozdíly v sorpci na stacionární fáze jsou znázorněny na Obrázku 11 a 12. Homogenní polymery jsou buď kapalné (PDMS; polydimethylsiloxan) nebo tuhé (PA; polyakrylát). Tato vlákna mají zpravidla větší extrakční kapacitu, neboť zde nedochází ke kompetici analytů o sorpční místa. Adsorbenty zachycují analyty na základě fyzikálně-chemických vlastností, tato vlákna pak mají nižší mechanickou odolnost, ale větší selektivitu. Jsou tvořena porézními částicemi, jako např. divinylbenzen (DVB) nebo Carboxen (částice na bázi grafitizovaného uhlíku) [33-35].

Způsob sorpce metodou SPME lze provést ve dvou základních módech. Prvním je přímá sorpce z roztoku (DI-SPME, Direct Immersion-Solid Phase Microextraction). Jedná se

o dvoufázový systém, jenž je tvořen vzorkem a povrchem SPME. Druhou možností je sorpce z plynné fáze (HS-SPME, Headspace Solid Phase Microextraction). V tomto případě jde o třífázový systém, kdy se tvoří rovnováha mezi vzorkem a headspace a mezi headspace a vláknem [32].

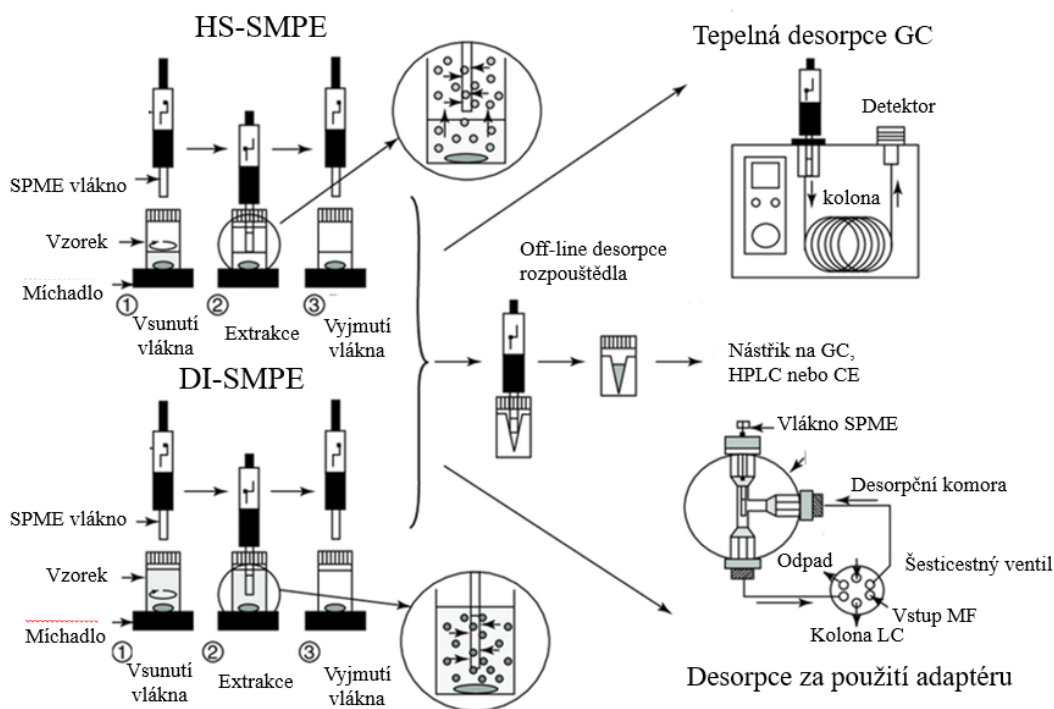


Obrázek 11- Schéma extrakce-počátek sorpce [36]



Obrázek 12- Schéma extrakce-rovnovážný stav [36]

Je-li metoda SPME použita ve spojení s GC, je desorpce poměrně snadná. Vláknem je zavedeno do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde dojde k tepelné desorpci, která je v tomto případě závislá na bodu varu analytu, tloušťce sorpční fáze vlákna, teplotě a době desorpce. Pro spojení SPME s HPLC je použit adaptér složený z šesticestného ventilu a desorpční komory (viz Obrázek 13). V tomto případě, je desorpce provedena kapalnou fází, která je poté vedena na kolonu HPLC systému. Dle síly sorpce se volí dynamická desorpce (desorpce v proudu MF; Mobile Phase) nebo statická desorpce (analyt je po jistý čas ponořen do MF a až poté je proveden nástřik na kolonu) [32, 35, 37].



Obrázek 13- Přímá a headspace extrakce [38]

1.2.2 Faktory ovlivňující sorpci

Celková citlivost, rychlost a opakovatelnost SPME metody je ovlivněna řadou faktorů. Důležité však je, že u této metody není podmínkou docílení rovnovážného stavu nebo dokonalé extrakce analytu, nýbrž je důležité co nejpřesnější dodržení extrakčních podmínek (tzn. délku doby vzorkování, teplotu vzorku a hloubku ponoru vlákna) [32, 35, 38].

Optimalizaci výsledků ovlivňuje např. polarita a tloušťka stacionární fáze, způsob vzorkování, hodnota pH, iontová síla roztoku, teplota vzorku, míchání apod. Polarita stacionární fáze se volí tak, aby byla blízká polaritě extrahované látky. Tím se docílí větší citlivosti metody, ale k ustanovení rovnovážného stavu dochází pomaleji. Obdobně je to i u tloušťky sorpční vrstvy. Silnější vrstva se volí pro těkavější sloučeniny, které jsou posléze desorbovány na kolonu GC. Tenká vrstva má zase tu výhodu, že difuze výše vroucích látek tepelnou desorpcí probíhá rychleji [39, 40].

Zásadní vliv na extrakci má teplota. Čím vyšší je, tím se rychleji ustanovuje rovnováha systému. V případě HS-SPME za vyšších teplot narůstá koncentrace těkavých složek vzorku v plynné fázi, současně se však zvyšuje riziko tepelné desorpce. Je nutné zvolit vhodnou teplotu

a určit dobu k ustanovení rovnovážného stavu. U DI-SPME se volí vhodné rozpouštědlo, jeho množství a doba dynamické nebo statické desorpce. Optimální doba extrakce se nejčastěji zjistí proměřením závislosti výtěžnosti analytu na době sorpce. V případě, že rovnovážný stav nenastane ani po několika hodinách, volí se kratší doba, která je přísně dodržena pro dobrou opakovatelnost metody [32, 41].

Míchání vzorku má vliv na rychlost transportu sledované látky k vláknu SPME. Míchání zkracuje dobu extrakce zvláště u vysokomolekulárních látek a látek s vyšším difuzním koeficientem. Nestejnoměrné a proměnlivé míchání má opačný účinek a celkově zhoršuje reprodukovatelnost metody [32, 38].

Hodnotu pH volíme u vzorků, jež extrahujeme metodou DI-SPME. Tyto látky jsou ovlivněny iontovou silou roztoku, jenž jde zvýšit přidáním soli do roztoku. Tímto krokem se zvýší celková účinnost extrakce pro řadu látek polárních a těkavých. Zvýšení iontové síly se nehodí pro vysokomolekulární sloučeniny, neboť se tvoří interferující píky. Změna pH také ovlivňuje rozpustnost některých látek s funkčními skupinami, jejichž charakter se s hodnotou pH mění (-COOH, -OH, -NH₂). Bazické a kyselé analyty jsou snáze extrahovány v bazickém, respektive kyselém prostředí [32, 40, 41].

Získání shodných výsledků a tím i celková reprodukovatelnost metody vyžaduje i optimalizaci desorpčních parametrů, tzn. teploty nástřiku (desorpce), hloubka vsunutí vlákna do nástřikové komory a desorpční čas [40].

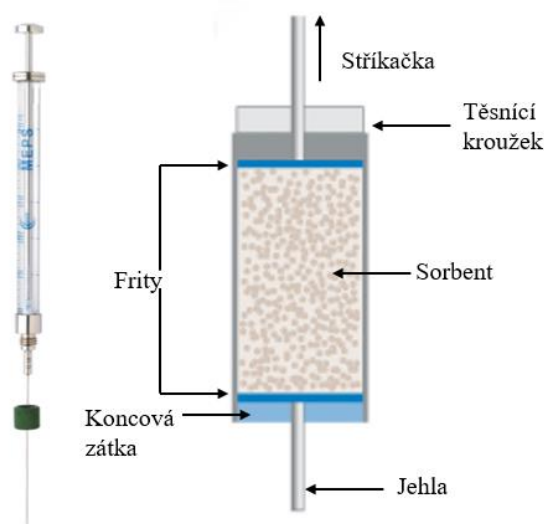
1.2.3 Mikroextrakce se sorbentem v mikrostríkačce

MEPS (Microextraction by Packed Sorbent) je metoda, kterou představil Abdel-Rehim v roce 2004. Nejedná se pouze o zmenšení metody SPE, kdy se pracuje s malými objemy okolo 10 μ l. Sorbent (cca 1-2 mg) je přímo v jehle mikrostríkačky (100-250 μ l), kde je utěsněn. Po nasátí vzorku dochází ke kontaktu se sorbentem, a to rovnou dvakrát, poprvé při nasátí vzorku do stríkačky a podruhé při jeho vytlačení ze stríkačky ven. Zachycený analyt je následně vymyt vhodným rozpouštědlem. Pro desorpci není potřeba použití žádného adaptéru, jako je tomu u SPME [42, 43].

1.2.3.1 Popis mikrostríkačky

MEPS se skládá ze dvou částí, stríkačky MEPS a jehly se sorbentem (BIN; Barrel Insert and Needle Assembly). BIN obsahuje tuhou fázi, která je zabudována do stríkačkové jehly.

Používá se plynotěsná stříkačka s objemem 100 μ l nebo 250 μ l, která umožňuje dávkování kapalin za běžných podmínek SPE. Po opotřebování tuhé fáze BIN jehly (její životnost je cca 40-100 vzorků) nebo je-li požadována jiná jehla s odlišnými vlastnostmi, lze jehlu snadno vyměnit odšroubováním pojistné matice. MEPS stříkačka je znázorněna na Obrázku 14 [43-45].



Obrázek 14- Schéma MEPS [42]

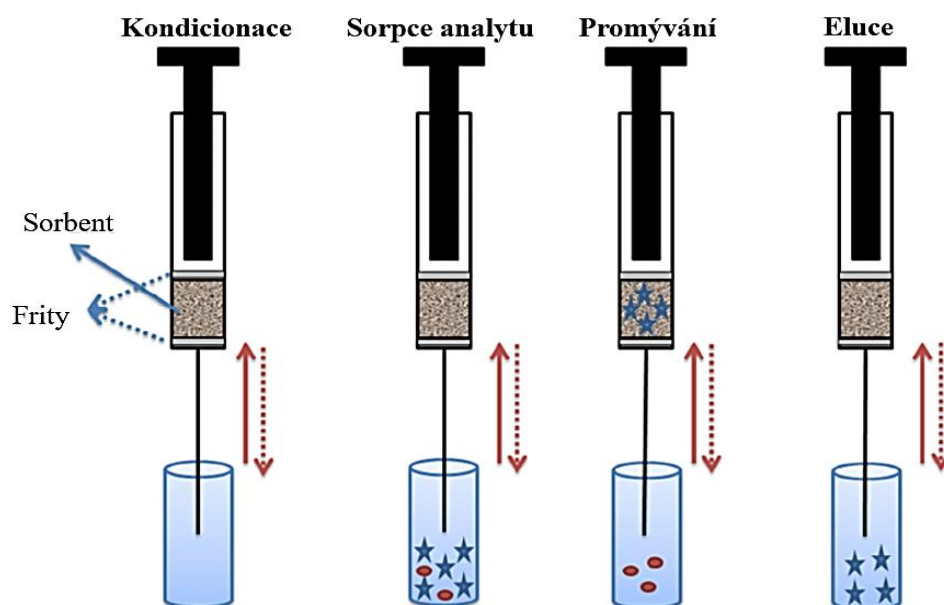
Malé množství MEPS fáze v jehle BIN lze snadno a účinně promývat mezi jednotlivými vzorky, což snižuje riziko vzájemné kontaminace, a je mnohem jednodušší ve srovnání s konvenční SPE. MEPS využívá separaci pomocí reverzní fáze, normální fáze, směsného módu nebo iontové výměny. Jelikož MEPS pracuje s malými objemy, je vhodnou technikou pro přímé propojení s LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) systémy. MEPS může být připojena ke GC nebo LC bez jakýchkoliv modifikací. Celý postup lze mimo jiné automatizovat pomocí dávkovačů a pracovat v systému on-line [43, 46].

Vyšší selektivitu, než BIN má MIP (Molecularly Imprinted Polymer). Tento sorbent byl zkoušen např. k extrakci anestetik z lidské plasmy a vzorků moči. Bylo prokázáno, že vlákna potažená MIP mají lepší kinetiku sorpce a desorpce ve srovnání s monolitickým vláknem [43].

1.2.3.2 Popis extrakce

Extrakční kroky v MEPS jsou stejné jako u standardní SPE metody. Podmínky musí být optimalizovány tak, aby bylo dosaženo nejvyšší sorpce analytu. U MEPS metody musí být zařazeny dodatečné kroky k následnému čištění a kondicionování, aby se sorbent mohl použít pro další vzorek. Po kondicionování je sledovaná látka extrahována ze vzorku (krev je předtím nutné zředit 20x, plasmu 4x), po skončení sorpce je vzorek promyt pracovním roztokem, kterým se zbaví případných interferenčních látek. Analyt je eluován do vhodného rozpouštědla a následně vstříknut do nástřikového prostoru analytického systému (viz Obrázek 15) [42, 43, 47].

Jako promývací a eluční roztoky bývají používána různá rozpouštědla, např. voda, směsi vody a organických rozpouštědel (například ethanol, methanol, acetonitril apod.) nebo jiná organická rozpouštědla. Vždy záleží na vlastnostech analytu, v jaké matrici se nachází a na kompatibilitě elučního rozpouštědla s následnou analytickou koncovkou [47].



Obrázek 15- Znárodnění práce s MEPS [45]

1.2.3.3 Srovnání s jinými mikroextrakčními metodami

Výhodami MEPS je, že se pracuje s velmi malými objemy, tím je redukováno množství použitých roztoků a reagensů. Dvojitá sorpce může zvýšit záchyt látek, jež jsou špatně sorbovány. Metoda MEPS je přizpůsobitelná i pro jiné analytické techniky, včetně

imunologických testů a off-line analýzy pomocí NMR (Nuclear Magnetic Resonance), IR (Infrared Spectroscopy) a dalších metod. MEPS může být spojena s autosamplermem a umožňuje tak on-line využití SPE [43, 44].

Oproti SBSE (Stirr Bar Sorptive Extraction) vyžaduje technika MEPS řádově kratší dobu zpracování vzorku (viz Tabulka 10). Příprava vzorků komplexních biologických matric pomocí MEPS snižuje potřebné množství vzorku a reagensů, které se používají při extrakci. Tato technika se využívá pro extrakci velké škály drog a jejich metabolitů z biologických tekutin, jako jsou moč, plasma a krev [43, 46].

Tabulka 10- Srovnání metod extrakce tuhou fází [42]

Metoda extrakce	LOD (nmol/l)	Přesnost (%)	Správnost (% RSD)	Doba extrakce (min.)
SPE	100	101	3,0	20
SPME	5	110	6,3	40
MEPS	2	105	5,0	1

LOD- mez detekce (Limit of Detection); RSD- relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)

1.2.4 Mikroextrakce na míchací tyčince

Mikroextrakce na míchací tyčince (SBSE) je extrakční technika založená na extrakci analytů z matrice (kapalné vzorky) do polymerní vrstvy imobilizované na skleněné trubici s magnetickým jádrem. Tato mikroextrakční technika byla vyvinuta v roce 1999 Sandrou, Baltussenem, a kol. v Research Institute of Chromatography (Kortrijk, Belgie) [48].

Hlavními rozdíly mezi SPME a SBSE technikami jsou konstrukce extrakčního systému a množství sorbentu. SBSE je vhodná na extrakci organických látek z vodného prostředí bez využití rozpouštědla a může být používána pro extrakci relativně polárních sloučenin. Kvantitativní extrakce lze dosáhnout u rozpustných látek, jejichž hodnota log $K_{o/w}$ je 4. Pro vysoce polární sloučeniny se jako u SPME zařazuje krok derivatizace. Stejně jako SPME, lze SBSE hodnotit různými parametry, jako je typ a tloušťka povlaku, doba extrakce, vlastnosti vzorku (pH, iontová síla), vliv míchání a teplota. Doba extrakce je obvykle delší než u SPME z důvodu většího množství sorpční vrstvy, tudíž trvá déle, než se ustálí rovnováha. Desorpce analytu je u SBSE taktéž kritičtější, a to také kvůli většímu množství sorpční vrstvy [43, 48].

Použití SBSE techniky bylo rozšířeno téměř okamžitě k odběru vzorků v parní fázi, tato technika je známá jako HSSE (Headspace Stir Bar Sorptive Extraction). Vzorkování u HSSE

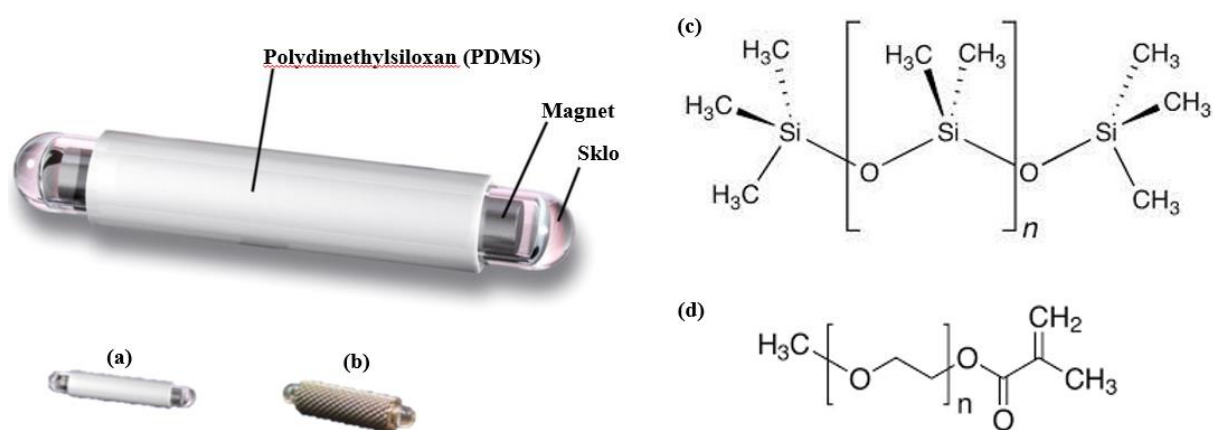
metody je prováděno staticky, kdy se látka extrahuje z plynné fáze nad vzorkem. Hlavní přednosti SBSE a HSSE vyplývají ze skutečnosti, že tyto techniky jsou snadno použitelné na automatizaci, jsou vysoce flexibilní (mohou být použity bez rozdílu nejen pro odběr vzorků z plynné nebo kapalně fáze, ale i pro heterogenní vodné vzorky), vysoce citlivé, robustní, opakovatelné a reprodukovatelné [49].

1.2.4.1 Popis mikroextrakce na míchací tyčince

Míchadélko pro SBSE je sestaveno z kovové magnetické tyčinky, jenž je zalitá ve skle. Sorpční fáze navrstvená na skle je tvořena různými polymerními materiály, nejvíce využívaným polymerem je polydimethylsiloxan (PDMS). Hlavní výhodou je inertnost PDMS vůči polárním a reaktivním sloučeninám. Zajišťuje rovněž linearitu sorpčních izoterm, které jsou zásadní pro následnou kvantitativní chromatografickou analýzu. PDMS je nepolární polymer, je tedy vhodný pro extrakci nepolárních a mírně polárních sloučenin. Sorpci lze pozitivně ovlivnit přidáním soli ke kapalně matrici vzorku (vysolováním). Tloušťka PDMS vrstvy je obvykle 0,5 mm nebo 1,0 mm, délka 10 mm nebo 20 mm a objem sorpční fáze se pohybuje v rozmezí 24-126 μ l [50, 51].

Druhým užívaným materiálem je kopolymerem tvořený PDMS a polyethylenglykolem (PEG). Takovýto typ míchadélka se vyrábí pod názvem Twicester. Tato vrstva umožňuje nespecifickou sorpci nepolárních sloučenin a na rozdíl od samotné vrstvy PDMS i specifickou sorpci polárnějších látek, jež jsou donory vodíkových vazeb (např. fenoly). Kopolymer je nanesen na inertní kovovou mřížku pro jeho mechanickou stabilizaci (viz Obrázek 16). Vzhledem k vysokému zakoncentrování analytu, lze kromě tepelné desorpce z tyčinky Twister využít i zpětnou extrakci sledovaného analytu z PDMS fáze do malého množství organického rozpouštědla. Pokud nejsou látky ve stopových koncentracích, lze je určit s dostatečnou přesností, ale celkově se snižuje citlivost metody použitím rozpouštědel [48, 50, 52].

Dnes se vyrábějí PDMS tyčinky s využitím sol-gel technologie. Proces sol-gel nabízí pohodlnou a všestrannou cestu pro přípravu anorganických a organicko-anorganických hybridních materiálů s laditelnou porézností, selektivitou, tepelnou a chemickou stabilitou. Míchací tyčinka potažená vysoko porézním sol-gel PDMS s tloušťkou povlaku 30 μ m byla vyvinutá profesorem W. Liu. Takovýto nátěr vykazuje dobrou stabilitu do 300 °C. Tento typ tyčinky byl použit pro analýzu n-alkanů, PAHs (Polyaromatic Hydrocarbons) a pesticidů, kdy rovnovážného stavu bylo dosaženo do 15 minut [50, 51, 53].



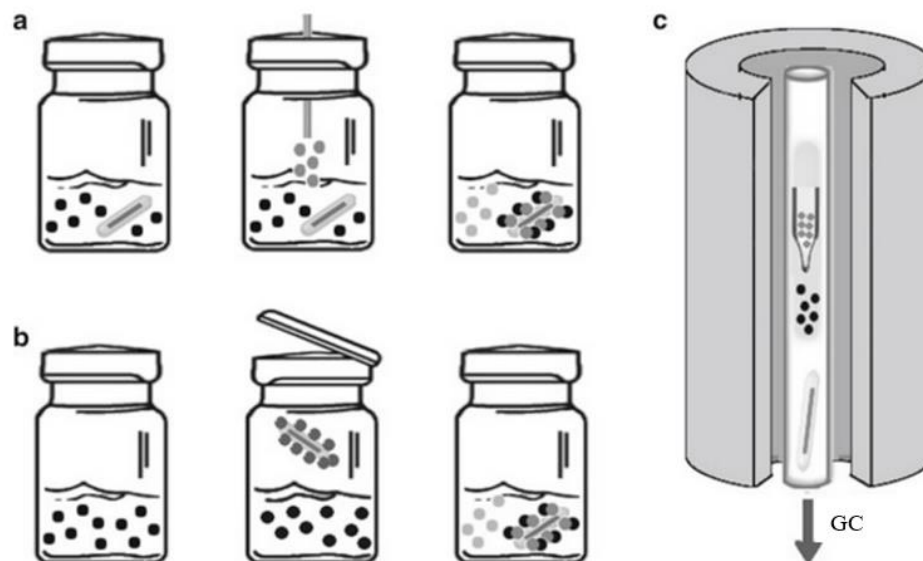
Obrázek 16- Míchadélka pro SBSE techniku [49, 50]

(a) SBSE s PDMS, (b) SBSE s PDMS a polyethylenglykolem (PEG), (c) vzorec PDMS, (d) vzorec PEG

1.2.4.2 Derivatizace pro mikroextrakci na míchací tyčince

SBSE tyčinka může být použita pro tepelnou desorpci, je-li spojena s plynovou chromatografií. Nicméně pro analýzu polárnějších sloučenin není vhodné užití GC. Je tedy nezbytné zařadit krok derivatizace pro polární a tepelně nestabilní sloučeniny, kdy cílem je vytvořit hydrofóbnější sloučeniny, které podléhají sorpci na PDMS [38, 41].

Jsou celkem tři způsoby derivatizace (viz Obrázek 17), a to *in situ*, derivatizace na míchadélku obohaceném o derivatizační činidlo a derivatizace *in port*. První zmíněná derivatizace *in situ* spočívá v přidání látky do vodného prostředí vzorku. Tato látka následně reaguje se stanovovanou sloučeninou za vzniku jejího hydrofóbnějšího derivátu, jenž je schopný účinně sorpce na PDMS. Použitím míchadélka obohacené o derivatizační činidlo, dochází po vložení do extrakční nádoby k derivatizaci analytu a následně sorpci na vrstvu PDMS. Derivatizace po extrakci (*in port*) je založena na vložení míchadélka do nádoby s derivatizační složkou, která je následně umístěna do desorpční trubičky, kde zároveň dochází k derivatizaci a tepelné desorpci analytu [41, 42].

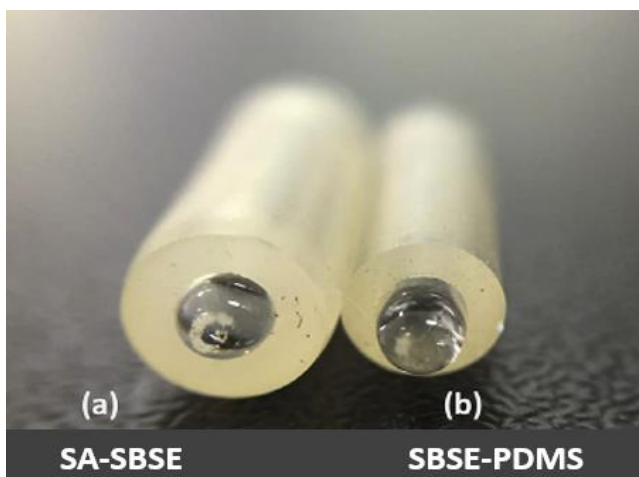


Obrázek 17- Způsoby derivatizace [35]
 (a) in situ, (b) na polymer, (c) in port

1.2.4.3 Rozpouštědlem asistovaná extrakce

Sorbent Assisted Stir Bar Sorptive Extraction (SA-SBSE) je nová technika vyvinutá pro extrakci polárních látek. Pro polárnější rozpuštěné látky byly použity různé metody derivatizace pro zvýšení hydrofobicity SBSE tyčinky. V průběhu let byly vyvinuty další sorpční materiály pro lepší extrakci polárních sloučenin, avšak pouze omezený počet má příznivé tepelné charakteristiky, které musí splnit pro aplikaci s TD-GC-MS (Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry) [54].

Komerčně dostupný je pouze kopolymer PDMS a ethylenglykol (EG) umístěný na inertní kovové mřížce pro mechanickou stabilizaci. Jiné sorpční materiály, jako jsou monolity, polyurethanové pěny nebo jiné polymery, se většinou používají v kombinaci s kapalnou desorpčí a nejsou komerčně dostupné ve formátu míchacích tyčinek připravených k použití. Nedávno byla vyvinuta metoda pro rozšíření SBSE na polárnější rozpuštěné látky, tzv. rozpouštědlem podporovaná SBSE (SA-SBSE). Srovnání komerční SBSE-PDMS a SA-SBSE je znázorněno na Obrázku 18 [54, 55].



Obrázek 18- Srovnání nabobtnané SA-SBSE a komerční SBSE s PDMS povrchem [54]

Příprava SA-SBSE se provádí při laboratorní teplotě (25 °C) po dobu nejméně 30 minut. Míchadélko SBSE s PDMS povrchem se ponoří do 1,5-2 ml rozpouštědla a položí se do vodorovné polohy dle Obrázku 19 nebo se míchá při 800 rpm na magnetické míchačce. Rozpouštědlo přitom působí nejen jako modifikátor PDMS (zvyšující difúzi), ale také jako další extrakční médium, což vede ke zvýšení výtěžku látek z vodné fáze. Zejména pro relativně polární látky s $\log K_{o/w} < 2,5$ se významně zlepšují odezvy. Dvanáct rozpouštědel s $\log K_{o/w}$ v rozmezí od -0,24 (aceton) do 3,90 (hexan) bylo zkoumáno na jejich použitelnost pro SA-SBSE (viz Tabulka 11). Bylo měřeno množství absorbovaného rozpouštědla (zvážením) v nabobtnalé míchací tyčince PDMS před a po SA-SBSE. To umožnilo spočítat poměr R (zbytek rozpouštědla po SA-SBSE:absorbované rozpouštědlo). Studie prokázala, že s rostoucím $\log K_{o/w}$ roste i poměr R. Obvykle může být stejná míchací tyčinka PDMS použita více než 50×, avšak po každém použití je nutné tyčinku znovu impregnovat rozpouštědlem [54-56].



Obrázek 19- Příprava SA-SBSE [55]

(1) Do lahvičky se pipetuje 150-200 μ l rozpouštědla (2) Rozpouštědlo se sorbuje > 30 min. (3) SA-SBSE vydrží nabobtnané až týden při laboratorní teplotě

Tabulka 11- Absorbovaná rozpouštědla na PDMS před a po SA-SBSE [54]

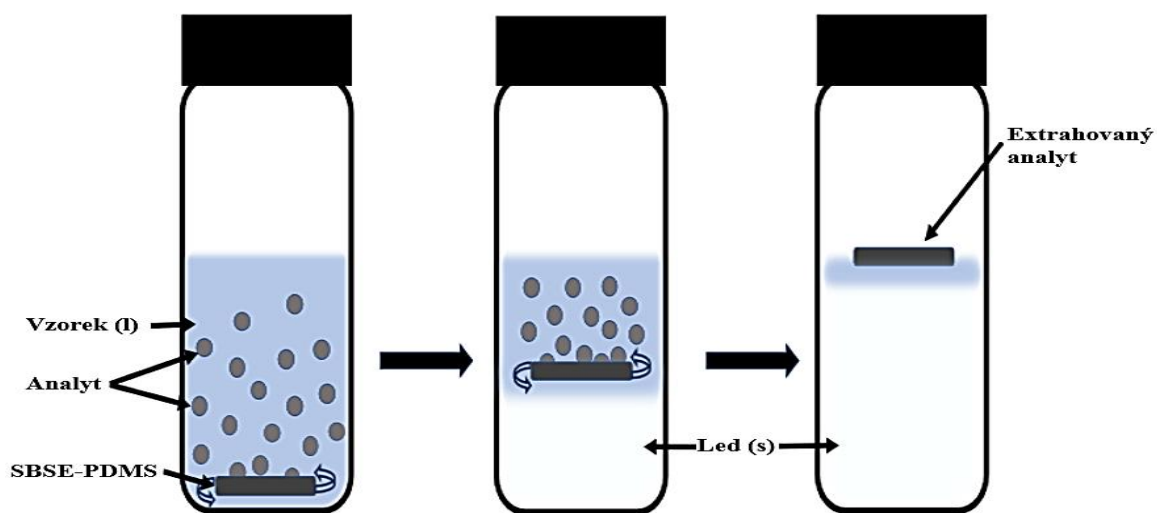
Rozpouštědlo	log $K_{o/w}$	Rozp. absorbováno [mg]	RSD % [n = 3]	Rozp. zbytek [mg]	RSD % [n = 3]	R
Aceton	-0,24	21	0,10	0,50	0,26	0,024
Acetonitril	-0,15	20	5,00	0,90	0,20	0,046
Methylacetát	0,37	37	0,30	2,40	0,06	0,064
Ethylacetát	0,86	67	1,30	13	0,95	0,20
Tetrahydrofuran	0,94	100	0,64	5,60	0,32	0,056
Diethylether	1,05	84	1,60	35	1,70	0,41
Methylisobutylketon	1,16	59	0,70	47	0,85	0,79
Dichloromethan	1,34	110	0,31	62	1,10	0,56
Diisopropylether	1,88	88	2,50	72	3,90	0,81
Toluen	2,54	82	2,10	77	1,60	0,94
Cyklohexan	3,18	79	2,90	71	2,20	0,90
n-Hexan	3,90	77	3,10	66	4,90	0,85

log $K_{o/w}$ - rozdělovací koeficient oktanol/voda; RSD- relativní směrodatná odchylka; R- poměr zbytku rozpouštědla po SA-SBSE ku absorbovanému rozpouštědlu

1.2.4.4 Zakoncentrování mrazem

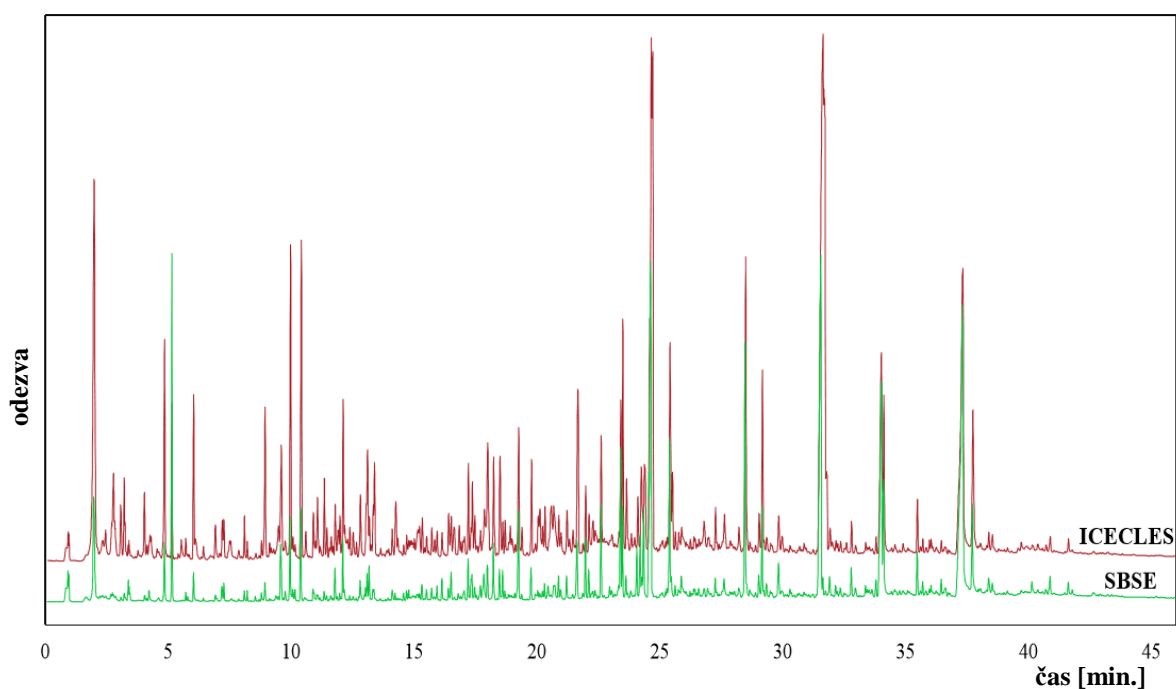
Stopová analýza pro polární a těkavé látky může být obtížná. Tento problém lze vyřešit novou technikou kombinující SBSE a FC (Freeze Concentration), zvanou Ice Concentration Linked with Extractive Stirrer (ICECLES). Využívá se SBSE míchací tyčinky, kdy během procesu míchání a extrakce je vzorek chlazen až zmrazen. Následně je extrakt uvolněn z tyčinky tepelnou desorpcí a analyzován plynovým chromatografem [56-58].

Zmrazení koncentráту je proces separace analytu od kapalné matrice, kdy dochází ke krystalizaci a zmražení kapaliny (Obrázek 20). Extrakce ICECLES metodou je obdobná konvenční SBSE metodě. Magnetické míchadélko s PDMS povrchem je vloženo do kapalného vzorku a mícháno při daných otáčkách, což vede k vytvoření rovnováhy mezi analyzovanou látkou a PDMS povrchem. Zmrazení vzorku tuto rovnováhu naruší ve prospěch povrchu míchadélka, na které se sorbuje více analytu [57, 58].



Obrázek 20- Schéma metody ICECLES [57]

Tato metoda byla poprvé publikována M. N. Omarem v roce 2006, kdy byla využita pro analýzu triazinových pesticidů a jejich produktů rozkladu v povrchových vodách. V roce 2017 Abdullah H. Alluhayb aplikoval metodu ICECLES na analýzu aromatických látek v zeleném čaji. Metodou ICECLES bylo extrahováno a následně pomocí GC-MS identifikováno 301 sloučenin ve srovnání s 245 pro SBSE extrakční metodu (srovnání na Obrázku 21), navíc látky dávaly vyšší odezvu. Některé z 56 složek, které byly identifikovány pouze ICECLES, jsou důležitá aromata a léčivé látky, jako například furfural, fenylethylalkohol, eugenol, maltol nebo α -terpineol [58, 59].



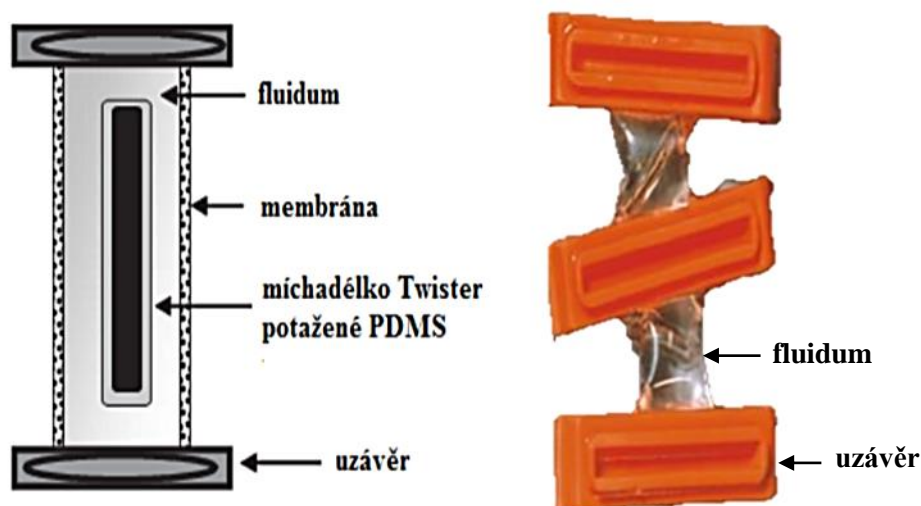
Obrázek 21- Srovnání chromatogramů po extrakci zeleného čaje metodou ICECLES a SBSE [59]

1.2.4.5 Extrakce v otevřeném/uzavřeném systému

Při extrakci v otevřeném systému je míchadélko užito jako pasivní vzorkovač. Pasivní vzorkování lze definovat jako volné proudění molekul analytu z matrice do sorpční fáze. Takovéto vzorkování je ovlivněno difúzí v důsledku rozdílných chemických potenciálů analytu v obou médiích. Difuze molekul trvá do ustanovení termodynamické rovnováhy systému [38, 62, 63].

Příkladem užití SBSE tyčinky jako pasivního vzorkovače je MESCO (Membrane Enclosed Sorptive Coating). Jak je znázorněno na Obrázku 22, míchadélka jsou uzavřena v sáčku, který funguje jako polopropustná membrána. Sáček je následně naplněn destilovanou vodou. Tento vzorkovač kombinuje pasivní vzorkování bez použití rozpouštědel a následnou desorpci analytu do chromatografického systému. Tato metoda byla úspěšně aplikovaná na analýzu PAHs a pesticidů [62, 63].

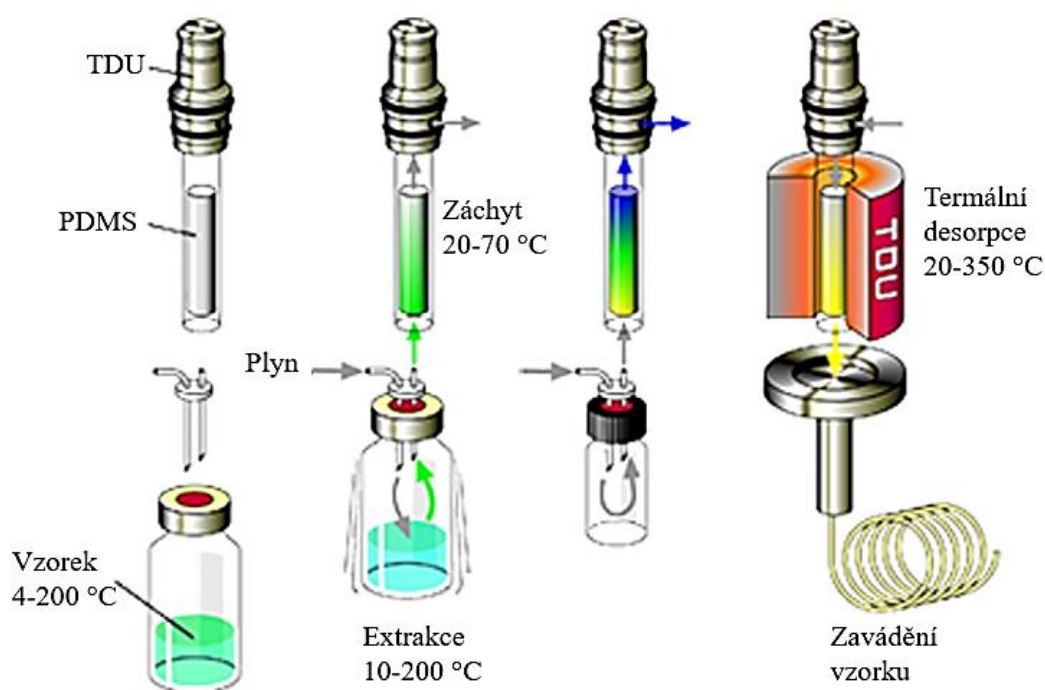
Při extrakci v uzavřeném systému z vodního prostředí je míchadélko ponořeno do kapalného vzorku o určitém objemu. Míchání probíhá za kontrolování mechanických a fyzikálních podmínek. Po vyjmutí, opláchnutí a osušení míchadélka dochází k procesu desorpce analytu. Druhou možností je HSSE, kdy je analyt extrahován z plynné fáze. Vzorek je nutné míchat a případně i zahřívát, aby docházelo k rovnovážné distribuci analytu. Obdobně jako SPME ovlivňuje sorpci rozdělovací koeficient, objem vzorku, pH, doba extrakce a rychlost míchání [38].



Obrázek 22- Pasivní vzorkovač MESCO [38, 62]

1.2.4.6 Typy desorpce

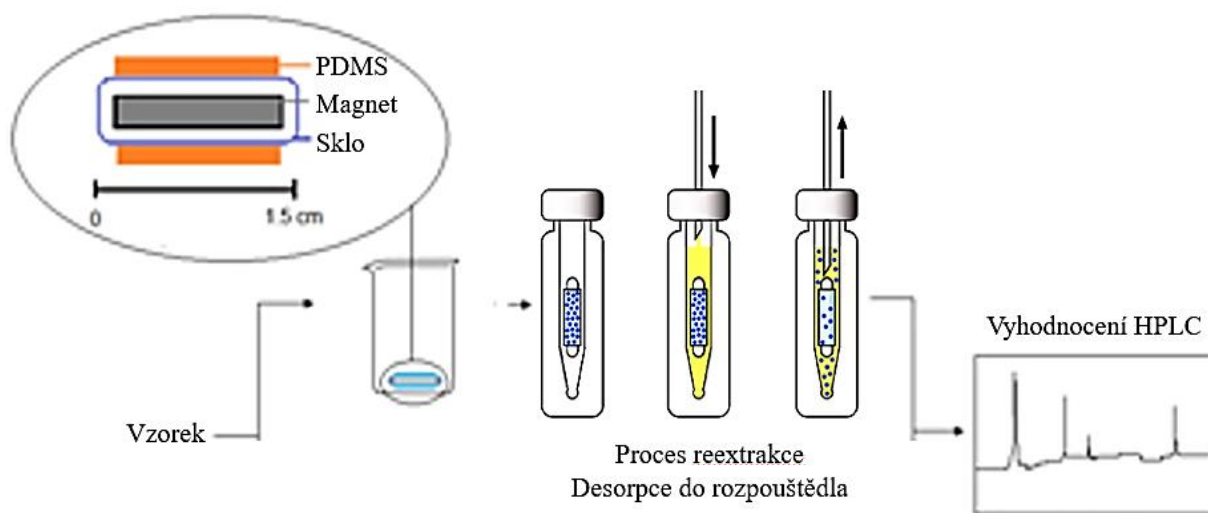
Při analýze těkavých látek se nejčastěji využívá tepelné desorpce spojené s plynovou chromatografií a hmotnostním detektorem. Tepelná desorpce, nazývaná také termální desorpce (TD), je proces, při němž není nutné použití rozpouštědel. Sorbované látky na vrstvě PDMS jsou desorbovány teplem a následně separovány a analyzovány pomocí GC. Tepelná desorpce je prováděna při teplotách v rozmezí 150-300 °C a celková doba desorpce může dosáhnout až patnácti minut, dle použité teploty a rychlosti průtoku inertního plynu, která se pohybuje v rozsahu 10-100 ml/min. Před samotnou desorpcí je míchadélko vloženo do skleněné desorpční trubičky (TDU; Thermal Desorption Unit), která je uzavřena adaptérem (viz Obrázek 23). TDU je flexibilním řešením pro tepelnou desorpci nebo extrakci a lze ji snadno připojit k GC. Transportní adaptér zamezuje kontaminaci a únik analytu a utěšňuje desorpční trubičku [38, 64, 65].



Obrázek 23- Znárodnění tepelné desorpce [66]

Druhým způsobem je desorpce do kapaliny, jenž je využívána pro netěkavé polární látky a látky termálně labilní. Tyto látky mohou být následně analyzovány pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie. Při desorpci do kapaliny je míchadélko vnořeno do rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel (viz Obrázek 24). Nejčastěji se pracuje s acetonitrilem, methanolem,

se směsí těchto rozpouštědel a směsí s vodou nebo pufrem v různých poměrech. Užití nepolárních rozpouštědel není vhodné, jelikož je vrstva PDMS absorbuje. PDMS vrstva následně nabobtná a je náchylná na mechanické poškození. Takto mohou být polárnější látky reextrahovány z PDMS s vysokou výtěžností, která je zejména závislá na rozdělovacím koeficientu [38, 67].



Obrázek 24- Znárodnění desorpce do kapaliny [68]

1.2.4.7 Mikroextrakce při analýze nápojů

Čím dál častěji se využívá metoda SBSE k extrakci nápojů. Ve výrobě nápojů je důležité dostat správnou chuť a aroma, aby se zachovala kvalita výrobku. Často některé rozpuštěné látky výrazně ovlivňují chuť řady nápojů jako např. vody, čajů, piva, whisky nebo kávy. Identifikace těchto analytů je prováděna plynovou nebo kapalinovou chromatografií, ale každá úspěšná analýza závisí na účinnosti počáteční extrakce [69].

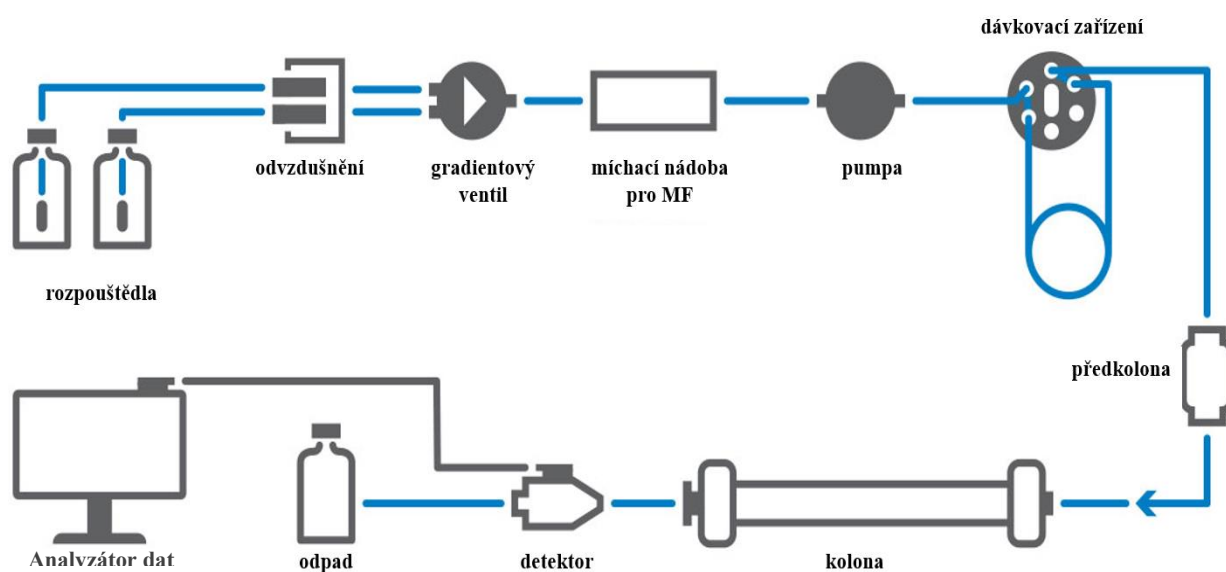
Mikroextrakční míchadélko SBSE vyráběné pod názvem Twister, lze využít k sorpci a analýze aroma a dalších sensorických látek díky univerzálnímu polydimethylsiloxanovému povlaku. Tato technologie byla například testována ke zjištění aroma zeleného čaje. U pravého zeleného čaje byla zjištěna řada rozpuštěných látek, které přispívají k jeho výrazné vůni a chuti. Sloučeniny, které byly analyzovány pomocí plynové chromatografie, jsou kumarin, guajakol, p-kresol, indol, 2-ethyl-3, 5-dimethyl-pyrazin, linalool, geraniol, a *cis*-jasmon [69].

Při analýze piva byly například analyzovány aromatické thioly, jako je 3-merkaptohexan-1-ol nebo 3-merkaptohexyl acetát. Tyto sloučeniny vytvářejí ovocné, citrusové nebo tropické aroma v pivu již při nízkých koncentracích. Míchací tyčinka s PDMS povrchem byla derivatizována kyselinou propionovou a po extrakci získaný 3-merkaptohexyl acetát byl detekován plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem [69, 70].

Další studie se zabývá stanovením mastných kyselin piva. Nasycené mastné kyseliny (hexanová apod.) vznikající během kvašení, způsobují žluklé aroma piva. Vyšší mastné kyseliny (linolová nebo linolenová) jsou významné, neboť po jejich degradaci dochází k vývinu typické staré chuti. Byly stanovovány mastné kyseliny za použití mikroextrakčních technik, a to SPME v headspace uspořádání a SBSE s následnou zpětnou extrakcí do organického rozpouštědla. Sloučeniny byly následně detekovány pomocí plynové chromatografie. Ukázalo se, že výhodou SBSE metody je, že tyčinka je robustnější než SPME vlákno. Ale celkový proces extrakce a reextrakce zabere více času. Metoda SPME byla vhodnější pro stanovení nižších masných kyselin. Pokud je nutné stanovit jak vyšší i nižší mastné kyseliny, je vhodnější metoda SBSE [71, 72].

1.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie patří mezi rozdělovací a vyhodnocovací metody. Mobilní fází je kapalina a dle uspořádání stacionární fáze se rozlišuje kolonová, tenkovrstvá a papírová kapalinová chromatografie. Oproti plynové chromatografii jsou látky obvykle separovány při nižších teplotách. Dle polarity fází se HPLC dělí na chromatografii s normálními a obrácenými fázemi. Druhý typ je více využíván, kdy stacionární fáze je nepolární (silikagel modifikovaný vhodným rozpouštědlem) a mobilní fáze je polární. Schéma HPLC a všechny jeho části jsou znázorněny na Obrázku 25 [73].

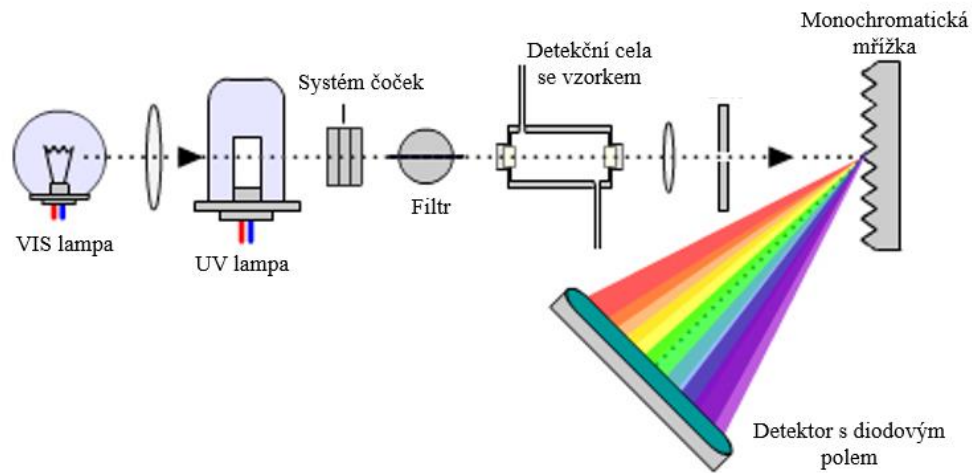


Obrázek 25- Schéma HPLC [74]

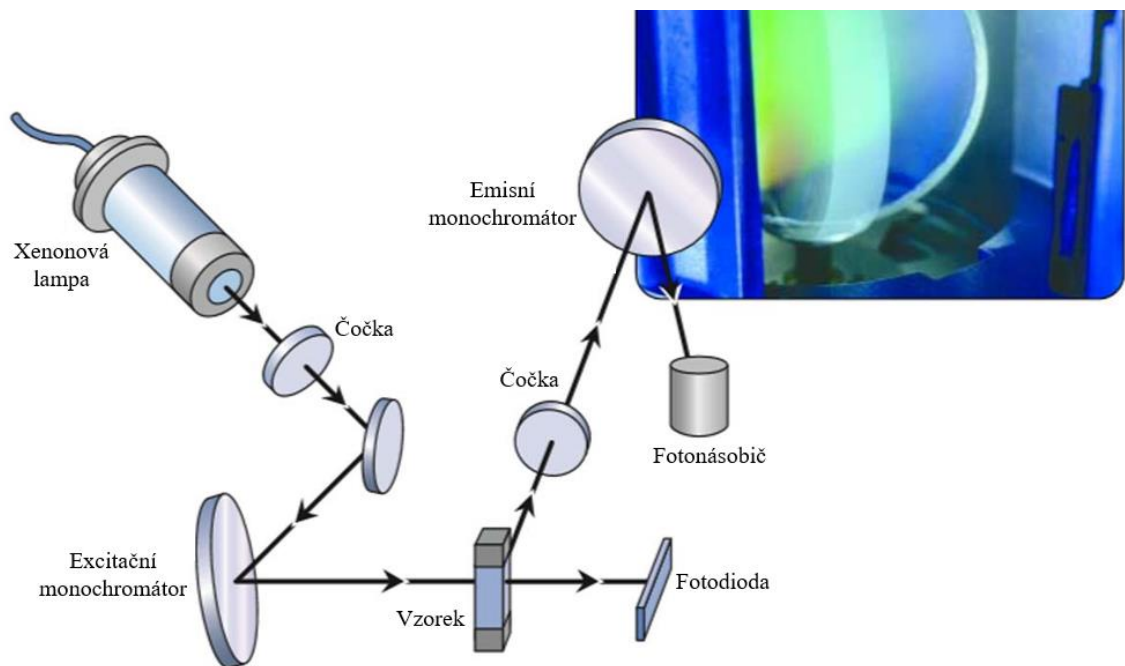
Při práci se SBSE se využívá zpětné reextrakce do rozpouštědla, které je dále vedeno do nástřikové komory HPLC. Nástřik vzorku může být manuální pomocí ventilu s dávkovací smyčkou nebo pomocí automatického dávkovače. Manuální nástřik má horší reprodukovatelnost, výhodou automatického dávkování je možnost nástřiku více vzorků bez nutnosti obsluhy. Takovéto dávkovače dokáží i udržet nastavenou teplotu pro tepelně nestabilní vzorky a je možné nastavit automatické míchání činidel před dávkováním, čehož se využívá při derivatizaci [73, 75].

Detektor je jednou z nejdůležitějších částí chromatografu. Dochází zde k převedení chemických nebo fyzikálních vlastností analyzované látky na signál, který je dále zpracován systémem. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s SBSE extrakcí nejčastěji využívá DAD detektor (Diode Array Detector), fotometrický detektor (UV/VIS oblast) nebo

FLD detektor (fluorescenční detektor). DAD a FLD detektor jsou znázorněny na Obrázku 26 a 27. Ideální detektor by měl dosahovat vysoké citlivosti, stability, linearity, krátké doby odezvy, spolehlivosti a nedestruktivnosti [75, 76].



Obrázek 26- Detektor s diodovým polem [77]



Obrázek 27- Fluorescenční detektor [78]

2 Experimentální část

2.1 Instrumentace a chemikálie

2.1.1 Kapalinový chromatograf s detekcí diodovým polem

- Kapalinový chromatograf (Nexera X2, Shimadzu corporation, Duisburg, Německo)
- Detektor s diodovým polem (Nexera X2 SPD–M30A, Shimadzu corporation, Duisburg, Německo)
- Čerpadla mobilní fáze (2× LC–30AD, Shimadzu corporation, Duisburg, Německo)
- Degasér (DGU–20A, Shimadzu corporation, Duisburg, Německo)
- Automatický dávkovač (Nexera X2 SPD–M30A, Shimadzu corporation, Duisburg, Německo)

2.1.2 Ostatní zařízení

- Sada magnetických míchadélek Twicester SBSE (Gerstel GmbH& Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Německo)
- Sada magnetických míchadélek Twister SBSE-PDMS (Gerstel GmbH& Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Německo)
- Magnetická míchadla IKA Squid (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- Digitální pH metr s pH elektrodou (Schott Glas, Mainz, Německo)
- Automatické pipety Biohit (Biohit OY, Helsinky, Finsko)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex TK 52 (Bandelin electronic, Berlin, Německo)
- Laboratorní váhy ABT 220-4M (Kern, Balingen, Německo)
- Odstředivka Nuve NF 400 + výkyvný rotor 4× 100 ml (Nuve sanaci malzemeleri imalat ve ticaret, Ankara, Turecko)
- Třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Německo)

2.1.3 Chemikálie a standardy

- ICE-3 kalibrační standard hořkých kyselin (Labor Veritas, Zurich, Švýcarsko)
- Methanol (99,9 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- Acetonitril (99,9 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina fosforečná (85 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Destilovaná voda (centrální rozvod Univerzity Pardubice, Pardubice, ČR)
- Redestilovaná voda (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)
- Ethanol (96 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Aceton (99,5 %, Penta, Chrudim, ČR)
- Cyklohexan (99 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Toluen (99 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dichlormethan (99,5 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Diethylether (99 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- 1-dodekanol (98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

2.2 Vzorky piva

V obchodních řetězcích byly zakoupeny vzorky piv pro analýzu hořkých kyselin. Tyto vzorky (Obrázek 28) byly uchovávány v lednici před i po jejich otevření. Pro odstranění oxidu uhličitého byly všechny vzorky po přelití do vhodné nádoby třepány na třepače po dobu minimálně 30 minut při 900-1000 rpm.



Obrázek 28- Vzorky piv

- Hrabalův Jubilejní ležák (Postřižinské pivo, za studena chmelené), 5,8 % obj., Francinův ležák (Postřižinské pivo), 5,1 % obj. (Pivovar Nymburk spol. s.r.o, Nymburk, ČR)
- Lobkowicz premium ALE (za studena chmelený), 4,4 % obj., Lobkowicz premium ležák, 4,7 % obj. (Pivovar Vysoký Chlumeč a.s., Vysoký Chlumeč, ČR)
- Krušovice ležák za studena chmelený, 4,8 % obj., Krušovice 12 ze žateckého chmele, 5,0 % obj. (Královský pivovar Krušovice, Krušovice, ČR)
- New England IPA, 6,3 % obj. (pivovar Mordýř s. r. o., dolní Ředice, ČR)
- Svijanský máz, 4,8 % obj., Svijanský rytír (za studena chmelený), 5,0 % obj. (Pivovar Svijany a.s., Svijany, ČR),
- Bakalář světlý ležák, 4,9 % obj., Bakalář za studena chmelený, 5,2 % obj., Bakalář nealko za studena chmelený, max. 0,5 % obj. (Tradiční pivovar v Rakovníku, a.s., Rakovník, ČR)
- India Pale Ale Primátor (za studena chmelený), 6,5 % obj., Primátor premium, 5,0 % obj. (Primátor a.s, Náchod, ČR)

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava kalibrační řady pro kvantifikaci

Pro přípravu kalibrační řady byl použit standard ICE–3, jenž byl uchováván v lednici. Navážené množství 0,5090 g bylo rozpuštěno v methanolu a poté převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Z tohoto roztoku o koncentraci 5,090 g/l bylo připraveno 8 kalibračních roztoků, které byly následně okyseleny kyselinou fosforečnou na pH 2. Takto připravené kalibrační roztoky byly proměřeny metodou HPLC-DAD.

2.3.2 Extrakce na míchací tyčince s povrchem z polydimethylsiloxanu

Před prvním použitím bylo nutné míchadélka kondicionovat proudem inertního plynu (dusík) při 250 °C po dobu 1 hodiny. Po vychladnutí v exsikátoru, byla míchadélka připravena k použití (extrakci). Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10,56 g/l. Z tohoto roztoku bylo připraveno 8 kalibračních roztoků, které byly následně okyseleny kyselinou fosforečnou na pH 2. Každý bod kalibrace byl extrahován 3× a každý extrakt byl proměřen 3×.

Po extrakci bylo použito 50 ml vzorku, do kterého bylo vloženo SBSE-PDMS míchadélko, které extrahovalo hořké kyseliny při maximálních otáčkách magnetického míchadla (2500 rpm) po dobu 1 hodiny. Po skončení extrakce bylo míchadélko vyjmuto z roztoku, omyto destilovanou vodou a osušeno. Dále byly hořké kyseliny desorbovány z míchadla dvojnásobnou desorpcí v 1500 µl 50% acetonitrilu v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut a následně analyzovány metodou HPLC-DAD.

2.3.3 Extrakce na míchací tyčince s povrchem z ethylenglykolu

Před prvním použitím bylo nutné míchadélka kondicionovat při 250 °C po dobu 1 hodiny. Po vychladnutí v exsikátoru, byla míchadélka připravena k použití (extrakci). Ze zásobního roztoku standardu ICE–3 o koncentraci 10,56 g/l bylo připraveno 7 kalibračních roztoků, které byly následně okyseleny kyselinou fosforečnou na pH 2. Přičemž každý bod kalibrace byl extrahován 3× a každý extrakt byl proměřen 3×.

Po extrakci bylo použito 50 ml vzorku, do kterého bylo vloženo SBSE-EG míchadélko, které extrahovalo hořké kyseliny při maximálních otáčkách magnetického míchadla (2500 rpm)

po dobu 1 hodiny. Po skončení extrakce bylo míchadélko vyjmuté z roztoku, omyto destilovanou vodou a osušeno. Dále byly hořké kyseliny desorbovány z míchadla dvojnásobnou desorpcí v 1500 μ l 96% ethanolu v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut a následně analyzovány metodou HPLC-DAD.

2.3.4 Rozpouštědlem asistovaná extrakce na míchací tyčince

Kondiciovaná míchadélka byla podrobena sorpci rozpouštědla. Do nádoby byly dávkovány 2 ml toluenu, následně bylo vloženo míchadélko, vialka se uzavřela a po dobu 1 hodiny se nechala v klidu ležet v horizontální poloze. Poté bylo SBSE míchadélko vyjmuté z nádoby a osušeno, následně bylo připraveno na extrakci analytu. Byla připravena kalibrační řada ze zásobního roztoku o koncentraci 11,64 g/l, kterou tvořilo 6 kalibračních roztoků.

Po úpravě pH kyselinou fosforečnou na hodnotu 2, probíhala extrakce 50 ml roztoku při maximálních otáčkách (2500rpm) po dobu 1 hodiny. Po skončení extrakce bylo míchadélko vyjmuté z roztoku, omyto destilovanou vodou a osušeno. Dále byly hořké kyseliny desorbovány z míchadla dvojnásobnou desorpcí v 1500 μ l 50% acetonitrilu v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut a následně analyzovány metodou HPLC-DAD. Každý roztok byl připraven 3 \times a výsledné extrakty proměřeny 3 \times . Pro další extrakci analytu bylo nutné celý postup včetně sorpce rozpouštědla opakovat.

2.3.5 Extrakce vzorků pív

Po vytřepání a zbavení pív oxidu uhličitého bylo odměřeno 50 ml analyzovaného piva, jež bylo okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 2. Následně bylo vloženo SBSE-PDMS míchadélko, které bylo napuštěno toluenem. Takto připravené míchadélko extrahovalo hořké kyseliny 1 hodinu za nejvyšších otáček magnetické míchačky (2500 rpm). Po ukončení extrakce bylo míchadélko promyto vodou, osušeno a desorbováno v 1500 μ l 50% acetonitrilu. Každý vzorek byl extrahován 3 \times a tyto extrakty byly proměřeny 3 \times metodou HPLC-DAD. Obsah hořkých kyselin byl vyhodnocen z kalibrační řady SA-SBSE-PDMS.

Následně byly obdobně připraveny vzorky pív se standardním přídatkem, jež činil 20 μ l ICE-3 standardu o koncentraci 11,64 g/l v 100 % methanolu. Standardní přídatek byl přidán do 50 ml vzorku piva před extrakcí.

2.4 Analýza extraktů

U všech vzorků byla aplikovaná následná metoda pro měření hořkých kyselin. Izokratická eluce mobilní fází methanol/redestilovaná voda okyselená kys. fosforečnou na pH 2 (90:10), průtok 0,7 ml/min, dávkovaný objem 20 μ l, detekce 314 nm.

Kolona Ascentis® C18 25 cm \times 4,6 mm, 5 μ m (Supelco analytical, Bellefonte, PA, USA).

3 Výsledky a diskuze

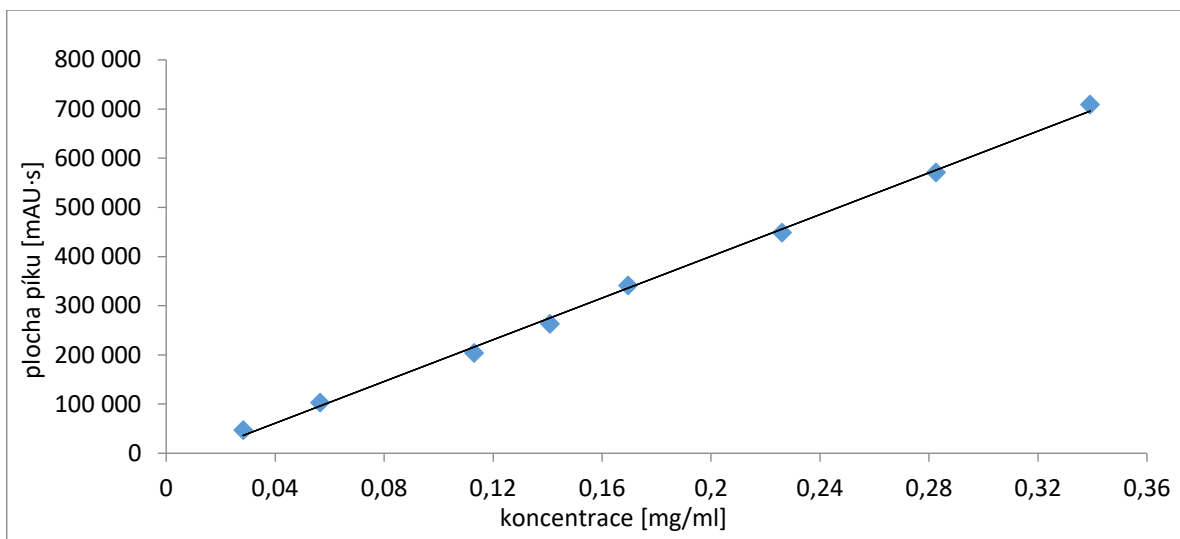
3.1 Kalibrační závislosti

Pro stanovení limitů detekce a kvantifikace přístroje bylo připraveno 8 kalibračních roztoků o koncentraci v rozmezí 0,2036 až 2,4432 g/l extraktu ICE-3, tyto koncentrace byly následně přepočítány pro jednotlivé hořké kyseliny dle procentuálního zastoupení ve standardu ICE-3 (viz Tabulka 12). Po proměření roztoku standardu, podle metody uvedené v kapitole 2.4, byly zjištěny retenční časy jednotlivých látek, které jsou uvedeny v Tabulce 12 společně se složením standardu ICE-3. Tato metoda stanovení α - a β -hořkých kyselin po extrakci je převzata z metody EBC 7.7.

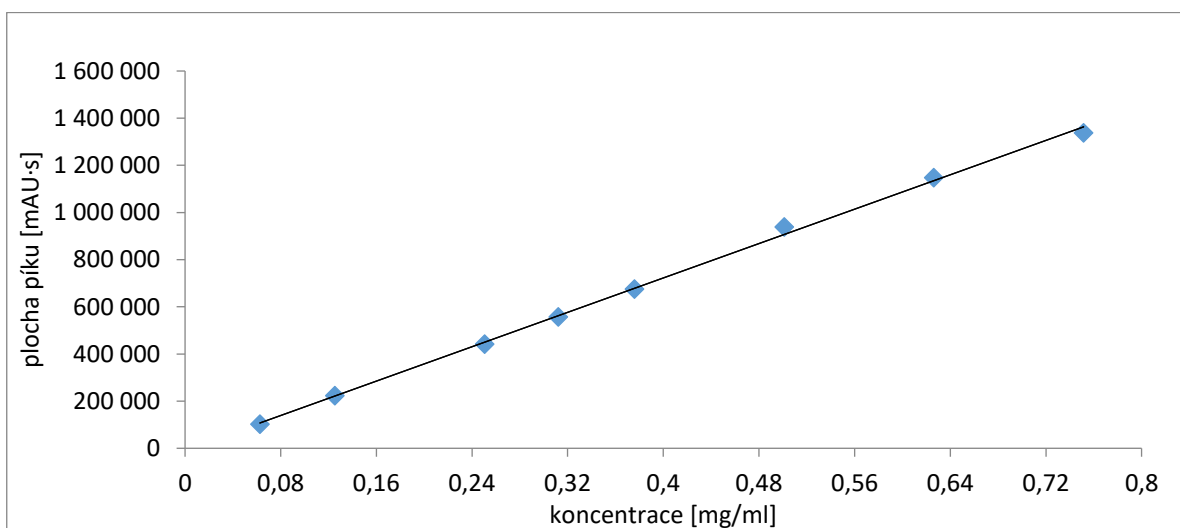
Tabulka 12- Složení standardu ICE-3 a retenční časy hořkých kyselin

Hořké kyseliny		Obsah v ICE-3 [%]	t _R [min.]
α -hořké kyseliny	Kohumulon	13,88	9,0
	Adhumulon + humulon	30,76	10,1
β -hořké kyseliny	Kolupulon	13,44	11,7
	Adlupulon + lupulon	10,84	13,4

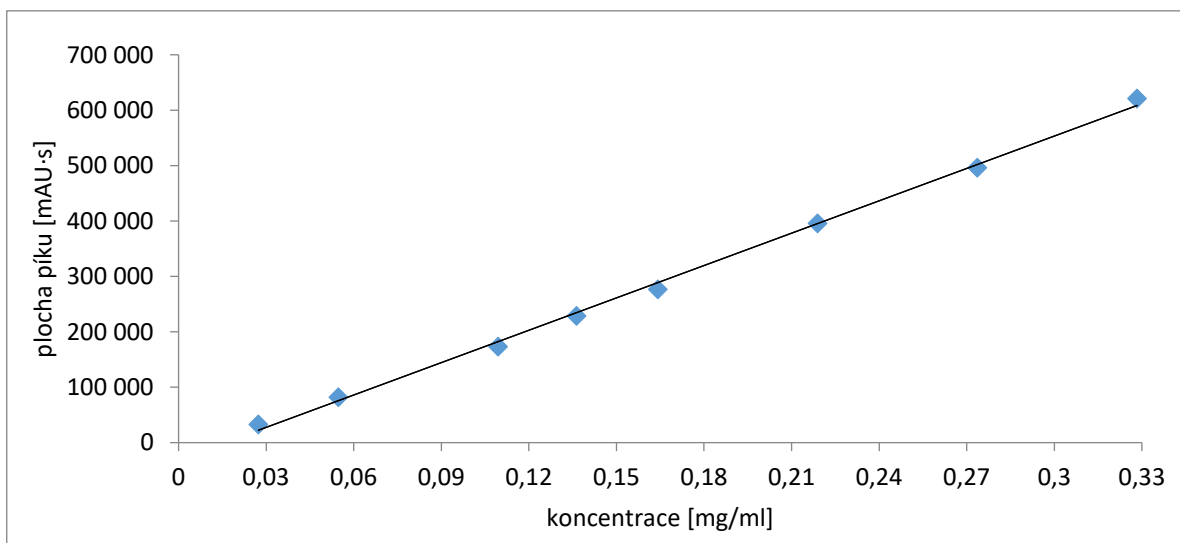
Kalibrační roztoky byly připraveny dle postupu popsáném v kapitole 2.3.1. Pro měření bylo dávkováno 20 μ l kalibračního roztoku pomocí autosampleru. Každý kalibrační bod byl proměřen 3 \times . Po proměření čisté mobilní fáze byl z chromatogramů odečten šum a byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti. Byly vyhodnoceny plochy pro jednotlivé látky v kalibračních roztocích a byly vytvořeny kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci pro jednotlivé hořké kyseliny. Kalibrační závislost pro kohumulon je znázorněna na Obrázku 29, pro adhumulon + humulon na Obrázku 30, pro kolupulon na Obrázku 31 a pro adlupulon + lupulon na Obrázku 32. Získané rovnice regrese společně s hodnotami koeficientů determinace jsou v Tabulce 13. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítány pomocí maticového výpočtu v programu Excel, a to jako koncentrace odpovídající trojnásobku, resp. desetinásobku šumu. Jako šum byla brána směrodatná odchylka úseku příslušné kalibrační závislosti. Příslušné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v souhrnné tabulce na konci této kapitoly. Vzorový chromatogram z měření této kalibrace je uveden v příloze I (Obrázek I.1).



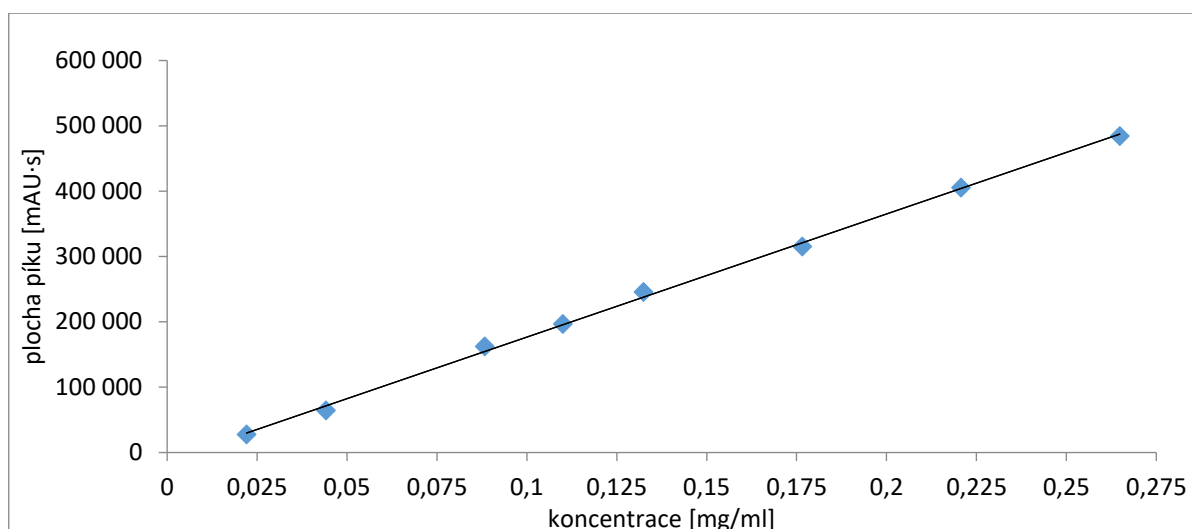
Obrázek 29- Kalibrační závislost pro kohumulon bez extrakce



Obrázek 30- Kalibrační závislost pro adhumulon + humulon bez extrakce



Obrázek 31- Kalibrační závislost pro kolupulon bez extrakce



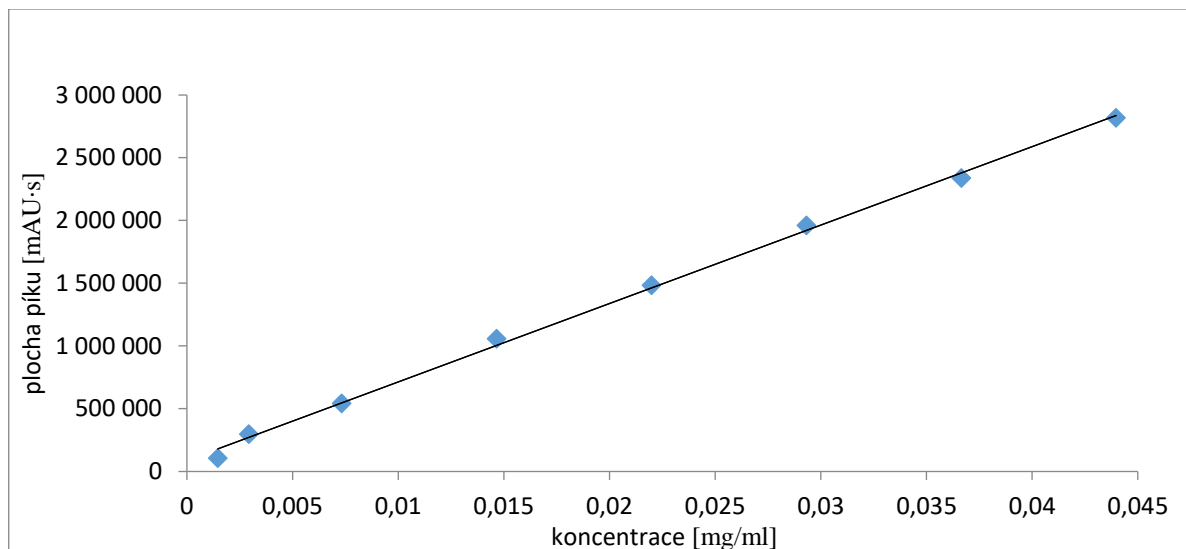
Obrázek 32- Kalibrační závislost pro adlupulon + lupulon bez extrakce

Tabulka 13- Rovnice regrese s koeficientem determinace jednotlivých kalibračních závislostí

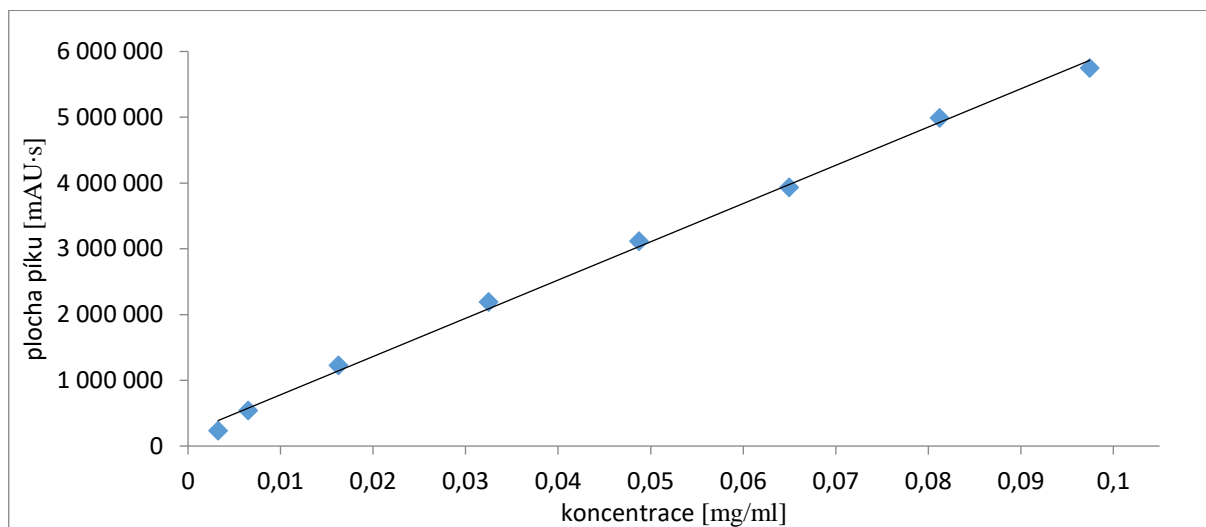
Hořké kyseliny	Rovnice regrese	R ²
Kohumulon	$y = 2,12 \cdot 10^6 x - 23837$	0,9980
Adhumulon + humulon	$y = 1,82 \cdot 10^6 x - 6835,5$	0,9985
Kolupulon	$y = 1,95 \cdot 10^6 x - 30811$	0,9979
Adlupulon + lupulon	$y = 1,88 \cdot 10^6 x - 11776$	0,9988

Byla provedena optimalizace extrakce SBSE-PDMS, která je popsána v následujících kapitolách 3.2.1 a 3.2.3. Kalibrační body pro extrakci metodou SBSE-PDMS byly připraveny podle postupu v kapitole 2.3.2. Bylo připraveno 8 kalibračních roztoků z chmelového standardu ICE-3 v koncentračním rozsahu 0,0106 až 0,3168 g/l, tyto koncentrace byly následně přečíslovány pro jednotlivé hořké kyseliny dle procentuálního zastoupení ve standardu ICE-3. Po proměření roztoků, podle metody uvedené v kapitole 2.4, byly zjištěny retenční časy jednotlivých látek. Z důvodu použití kalibrační přímky pro možnou kvantifikaci hořkých kyselin ve vzorcích piva byl jako rozpouštědlo pro hořké kyseliny zvolen 5% ethanol, aby bylo co nejvíce napodobeno prostředí v reálném vzorku. V 5% ethanolu ale není standard rozpustný, proto bylo zvoleno rozpuštění v 96% ethanolu a následné ředění kalibračních roztoků 5% ethanolem. Kalibrační závislosti ploch pík na koncentraci kalibračních roztoků jsou pro jednotlivé hořké kyseliny znázorněny na Obrázku 33 pro kohumulon, na Obrázku 34 pro adhumulon + humulon, na Obrázku 35 pro kolupulon a na Obrázku 36 pro adlupulon + lupulon. V Tabulce 14 jsou uvedeny jednotlivé rovnice kalibračních přímek společně s hodnotami koeficientů determinace. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítány pomocí maticového výpočtu v programu Excel, a to jako koncentrace odpovídající trojnásobku, resp. desetinásobku šumu.

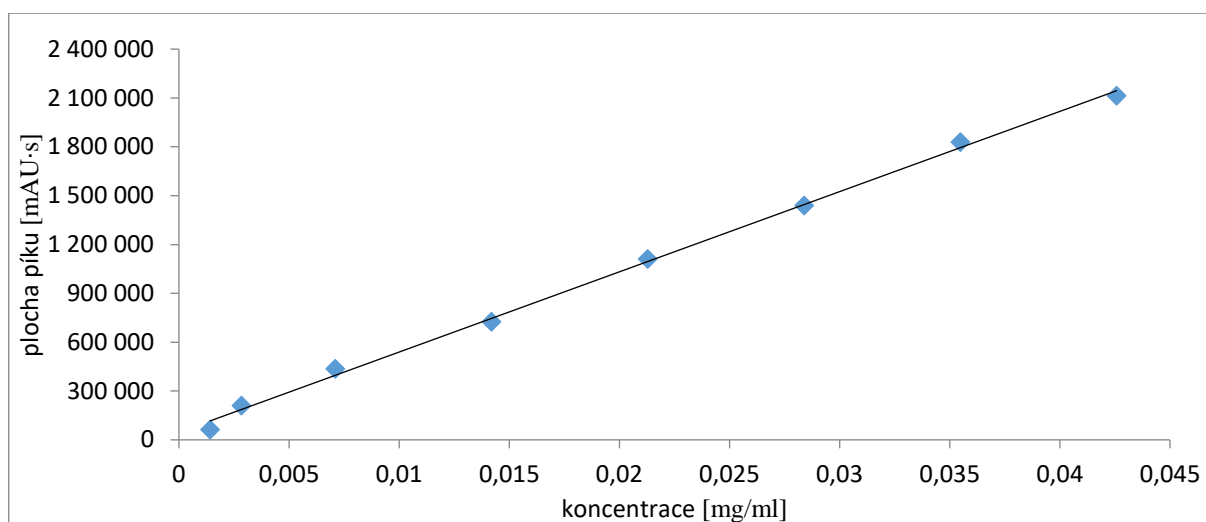
Jako šum byla brána směrodatná odchylka úseku příslušné kalibrační závislosti. Příslušné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v souhrnné tabulce na konci této kapitoly. Vzorový chromatogram z měření této kalibrace je uveden v příloze I (Obrázek I.2).



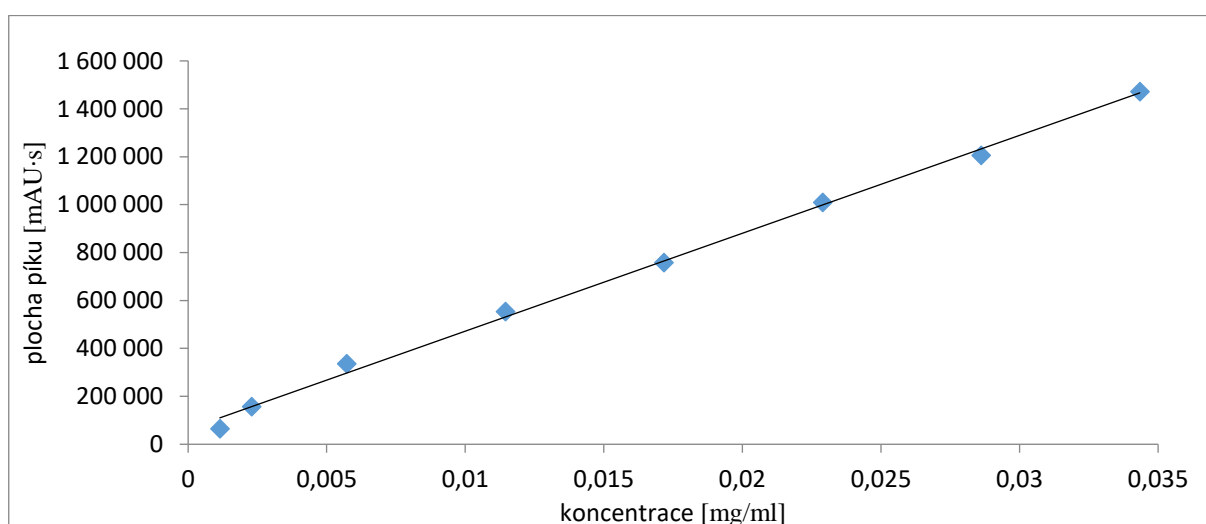
Obrázek 33- Kalibrační závislost pro kohumulon po extrakci SBSE-PDMS



Obrázek 34- Kalibrační závislost adhumulon + humulon po extrakci SBSE-PDMS



Obrázek 35- Kalibrační závislost pro kolupulon po extrakci SBSE-PDMS



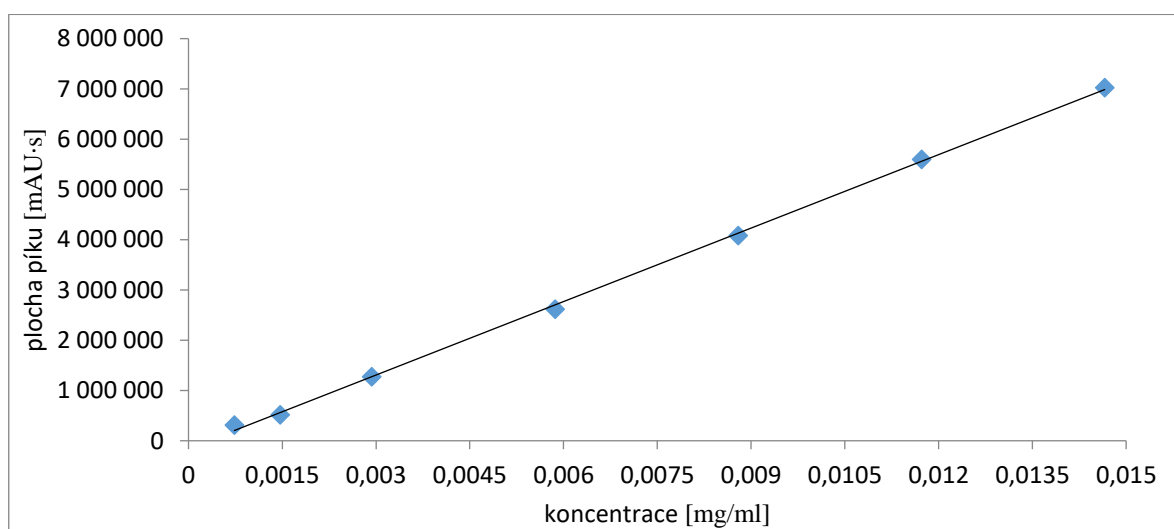
Obrázek 36- Kalibrační závislost pro adlupulon + lupulon po extrakci SBSE-PDMS

Tabulka 14- Rovnice regrese s koeficientem determinace jednotlivých kalibračních závislostí po extrakci SBSE-PDMS

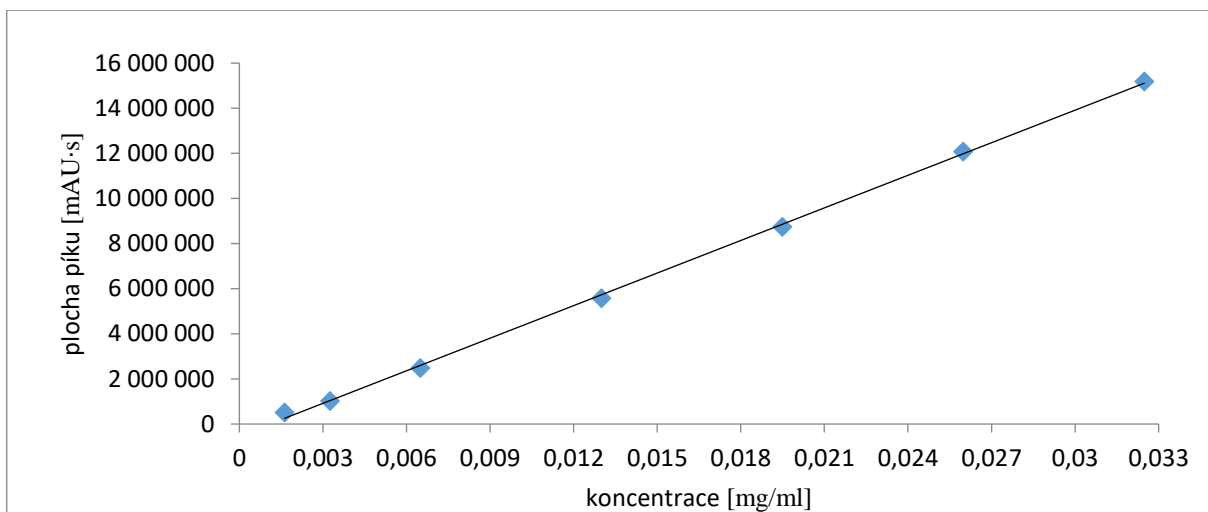
Hořké kyseliny	Rovnice regrese	R ²
Kohumulon	$y = 6,25 \cdot 10^7 x + 88561$	0,9982
Adhumulon + humulon	$y = 5,81 \cdot 10^7 x + 198697$	0,9976
Kolupulon	$y = 4,93 \cdot 10^7 x + 46740$	0,9981
Adlupulon + lupulon	$y = 4,09 \cdot 10^7 x + 63455$	0,9973

Byla provedena optimalizace extrakce SBSE-EG, která je popsána v následujících kapitolách 3.2.2 a 3.2.3. Kalibrační body pro extrakci metodou SBSE-EG byly připraveny podle postupu v kapitole 2.3.3. Bylo připraveno 7 kalibračních roztoků z chmelového standardu ICE-3 v koncentračním rozsahu $5,280 \cdot 10^{-3}$ až $1,056 \cdot 10^{-1}$ g/l, tyto koncentrace byly následně přepočítány pro jednotlivé hořké kyseliny dle procentuálního zastoupení ve standardu ICE-3.

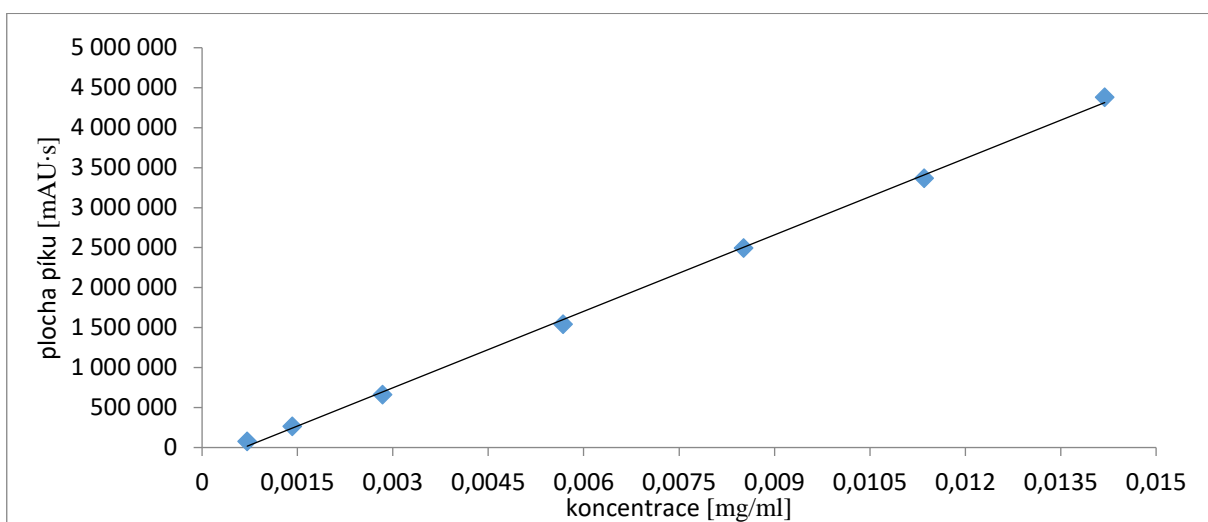
Po proměření roztoků, podle metody uvedené v kapitole 2.4, byly zjištěny retenční časy jednotlivých látek. Z důvodu použití kalibrační přímky pro možnou kvantifikaci hořkých kyselin ve vzorcích piva byl jako rozpouštědlo pro hořké kyseliny zvolen 5% ethanol, aby bylo co nejvíce napodobeno prostředí v reálném vzorku. V 5% ethanolu ale není standard rozpustný, proto bylo zvoleno rozpuštění v 96% ethanolu a následné ředění kalibračních roztoků 5% ethanolom. Kalibrační závislosti ploch pík na koncentraci kalibračních roztoků jsou pro jednotlivé hořké kyseliny znázorněny na Obrázku 37 pro kohumulon, na Obrázku 38 pro adhumulon + humulon, na Obrázku 39 pro kolupulon a na Obrázku 40 pro adlupulon + lupulon. V Tabulce 15 jsou uvedeny jednotlivé rovnice kalibračních přímek společně s hodnotami koeficientů determinace. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítány pomocí maticového výpočtu v programu Excel, a to jako koncentrace odpovídající trojnásobku, resp. desetinásobku šumu. Jako šum byla brána směrodatná odchylka úseku příslušné kalibrační závislosti. Příslušné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v souhrnné tabulce na konci této kapitoly. Vzorový chromatogram z měření této kalibrace je uveden v příloze I (Obrázek I.3).



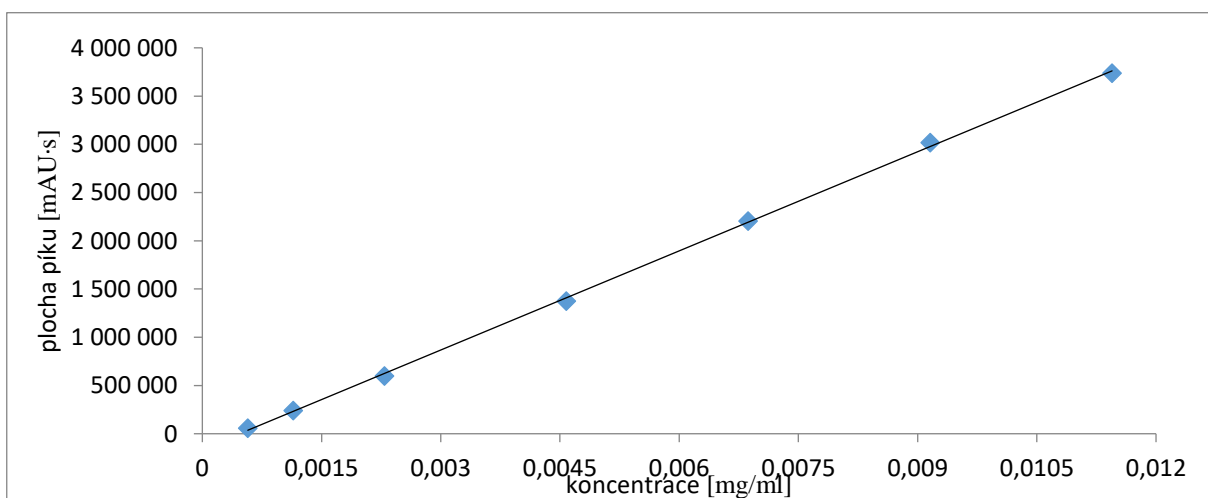
Obrázek 37- Kalibrační závislost pro kohumulon po extrakci SBSE-EG



Obrázek 38- Kalibrační závislost pro adhumulon + humulon po extrakci SBSE-EG



Obrázek 39- Kalibrační závislost pro kolupulon po extrakci SBSE-EG

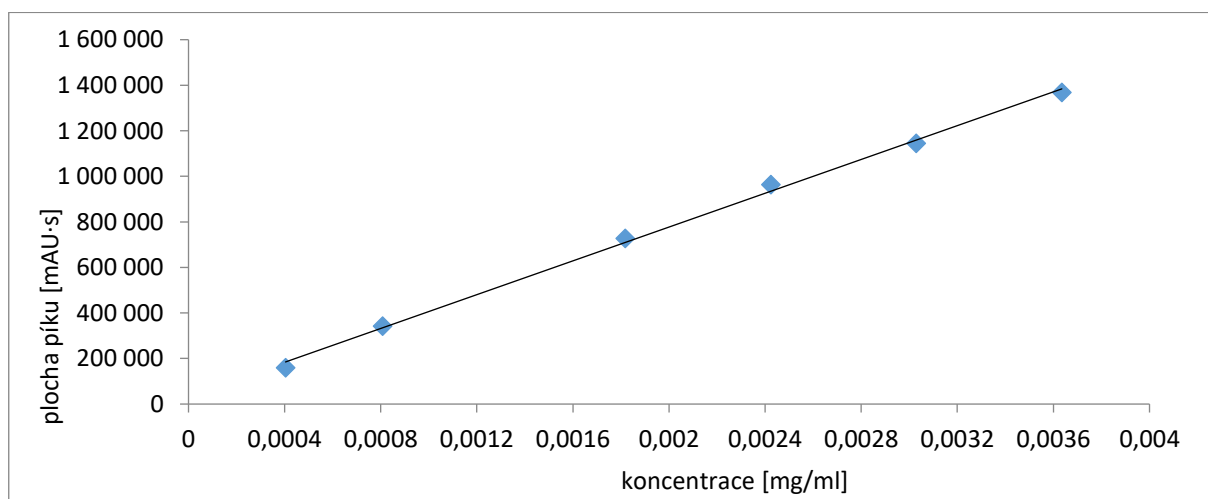


Obrázek 40- Kalibrační závislost roztoku pro adlupulon + lupulon po extrakci SBSE-EG

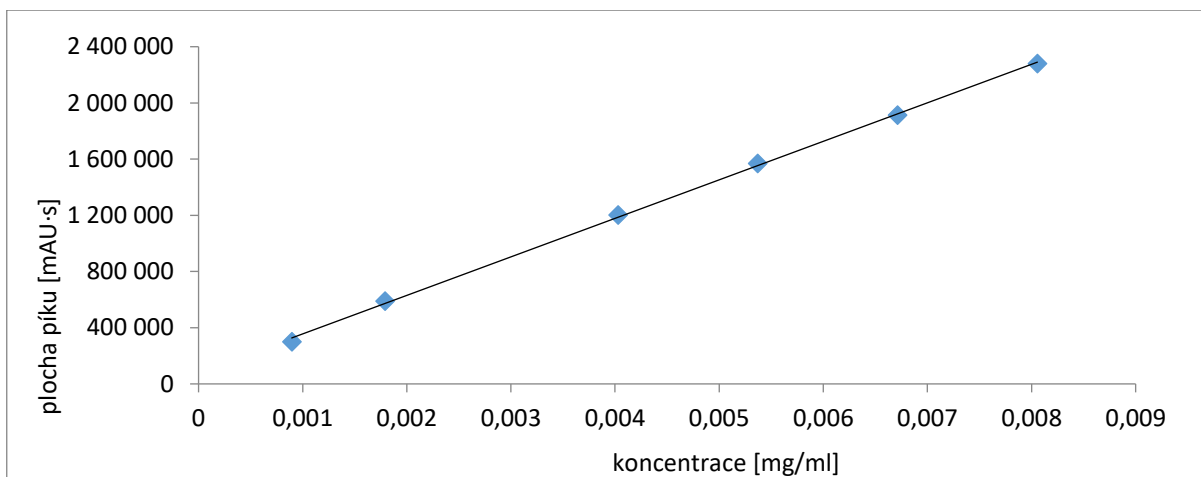
Tabulka 15- Rovnice regrese s koeficientem determinace jednotlivých kalibračních závislostí po extrakci SBSE-EG

Hořké kyseliny	Rovnice regrese	R ²
Kohumulon	$y = 4,87 \cdot 10^8 x - 153622$	0,9993
Adhumulon + humulon	$y = 4,81 \cdot 10^8 x - 527902$	0,9993
Kolupulon	$y = 3,19 \cdot 10^8 x - 209184$	0,9991
Adlupulon + lupulon	$y = 3,43 \cdot 10^8 x - 159927$	0,9996

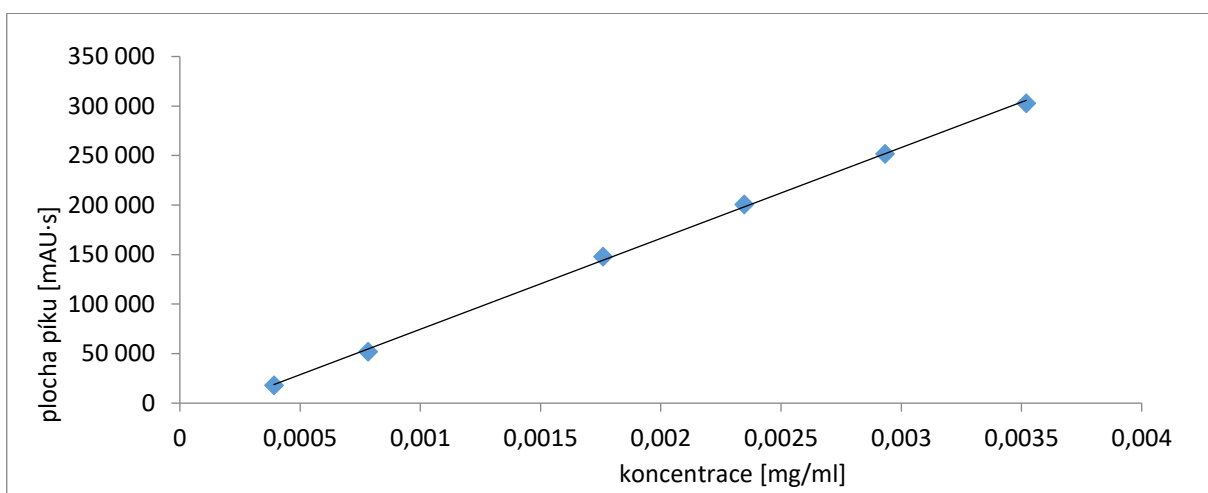
Byla provedena optimalizace extrakce SA-SBSE-PDMS, která je popsána v následujících kapitolách 3.2.3 a 3.2.4. Kalibrační body pro extrakci metodou SA-SBSE-PDMS byly připraveny dle postupu v kapitole 2.3.4. Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků z chmelového standardu ICE-3 v koncentračním rozsahu $2,910 \cdot 10^{-3}$ až $2,619 \cdot 10^{-2}$ g/l, tyto koncentrace byly následně přepočítány pro jednotlivé hořké kyseliny dle procentuálního zastoupení ve standardu ICE-3. Po proměření roztoků, podle metody uvedené v kapitole 2.4, byly zjištěny retenční časy jednotlivých látek. Z důvodu použití kalibrační přímky pro kvantifikaci hořkých kyselin ve vzorcích piva byl jako rozpouštědlo pro hořké kyseliny zvolen 5% ethanol, aby bylo co nejvíce napodobeno prostředí v reálném vzorku. Kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci kalibračních roztoků jsou pro jednotlivé hořké kyseliny znázorněny na Obrázku 41 pro kohumulon, na Obrázku 42 pro adhumulon + humulon, na Obrázku 43 pro kolupulon a na Obrázku 44 pro adlupulon + lupulon. V Tabulce 16 jsou uvedeny jednotlivé rovnice kalibračních přímek společně s hodnotami koeficientů determinace. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítány pomocí maticového výpočtu v programu Excel, a to jako koncentrace odpovídající trojnásobku, resp. desetinásobku šumu. Jako šum byla brána směrodatná odchylka úseku příslušné kalibrační závislosti. Příslušné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v souhrnné tabulce na konci této kapitoly. Vzorový chromatogram z měření této kalibrace je uveden v příloze I (Obrázek I.4).



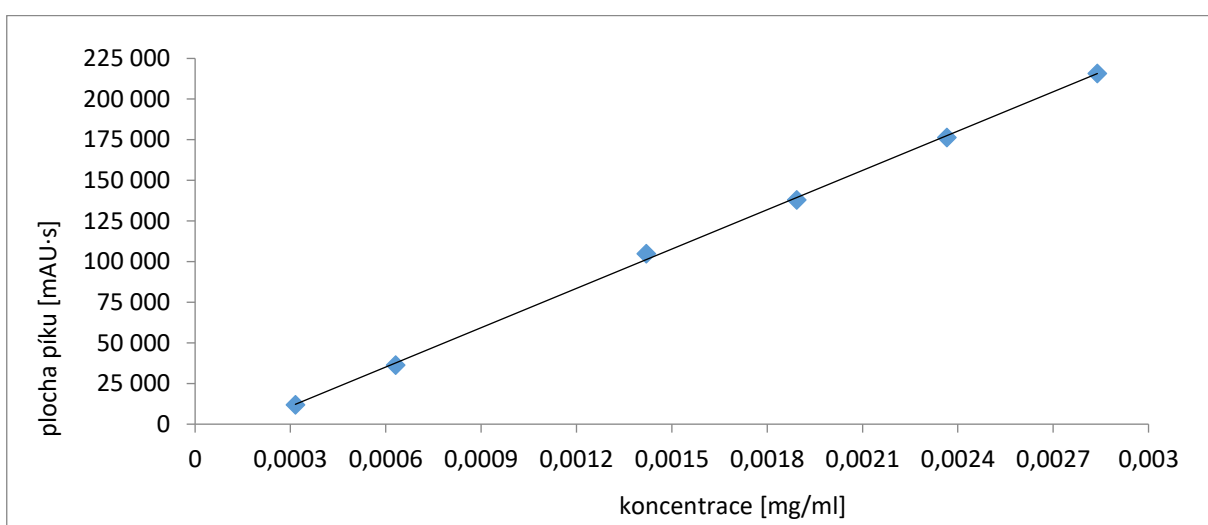
Obrázek 41- Kalibrační závislost pro kohumulon po extrakci SA-SBSE-PDMS



Obrázek 42- Kalibrační závislost pro adhumulon + humulon po extrakci SA-SBSE-PDMS



Obrázek 43- Kalibrační závislost pro kolupulon po extrakci SA-SBSE-PDMS



Obrázek 44- Kalibrační závislost pro adlupulon + lupulon po extrakci SA-SBSE-PDMS

Tabulka 16- Rovnice regrese s koeficientem determinace jednotlivých kalibračních závislostí po extrakci SA-SBSE-PDMS

Hořké kyseliny	Rovnice regrese	R ²
Kohumulon	$y = 3,71 \cdot 10^8 x + 35078$	0,9979
Adhumulon + humulon	$y = 2,74 \cdot 10^8 x + 81862$	0,9994
Kolupulon	$y = 9,17 \cdot 10^7 x - 17105$	0,9994
Adlupulon + lupulon	$y = 8,06 \cdot 10^7 x - 13220$	0,9994

Ze získané rovnice kalibrační přímky bez extrakce byly stanoveny limity detekce a kvantifikace přístroje. Vypočítány byly pomocí šumu, který byl stanoven jako směrodatná odchylka úseku. Limit detekce odpovídá trojnásobku šumu a limit kvantifikace desetinásobku šumu. Stejným způsobem byly stanoveny hodnoty těchto limitů pro extrakci SBSE-PDMS, SBSE-EG a SA-SBSE-PDMS. Všechny hodnoty limitů detekce a kvantifikace jsou shrnuty v Tabulce 17. Z porovnání těchto limitů je patrné, že při extrakci dochází k zakoncentrování hořkých kyselin. Pro zjištění vhodného způsobu extrakce těchto kyselin byly porovnány limity kvantifikace. Extrakce metodou SA-SBSE-PDMS byla zvolena jako nejvhodnější pro proměření reálných vzorků pív.

Tabulka 17- Hodnoty limitů detekce a kvantifikace

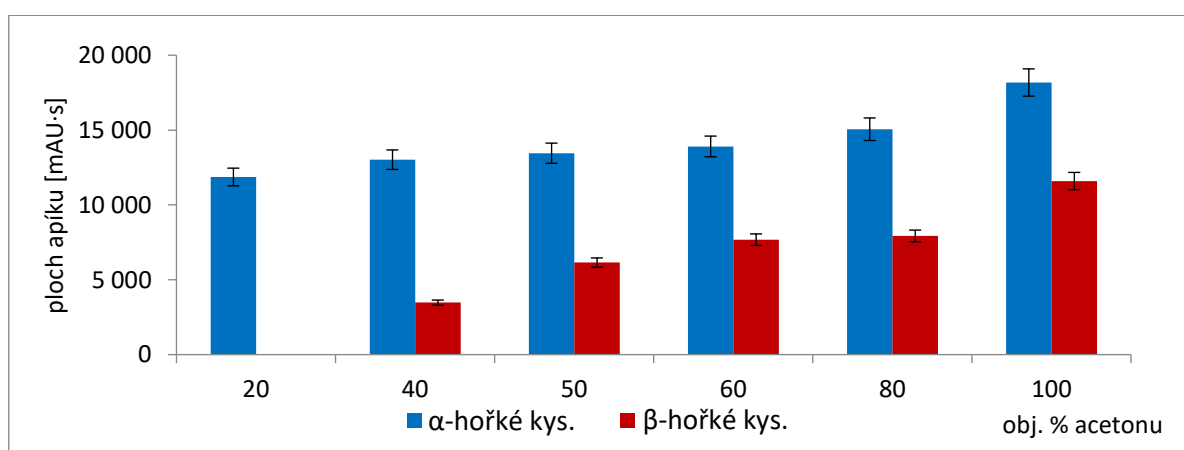
Hořké kyseliny	Limity přístroje		Limity metody SBSE-PDMS		Limity metody SBSE-EG		Limity metody SA-SBSE-PDMS	
	LOD [μg/ml]	LOQ [μg/ml]	LOD [μg/ml]	LOQ [μg/ml]	LOD [μg/ml]	LOQ [μg/ml]	LOD [μg/ml]	LOQ [μg/ml]
Kohumulon	19,58	47,31	0,21	3,08	0,62	1,39	0,07	0,44
Adhumulon + humulon	28,85	70,12	0,81	9,23	1,78	3,49	0,11	0,33
Kolupulon	23,22	48,67	0,64	4,13	0,84	1,40	0,27	0,46
Adlupulon + lupulon	16,63	39,11	0,85	3,50	0,66	1,07	0,23	0,38

3.2 Optimalizace metod

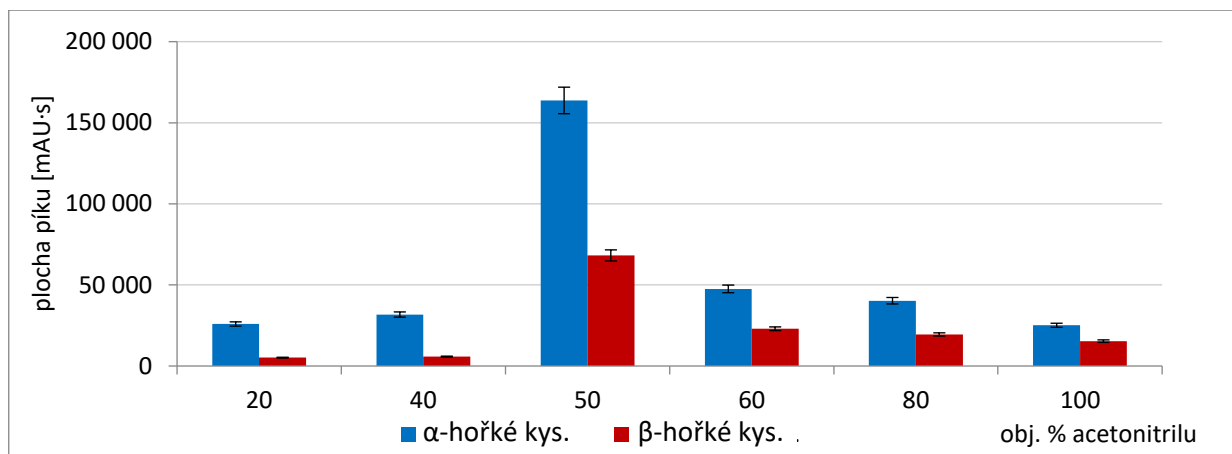
3.2.1 Výběr desorpčního rozpouštědla po extrakci na míchadélku s vrstvou polydimethylsiloxanu

Pro desorpci hořkých kyselin z míchadélka byla testována 4 rozpouštědla, a to používaná mobilní fáze (90% methanol), 96% ethanol, 50% aceton a 50% acetonitril. Byla testována i desorpce vodou, a to z důvodu použití vody při omytí míchadélka po extrakci. Desorpce vodou měla nulovou hodnotu, tudíž nedocházelo ke ztrátám extraktu při omytí míchací tyčinky. Hořké kyseliny byly extrahovány míchací tyčinkou s PDMS vrstvou z 50 ml standardního roztoku ICE-3 při 2000 rpm po dobu 30 minut, následně bylo míchadélko omyto, osušeno a vloženo do 150 μ l zvoleného desorpčního rozpouštědla. Desorpce probíhala po dobu 15 minut v ultrazvuku a následně byly extrakty proměřeny metodou HPLC-DAD. U prvních dvou zvolených rozpouštědel (MF a ethanol) nebyly detekovány žádné píky, proto byla tato rozpouštědla vyhodnocena jako nevhodná.

U desorpce acetonem a acetonitrilem byly detekovány píky, proto byly provedeny další experimenty, kdy se měnil poměr aceton/voda (Obrázek 45) nebo acetonitril/voda (Obrázek 46). Každý bod byl extrahován 2 \times a proměřen 3 \times . V grafech jsou použity součty α - a β -hořkých kyselin pro lepší porovnání účinnosti desorpce. Bylo vyhodnoceno, že desorpce 50% acetonitrilem je cca 10 \times účinnější pro α -hořké kyseliny a asi 5 \times účinnější pro β -hořké kyseliny než desorpce acetonem.

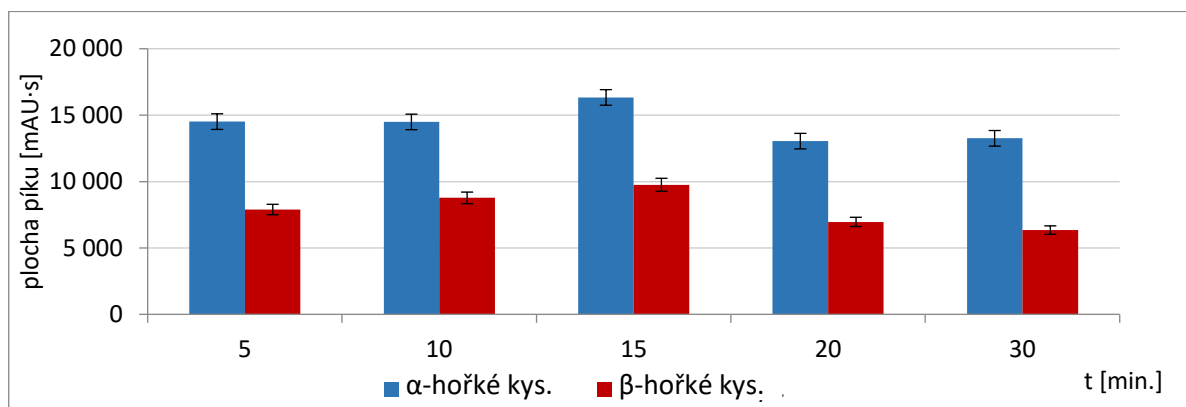


Obrázek 45- Porovnání desorpce ve směsi aceton/voda o různých obj. % ($n = 6$)



Obrázek 46- Porovnání desorpce ve směsi acetonitril/voda o různých obj. % ($n = 6$)

Následně byla optimalizována doba desorpce. Extrakce z 50 ml standardního roztoku ICE-3 probíhala při 2000 rpm po dobu 30 minut, po omytí a osušení míchadélka bylo desorbováno v 1500 μ l 50% acetonitrilu v ultrazvukové lázni po dobu 5 až 30 minut (Obrázek 47), kdy každý bod byl extrahován 2 \times a proměřen 3 \times . Nejlepší doba desorpce byla stanovena na 15 minut.



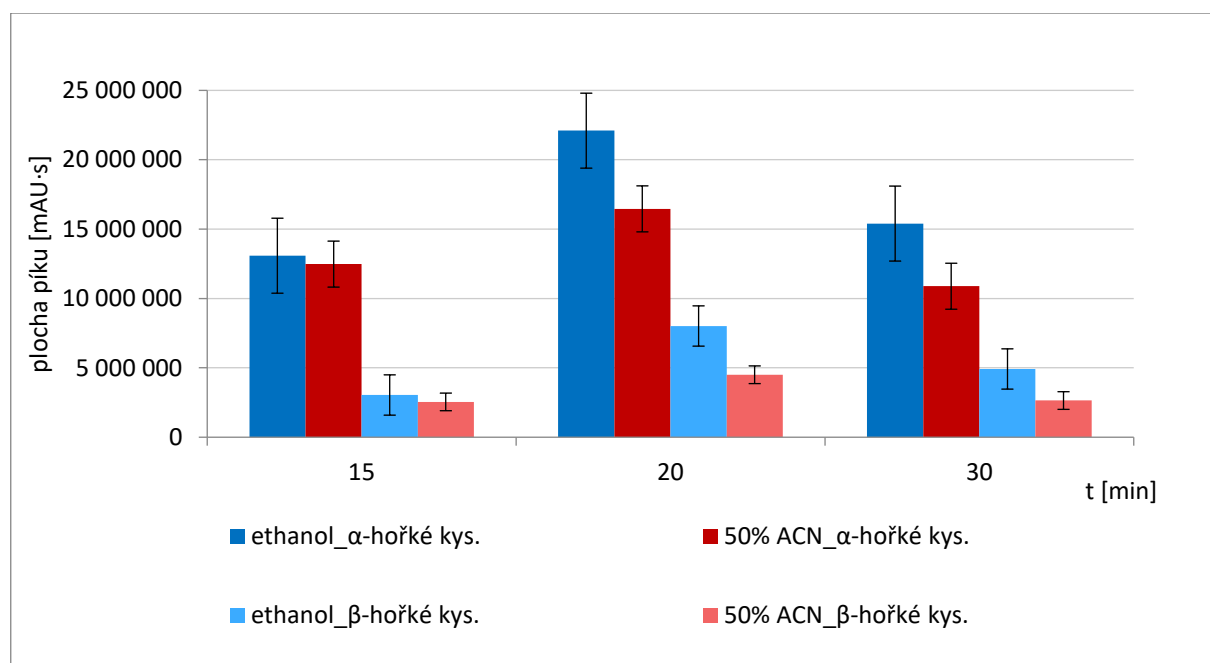
Obrázek 47- Vliv doby desorpce ($n = 6$)

3.2.2 Výběr desorpčního rozpouštědla po extrakci na míchadélku s vrstvou ethylenglykolu

Pro desorpci hořkých kyselin z tohoto typu míchadélka byla vybrána 3 rozpouštědla, a to 96% ethanol, 50% aceton a 50% acetonitril. Byla testována i desorpce vodou z SBSE-EG míchadélka, a to z důvodu použití vody při omytí míchadla po extrakci. Desorpce vodou měla nulovou hodnotu, tudíž nedocházelo ke ztrátám extraktu při omytí míchadélka tyčinky. Hořké kyseliny byly extrahovány z 50 ml standardního roztoku ICE-3 pomocí míchací tyčinky s EG povrchem při 2000 rpm po dobu 30 minut, následně bylo míchadélko omyto, osušeno a vloženo

do 150 µl zvoleného desorpčního rozpouštědla. Desorpce probíhala po dobu 15 minut v ultrazvukové lázni a následně byly extrakty proměřeny metodou HPLC-DAD. U desorpce acetonem byly detekovány pouze malé píky, proto bylo toto rozpouštědlo vyhodnoceno jako nevhodné.

U desorpce 96% ethanolem a 50% acetonitrilem byly detekovány píky, proto byly provedeny další experimenty, kdy se měnil čas desorpce (Obrázek 48). Každý bod byl extrahován 2× a proměřen 3×. Jako nejvhodnější postup desorpce z SBSE-EG míchadélka byla zvolena desorpce 1500 µl 96% ethanolem po dobu 20 minut v ultrazvukové lázni.



Obrázek 48- Závislost účinnosti desorpce na čase a typu rozpouštědla (n = 6)

3.2.3 Optimalizace podmínek extrakce

Pro výběr optimálních podmínek jednotlivých extrakcí bylo použito statistického programu STATISTICA Cz 12 (StatSoft, Praha, ČR), ve kterém byl navrhován experiment pomocí ortogonálního centrálního kompozitního plánování. Pro optimalizaci byla zvolena koncentrace $4,57 \cdot 10^{-2}$ g/l standardního roztoku ICE-3 a následně reálný vzorek piva (Lobkowitz ležák premium). Podmínky pokusů jsou znázorněny v Příloze II, odezvové profily a 3D vhodnostní profily jsou v Příloze III.

Optimalizace byla provedena pro míchací tyčinku s PDMS povrchem na standardním roztoku a poté na reálném vzorku piva. U standardního roztoku byly vyhodnoceny optimální podmínky extrakce: 50 ml vzorku, maximální otáčky magnetické míchačky (2500 rpm) a doba

extrakce 1 hodina. Optimální podmínky pro extrakci reálného vzorku piva se lišily pouze v dávkovaném objemu vzorku, ten činil 40 ml. Tento rozdíl mohl způsobit vliv matrice piva a napěnění vzorku piva při extrakci (vysoké otáčky míchadla), přestože pivo bylo před extrakcí odpěněno.

Optimalizace extrakce pro míchací tyčinku s EG povrchem byla provedena na standardním roztoku ICE-3 a posléze na reálném vzorku piva. Optimální podmínky pro extrakci standardního roztoku byly: 50 ml vzorku, maximální otáčky magnetické míchačky (2500 rpm) a doba extrakce 1 hodina. Optimální podmínky pro extrakci reálného vzorku piva se lišily pouze v dávkovaném objemu vzorku, ten činil 45 ml. Tento rozdíl mohl způsobit vliv matrice piva a napěnění vzorku piva při extrakci (vysoké otáčky míchadélka), přestože pivo bylo před extrakcí odpěněno.

Optimalizace prokázala, že účinnější extrakce hořkých kyselin je míchadlem s EG povrchem než s míchadlem s PDMS povrchem. Jde však pouze o srovnání extrakce bez použití rozpouštědlem asistované extrakce, kdy sorpce hořkých kyselin na míchadlo bylo až dvojnásobně vyšší.

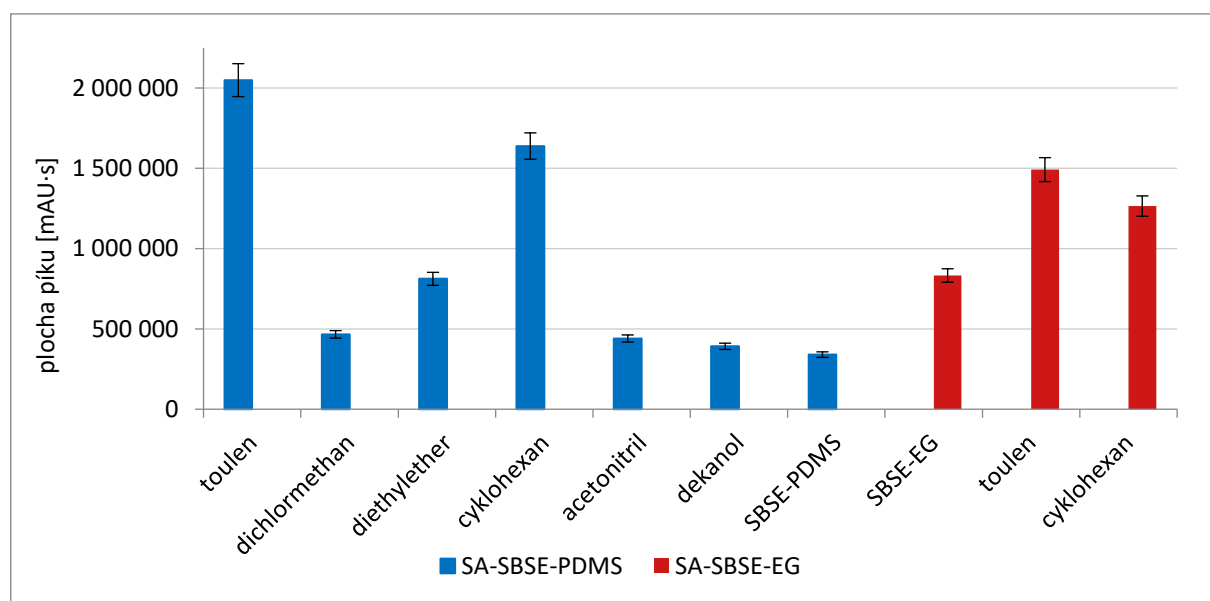
3.2.4 Optimalizace rozpouštědlem asistované extrakce na míchadélku

Rozpouštědlem asistovaná extrakce na míchadélku je metoda vhodná pro extrakci polárnějších látek na sorpční povrch, který je nepolárního charakteru. Pro některé polární látky se touto metodou zvýší sorpce až 100× ve srovnání s klasickou metodou SBSE. V dostupné literatuře se uvádí pouze experimenty s rozpouštědlem asistované extrakce na míchadélku s PDMS povrchem, v experimentu bylo však zkoušeno i míchadélko s EG povrchem.

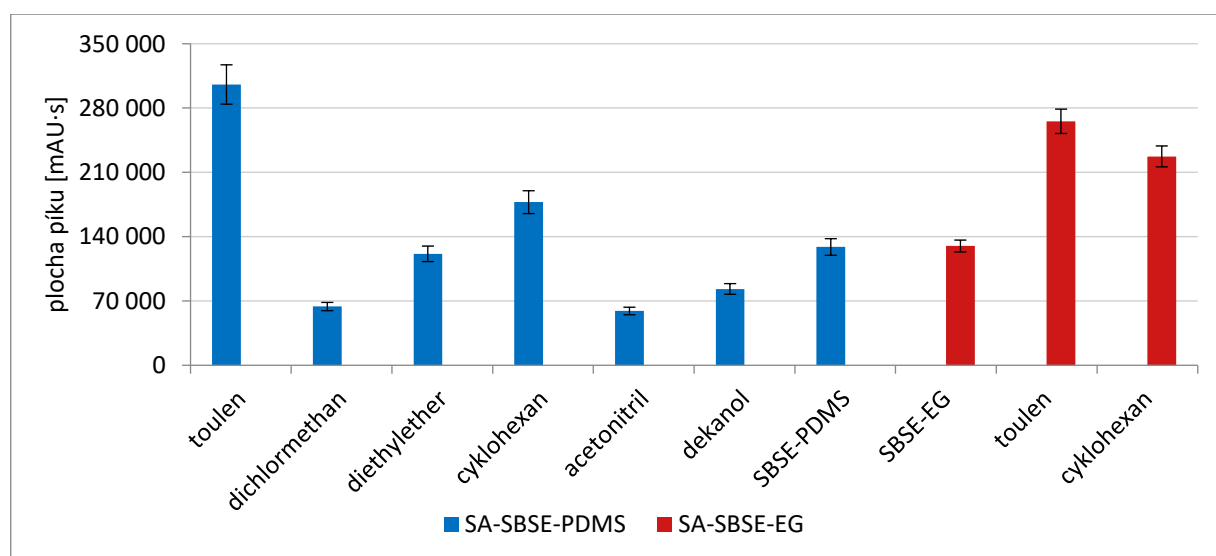
Byl zkoušen dvojí způsob sorpce rozpouštědla na míchadélko, a to sorpce při mechanickém míchání míchadélka v rozpouštědle a ponechání míchadélka uzavřeného v nádobce s rozpouštědlem v horizontální poloze. Doba sorpce činila 1 hodinu a sorpce druhým způsobem byla nepatrně účinnější.

Před extrakcí hořkých kyselin ze standardních roztoků byly míchací tyčinky sorbovány 6 různými rozpouštědly, dle postupu popsáném v kapitole 2.3.4. Po sorpci rozpouštědla byla míchadélka připravena pro extrakci a desorpci. Hořké kyseliny se extrahovaly pomocí míchací tyčinky z 50 ml standardního roztoku ICE-3 při 2500 rpm po dobu 1 hodiny. Následně bylo míchadélko omyto, osušeno a vloženo do 150 μ l zvoleného desorpčního rozpouštědla. Desorpce byla zvolena podle použitého povrchu míchací tyčinky, u SBSE-PDMS to byla desorpce 1500 μ l 50% acetonitrilu po dobu 15 minut v ultrazvuku. U SBSE-EG to byla

desorpce 1500 μ l 96% ethanolu po dobu 20 minut v ultrazvuku. Každý bod byl extrahován 2 \times a proměřen 3 \times . Po proměření metodou HPLC-DAD, byly porovnány plochy píků α -hořkých kyselin (Obrázek 49) a β -hořkých kyselin (Obrázek 50). Nejvyšší odezvu měla toluenem asistovaná extrakce na míchadélku s polydimethylsiloxanovou sorpční vrstvou. Tato metoda byla následně použita při stanovení hořkých kyselin ve vzorcích piva. Rozpouštědlem asistovaná extrakce na míchadélko s EG povrchem se neosvědčila, neboť sorpce rozpouštědla na ethylenglykol byla menší než u míchadélka s PDMS povrchem.



Obrázek 49- Porovnání SA-SBSE dle použitého rozpouštědla pro α -hořké kyseliny ($n = 6$)



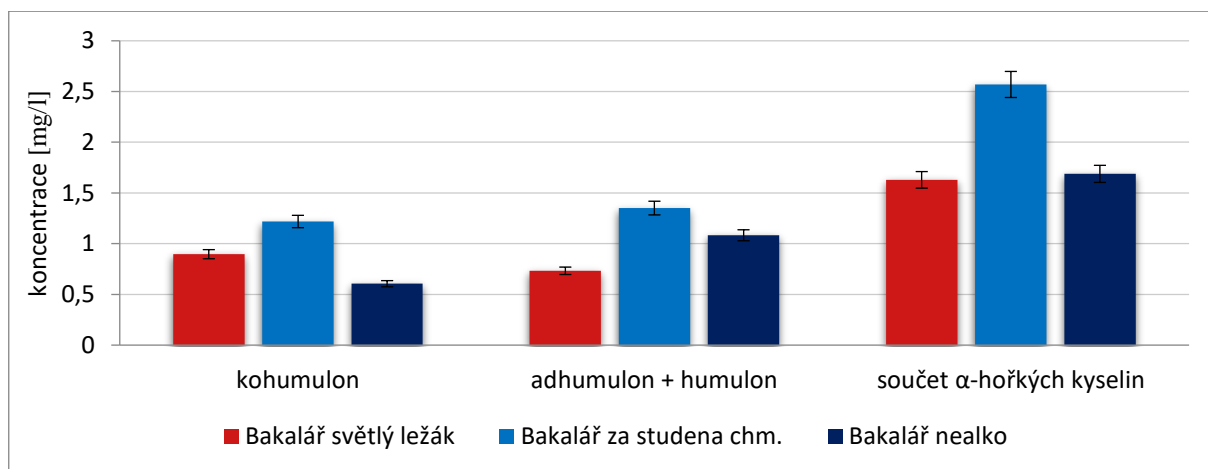
Obrázek 50- Porovnání SA-SBSE dle použitého rozpouštědla pro β -hořké kyseliny ($n = 6$)

3.3 Obsah hořkých kyselin ve vzorcích piva

Pro analýzu hořkých kyselin bylo vybráno 14 piv snadno dostupných v obchodních řetězcích. Piva byla vybírána tak, aby od stejné značky bylo vybráno pivo chmelené klasicky a pivo chmelené za studena. Vzorky piv byly vytřepány při 1000 otáčkách za minutu po dobu 60 minut pro odstranění oxidu uhličitého, který by ovlivnil extrakci. Poté byly všechny vzorky okyseleny na pH 2 pomocí kyseliny fosforečné pro lepší separaci hořkých kyselin. Do 50 ml takto upraveného piva se vložila míchací tyčinka s PDMS vrstvou impregnovanou toluenem (SA-SBSE-PDMS). Extrakce probíhala při maximálních otáčkách magnetické míchačky (2500 rpm) po dobu 1 hodiny. Po skončení extrakce byla vyjmuta míchací tyčinka, ta byla omyta destilovanou vodou a osušena. Poté byla vložena do 1500 μ l 50% acetonitrilu a extrakt byl desorbován 15 minut v ultrazvukové lázni. Po vyjmutí míchadélka byl vzorek připraven na analýzu pomocí HPLC metodou pro hořké kyseliny. Každý vzorek piva byl extrahován 3 \times a každý extrakt byl minimálně 2 \times proměřen. Získané hodnoty byly zprůměrovány a vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky pro metodu SA-SBSE-PDMS.

Druhým způsobem kvantifikace byl zvolen standardní přídavek, kdy do 50 ml upraveného piva k extrakci bylo přidáno malé množství standardu ICE-3. Standardní přídavek byl zvolen z důvodu očekávaných přesnějších výsledků a z důvodu zohlednění vlivu matrice v průběhu extrakce. Ve vzorcích klasicky chmelených piv byl očekáván nižší obsah α -hořkých kyselin, které jsou při chmelovaru izomerovány na iso-hořké kyseliny na rozdíl od piva chmeleného za studena, ve kterém jsou α -hořké kyseliny zastoupeny ve vyšším množství z důvodu přímého přechodu α -hořkých kyselin z chmele do piva bez izomerace při vyšší teplotě. Pomocí zvolené extrakční metody byly v extraktu stanoveny pouze α -hořké kyseliny, zatímco β -hořké kyseliny nebyly ve vzorcích detekovány. Vzorové chromatogramy z měření všech reálných vzorků piv jsou uvedeny v Příloze I (Obrázek I.5 až Obrázek I.18).

Byly zakoupeny 3 druhy piv od značky Bakalář, a to Bakalář světlý ležák (chmelený klasickým způsobem), Bakalář světlý ležák nealko za studena chmelený a Bakalář světlý ležák za studena chmelený. Porovnání těchto tří piv z hlediska obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku je znázorněno na Obrázku 51. Z obrázku vyplývá, že nejvíce α -hořkých kyselin obsahuje pivo Bakalář světlý ležák za studena chmelený, ten měl nejvyšší hodnoty jak kohumulonu, tak i směsi adhumulonů a humulonem. Pivo Bakalář světlý ležák (klasicky chmelený) měl druhou nejvyšší hodnotu kohumulonu a nejnižší hodnotu směsi adhumulonů a humulonů. U nealkoholického piva Bakalář je vyšší zastoupení směsi (adh. + hum.), avšak nejnižší obsah kohumulonu ze všech piv značky Bakalář. Jelikož poměr kohumulonu a směsi (adh. + hum.) u piva Bakalář nealko za studena chmelený je jiný, lze předpokládat, že byl použit jiný druh chmele nebo chmelení nealkoholického piva mělo jiný průběh. Chmelení za studena mohlo být ovlivněno způsobem dealkoholizace s následnou změnou složení dealkoholizovaného piva nebo způsobem výroby a zajištění nízkého obsahu alkoholu v tomto pivu. Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Bakalář stanovené pomocí kalibrační přímky a pomocí standardního přídatku jsou uvedeny v Tabulce 18.

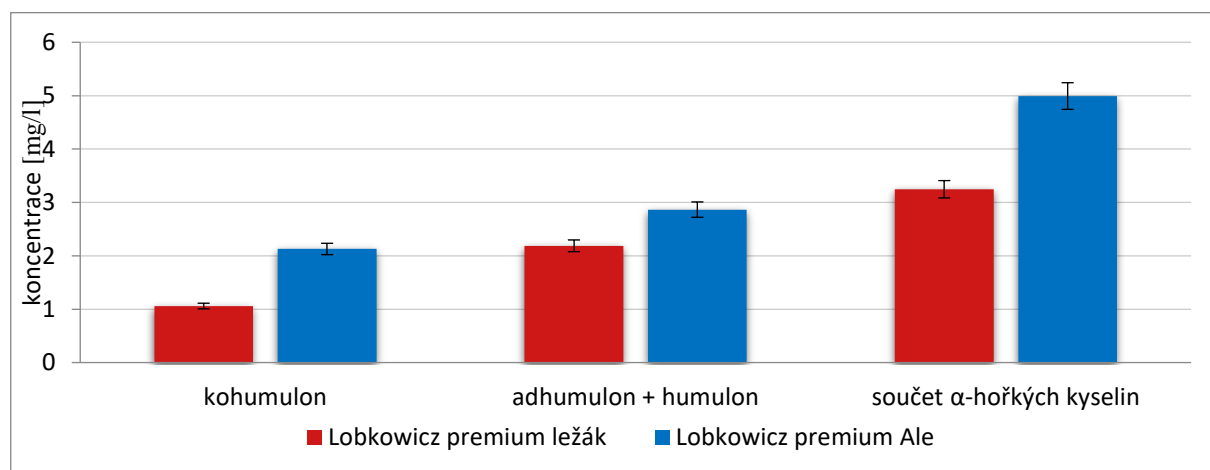


Obrázek 51- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Bakalář ($n = 6$)

Tabulka 18- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Bakalář ($n = 6$)

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Bakalář sv. ležák	0,647 ± 0,104	0,635 ± 0,073	0,896 ± 0,082	0,733 ± 0,050
Bakalář za studena chmelený	1,099 ± 0,114	1,283 ± 0,256	1,219 ± 0,039	1,351 ± 0,111
Bakalář nealko za studena chmelený	0,594 ± 0,108	1,180 ± 0,174	0,605 ± 0,070	1,083 ± 0,072

Byla zakoupena 2 piva značky Lobkowitz, a to Lobkowitz premium ležák a Lobkowitz premium ALE (chmelený za studena). Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku je znázorněno na Obrázku 52 a v Tabulce 19 jsou uvedeny koncentrace kohumulonu a směsi adhumulonů a humulonů. Z obrázku vyplývá, že obsah α -hořkých kyselin je vyšší u za studena chmeleného piva Lobkowitz premium ALE, lze tedy pozorovat rozdíl mezi pivem klasicky chmeleným a pivem chmeleným za studena.

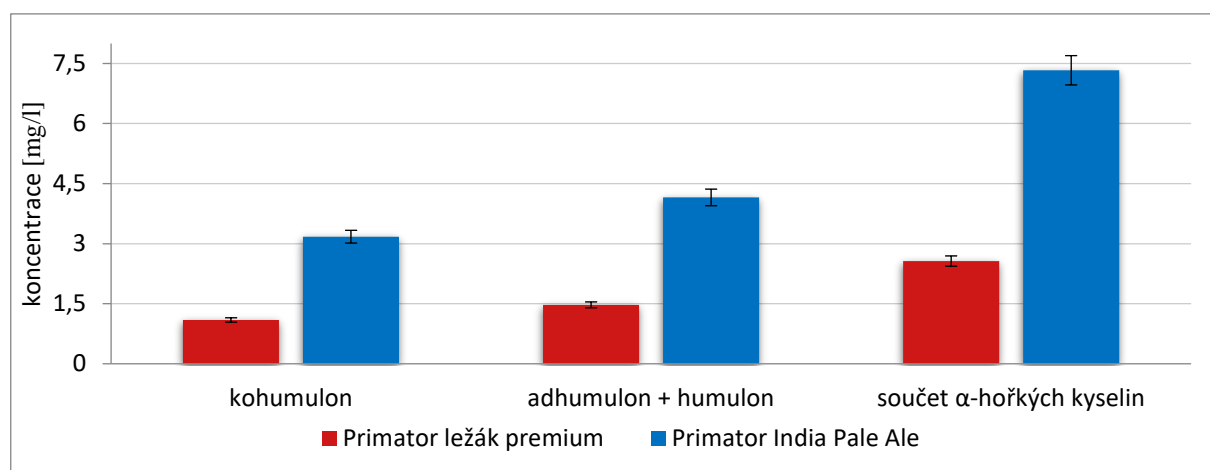


Obrázek 52- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Lobkowitz ($n = 6$)

Tabulka 19- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Lobkowitz ($n = 6$)

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Lobkowitz premium ležák	1,063 ± 0,088	2,491 ± 0,243	1,059 ± 0,045	2,187 ± 0,053
Lobkowitz premium ALE	2,341 ± 0,210	2,907 ± 0,323	2,128 ± 0,038	2,865 ± 0,110

Byla zakoupena 2 piva značky Primátor, a to Primátor premium a Primátor India Pale Ale (chmelený za studena). Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku je znázorněno na Obrázku 53 a v Tabulce 20 jsou uvedeny koncentrace stanovených α -hořkých kyselin. U piv značky Primátor je největší rozdíl v obsahu α -hořkých kyselin mezi pivem chmeleným klasickým způsobem a pivem chmeleným za studena. Obsah kohumulonu a směsi adhumulonů a humulonů je v pivu za studena chmeleném více jak dvojnásobné ve srovnání s pivem chmeleným klasickým způsobem.

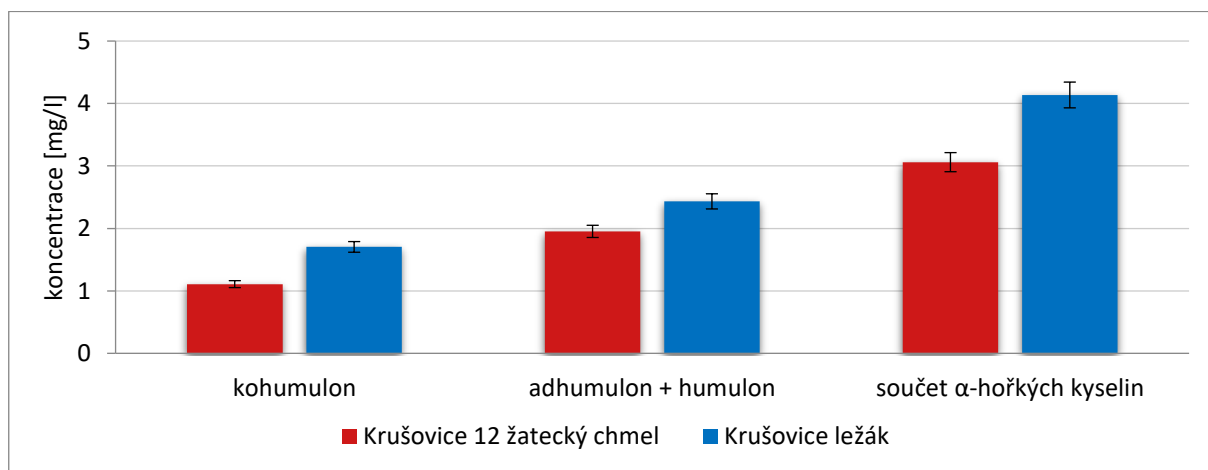


Obrázek 53- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Primátor ($n = 6$)

Tabulka 20- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Primátor ($n = 6$)

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Primator premium ležák	1,200 ± 0,019	1,807 ± 0,017	1,094 ± 0,038	1,471 ± 0,064
Primator India Pale Ale	3,573 ± 0,090	4,388 ± 0,193	3,175 ± 0,018	4,155 ± 0,057

Byla zakoupena 2 piva Krušovice, a to Krušovice 12° ze žateckého chmele a Krušovice ležák za studena chmelený. Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku je znázorněno na Obrázku 54 a v Tabulce 21 jsou uvedeny koncentrace kohumulonu a směsi adhumulonů a humulonů. Z obrázku lze pozorovat rozdíl mezi pivem klasicky chmeleným a pivem chmeleným za studena značky Krušovice.

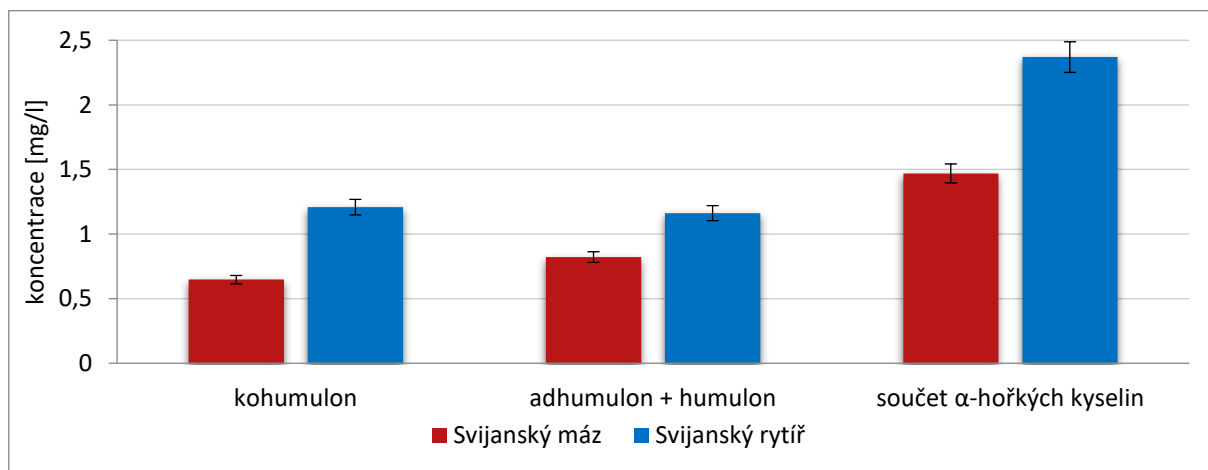


Obrázek 54- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Krušovice ($n = 6$)

Tabulka 21- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Krušovice ($n = 6$)

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Krušovice 12° ze žateckého chmele	$0,989 \pm 0,018$	$2,103 \pm 0,023$	$1,108 \pm 0,044$	$1,953 \pm 0,072$
Krušovice ležák za studena chmelený	$1,435 \pm 0,137$	$2,857 \pm 0,389$	$1,704 \pm 0,032$	$2,433 \pm 0,024$

Byla zakoupena 2 piva značky Svijany, a to Svijanský máz a Svijanský rytíř (chmelený za studena). Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídávku je znázorněno na Obrázku 55 a v Tabulce 22 jsou uvedeny koncentrace kohumulonu a směsi adhumulonů a humulonů. Na obrázku lze pozorovat rozdíl mezi klasicky chmeleným pivem a pivem chmeleným za studena v obsahu α -hořkých kyselin, přičemž nárůst koncentrace kohumulonu je ztelnější.

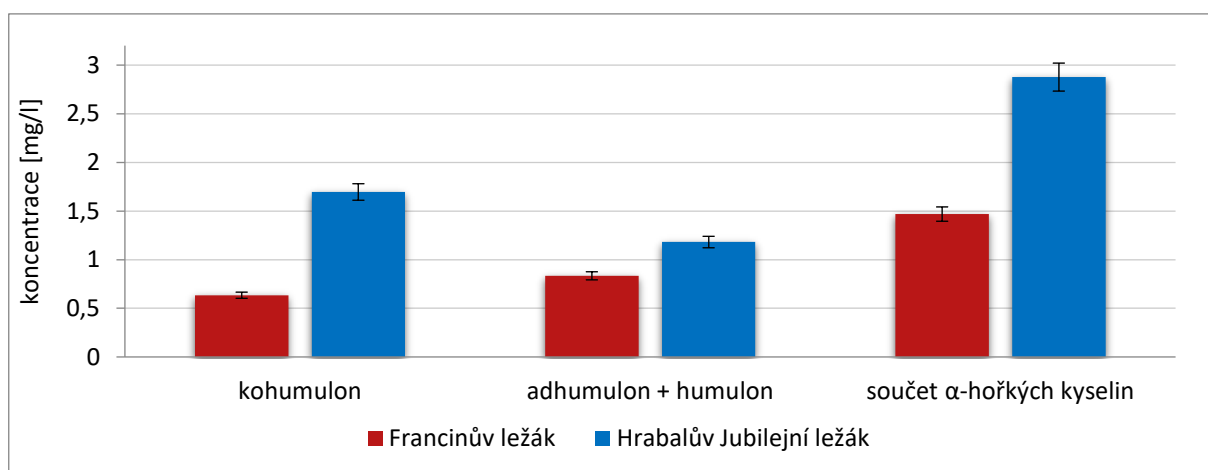


Obrázek 55- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Svijany ($n = 6$)

Tabulka 22- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Svijany ($n = 6$)

	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Svijanský máz	0,600 ± 0,034	0,868 ± 0,104	0,647 ± 0,064	0,822 ± 0,105
Svijanský rytíř	1,579 ± 0,085	1,359 ± 0,139	1,208 ± 0,083	1,093 ± 0,125

Byla zakoupena 2 piva značky Postřižinské, a to Francinův ležák a Jubilejní Hrabalův ležák (chmelený za studena). Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku je znázorněno na Obrázku 56 a v Tabulce 23 jsou uvedeny koncentrace kohumulonu a směsi adhumulonů a humulonů. Obsah α -hořkých kyselin byl u piva Francinův ležák nejnižší ze všech 14 analyzovaných piv. U piv značky Postřižinské lze pozorovat rozdíl mezi pivem klasicky chmeleným a pivem chmeleným za studena. Při chmelení za studena se zejména zvýšil obsah kohumulonu.



Obrázek 56- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin v pivech značky Postřižinské ($n = 6$)

Tabulka 23- Obsah α -hořkých kyselin v pivech značky Postřižinské ($n = 6$)

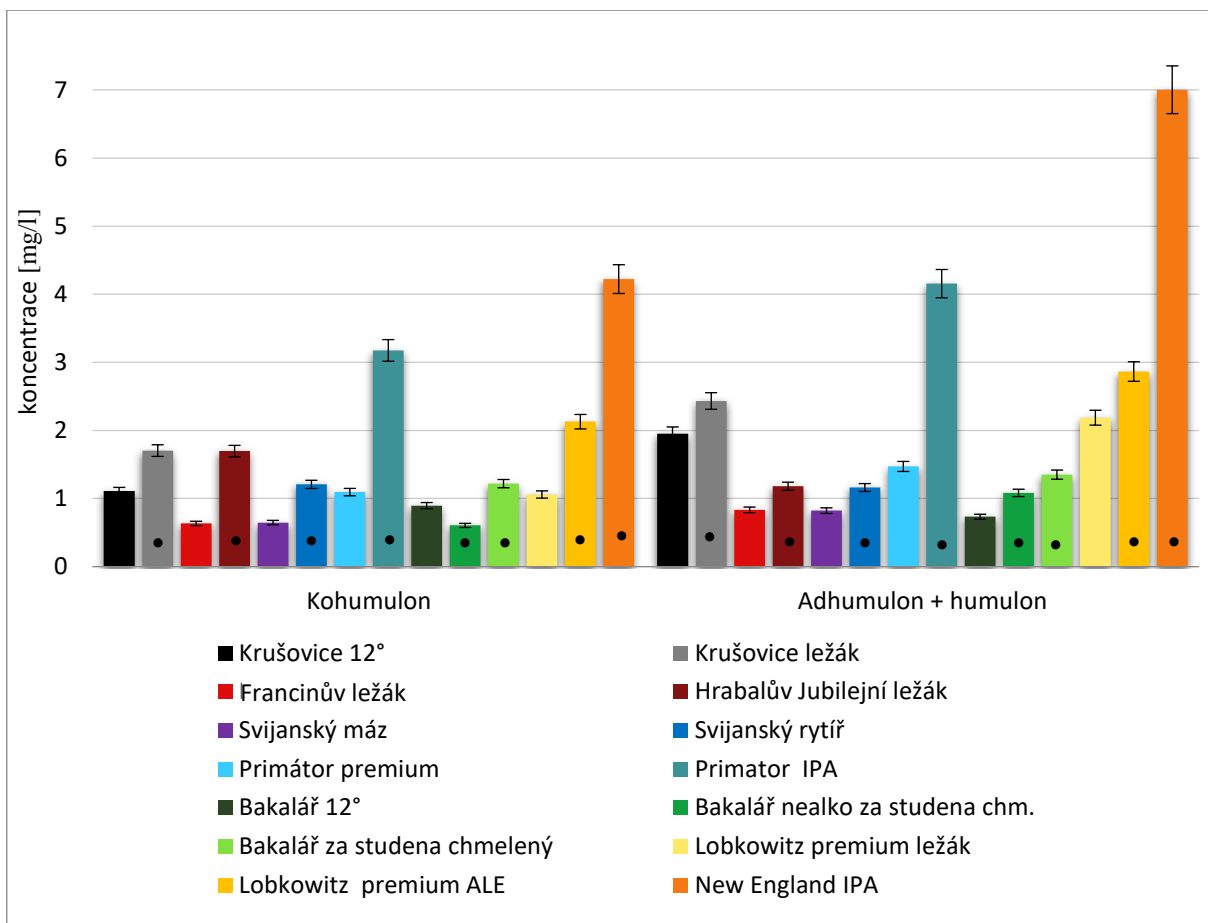
	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
Francinův ležák	0,482 ± 0,019	0,748 ± 0,193	0,635 ± 0,032	0,834 ± 0,121
Hrabalův Jubilejní ležák	1,498 ± 0,028	1,234 ± 0,076	1,696 ± 0,052	1,181 ± 0,153

Bylo zakoupeno pivo New England IPA pivovaru Mordýř. Jedná se o 15° světlé silné pivo svrchně kvašené, nefiltrované, nepasterizované s obsahem alkoholu 6,3 %. Toto pivo se vyznačuje intenzivním aroma získaným z amerických chmelů Citra a Amarillo. Jedná se o vynikajícího zástupce pivního stylu NEIPA, což je neoficiální název pivního stylu New England IPA. New England IPA bylo pivo s nejvyšší koncentrací α -hořkých kyselin, jejich obsah je uveden v Tabulce 24.

Tabulka 24- Obsah α -hořkých kyselin v pivu New England IPA (n = 6)

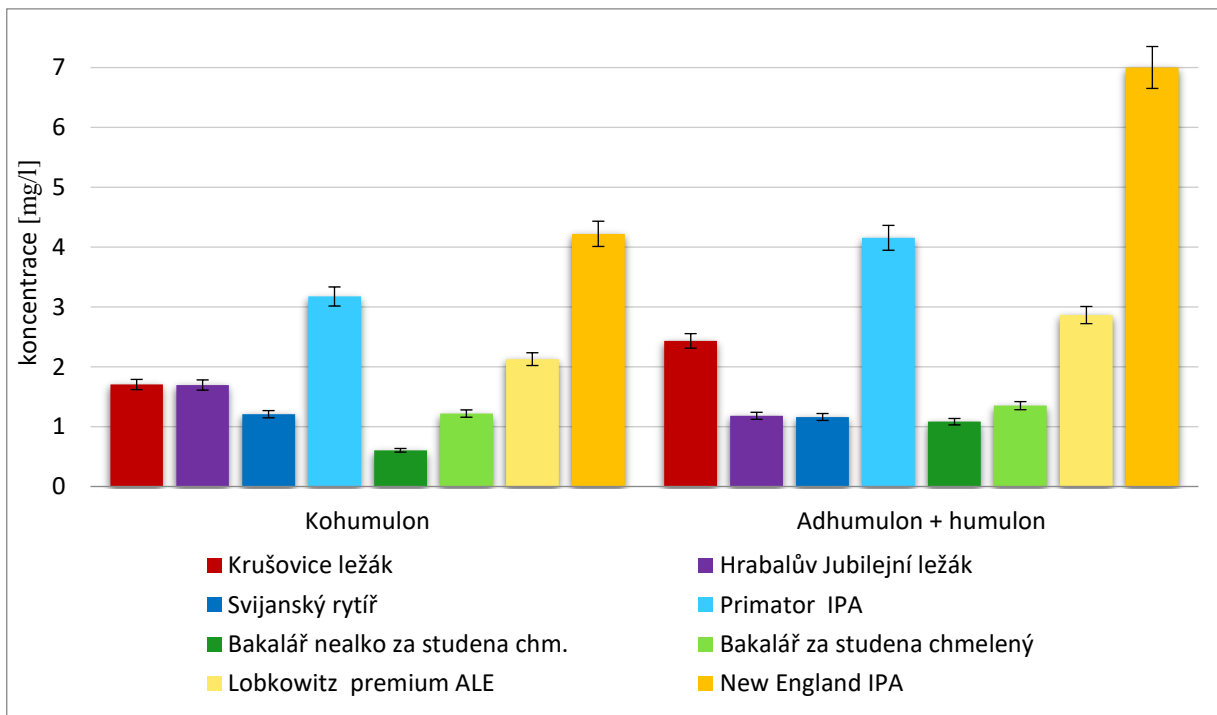
	Kalibrační přímka [mg/l]		Standardní přídavek [mg/l]	
	Kohumulon	Adhumulon + humulon	Kohumulon	Adhumulon + humulon
New England IPA	4,493 ± 0,186	6,726 ± 0,376	4,222 ± 0,114	7,002 ± 0,036

Porovnání všech zkoumaných piv mezi sebou je na Obrázku 57, piva chmelená za studena jsou porovnána na Obrázku 58 a piva chmelená klasickým způsobem na Obrázku 59. Největší obsah α -hořkých kyselin byl u piva New England IPA pivovaru Mordýř, z dostupných piv prodávaných v běžné obchodní síti má nejvyšší obsah α -hořkých kyselin pivo Primátor IPA, na druhé pozici je pivo Lobkowitz premium ALE. U těchto piv lze očekávat nejnižší hořkost z vybraných piv, neboť pouze malé množství hořkých kyselin bylo izomerováno. Naopak u piva s nejnižším obsahem α -hořkých kyselin (Postřižinské pivo Francinův ležák) lze očekávat vyšší hořkost piva z důvodu izomerace těchto kyselin. Největší rozdíl v obsahu α -hořkých kyselin u alkoholických piv za studena chmelených a klasicky chmelených jsou piva značky Primátor, Lobkowitz a Postřižinské pivo.

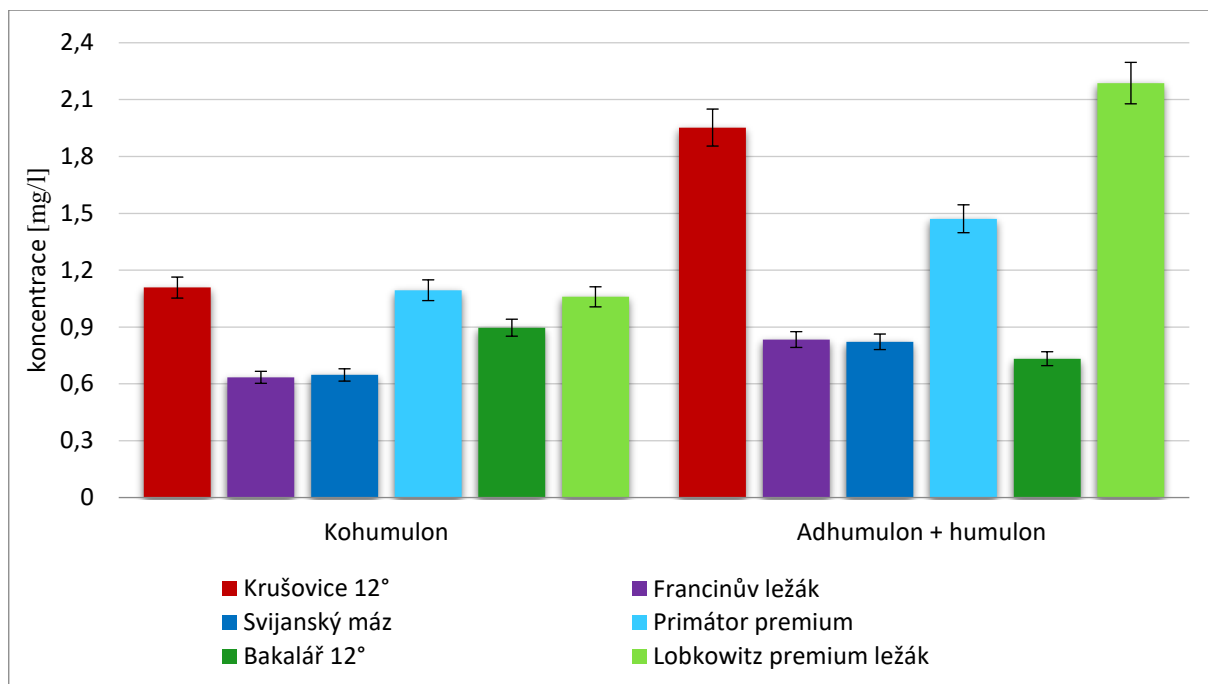


Obrázek 57- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku u všech 14 analyzovaných piv ($n = 6$)

• piva chmelená za studena



Obrázek 58- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přídatku u 8 druhů piv chmelených za studena ($n = 6$)



Obrázek 59- Porovnání obsahu α -hořkých kyselin stanovených metodou standardního přidavku u 6 druhů pív chmelených klasickým způsobem ($n = 6$)

Výsledné hodnoty α -hořkých kyselin byly porovnány s hodnotami stanovenými metodou UA-DLLME-SFO (ultrazvukem asistovaná disperzní kapalinová mikroextrakce bez disperzního rozpouštědla s využitím ztuhnutí organické kapky) v Diplomové práci M. Kadrmasové (2018). Koncentrace kohumulonu a směsi adhumulon + humulon ve vzorcích pív byly pro tyto metody srovnatelné. Limity detekce a stanovitelnosti metody UA-DLLME-SFO byly srovnatelné s limity detekce a stanovitelnosti metody SA-SBSE-PDMS. Výhodou mikroextrakční metody na míchací tyčince je malá spotřeba rozpouštědel, která jsou používána pouze při desorpci.

Metodou SA-SBSE-PDMS je tedy možné stanovit α -hořké kyseliny ve vzorcích piva a je možné rozlišit piva chmelená klasickým způsobem a piva chmelená za studena, a to dle porovnání rozdílů koncentrací těchto kyselin v pivech stejné značky. U nealkoholického piva značky Bakalář byl znakem chmelení za studena zejména nárůst koncentrace směsi adhumulon + humulon.

4 Závěr

Teoretická část diplomové práce byla zaměřena na literární rešerši, která popisuje zejména mikroextrakci tuhou fází, mikroextrakci na míchací tyčince, její modifikace a spojení se separačními technikami. Je popsán způsob technologie výroby piva, složky piva a jejich analýza. Je zmíněn i obecný princip kapalinové chromatografie.

Úkolem experimentální části diplomové práce bylo optimalizovat podmínky mikroextrakce na míchací tyčince pro stanovení obsahu α - a β -hořkých kyselin ve vzorcích piva a následné porovnání tohoto obsahu v pivech chmelených klasickým způsobem a v pivech chmelených za studena. Celkem bylo porovnáváno 14 vzorků piv (6 značek piv).

Testováno bylo nejvhodnější desorpční rozpouštědlo pro daný typ míchací tyčinky. Byly optimalizovány parametry extrakce pomocí ortogonálního centrálního kompozitního plánování, kdy byly zvoleny jako parametry pro jednotlivé pokusy objem extrahovaného vzorku, doba extrakce a rychlost otáček míchání vzorku. Z kalibračních křivek byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti, dle kterých byla vybrána nejvhodnější extrakční technika pro reálné vzorky piv. Jako nejvhodnější byla zvolena metoda SA-SBSE-PDMS, kdy míchací tyčinka byla impregnována toulenem a po extrakci byla tyčinka desorbována 50% acetonitrilem.

U všech reálných vzorků piv byly vyextrahovány a stanoveny pouze α -hořké kyseliny, β -hořké kyseliny byly pod mezí detekce. Obsahy α -hořkých kyselin byly vypočítány z kalibračních křivek kohumulonu a směsi adhumulonů a humulonů a metodou standardního přídatku, který poskytl přesnější výsledky, neboť byl zohledněn i vliv matrice daného piva.

Byla prokázána možnost stanovení α -hořkých kyselin v reálných vzorcích piv pomocí rozpouštědlem asistované mikroextrakce na míchací tyčince a možnost analýzy extraktu pomocí kapalinového chromatografu s detekcí diodovým polem. Bylo také prokázáno, že touto metodou lze rozlišit piva chmelená klasickým způsobem a piva chmelená za studena, a to porovnáním obsahu α -hořkých kyselin.

5 Použitá literatura

- [1] Ministerstvo zemědělství, Vyhláška č. 335/1997 Sb. ze dne 12. prosince 1997, kterou se provádí §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí. Praha: Sbírka zákonů České republiky, 1997, částka 111.
- [2] BASAŘOVÁ, G., HLAVÁČEK, I. *České pivo*. Pacov: NUGA (1998)
- [3] PROVOST, J., COLABROY, K., KELLY, B., WALLERT, M.: *The Science of Cooking: Understanding the Biology and Chemistry Behind Food and Cooking*. John Wiley & Sons, Hoboken (2016)
- [4] CHLÁDEK, L.: *Pivovarnictví*. Grada (2007)
- [5] CEJPEK, K.: *Vonné a chuťové složky sladů*. Chem. Listy 108, 426–435 (2014)
- [6] MIKYŠKA, A., SLABÝ, M., JURKOVÁ, M.: *Sazz Late - The Czech Hop Variety Recommended for Czech Beer*. Kvasny prum. 59 (2013)
- [7] TICHÁ, K.: *Chmelové produkty a možnosti jejich použití při výrobě piva a dalších nápojů*. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně, Brno (2017)
- [8] PREEDY, V.: *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press, London (2008)
- [9] *Hop bitter acids inhibit tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells in vitro*. Spandidos Publications [online]. 2012 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/or/28/4/1423>
- [10] ŠAVEL, J.: *Mikrobiologie v pivovarském průmyslu*. Praha: SNTL (1982)
- [11] DYR, J.: *Kvasná chemie a technologie I*. Praha: SNTL-Nakladatelství tech. literatury (1965)
- [12] *Brewing process technology: For the beer industry*. AEB: Improvement Through Biotechnology [online]. 2016 [cit. 2018-10-11]. Dostupné z: https://www.aeb-group.com/Media/Birra/BREWING_PROCESS_TECHNOLOGIES_DEP_EN_13101_18_BEER_South_Africa_Web.pdf
- [13] KONEČNÝ, F. V.: *Pivovarsko-sladařská pomocná příručka*. Praha: Grafia, dělnická tiskárna (1949)
- [14] KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S.: *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský (2000)

- [15] *Rmutování*. Blog domácího pivovárku Diversity [online] 2015 [cit. 2018-10-15].
Dostupné z: <http://diversity-pivo.blogspot.com/2015/12/proces-1-dil-rmutovani.html>
- [16] *Technology for fermentation and maturation process of beer production*. Czech Brewery System [online] 2012 [cit. 2018-10-11]. Dostupné z:
<https://www.czechminibreweries.com/production/technology-fermentation-maturation-process/>
- [17] MIŠKOVSKÝ, O.: *Pivo v láhvi*. 1. vyd. Praha: Noviny Praha (1944)
- [18] MEZEROVÁ, M.: *Jak poznáme kvalitu?: PIVO*. Publikace České Technologické Platformy Pro Potraviny (2017)
- [19] PREEDY, V.: *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press, London (2008)
- [20] PROVOST, J., COLABROY, K., KELLY, B., WALLERT, M.: *The Science of Cooking: Understanding the Biology and Chemistry Behind Food and Cooking*. John Wiley & Sons, Hoboken (2016)
- [21] BAMFORTH, C., RUSSELL, I., STEWART, G.: *Beer: A Quality Perspective*. 1st Edition. Academic Press, London (2008)
- [22] POWELL, A. D. G., BROWN, I. H.: *The Determination Of Beer Components By Gas-Liquid Chromatography*. Journal of the Institute of Brewing 72 (1966)
- [23] ASFAW, A., WIBETOE, G.: *Direct Analysis of Beer by ICP-AES: A Very Simple Method for the Determination of Cu, Mn and Fe*. Microchimica Acta 152, 61-68 (2005)
- [24] POHL, P.: *Determination and fractionation of metals in beer: A review*. Food Additives and Contaminants 25/6, 693-703 (2008)
- [25] NOGUEIRA, L. C., SILVA, F., FERREIRA, I., TRUGO, L. C.: *Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection*. Journal of Chromatography A 1065, 207-210 (2005)
- [26] DUARTE, I. F., GODEJOHANN, M., BRAUMANN, U., SPRAUL, M., GIL, A. M.: *Application of NMR Spectroscopy and LC-NMR/MS to the Identification of Carbohydrates in Beer*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 4847-4752 (2003)
- [27] JELEN, H. H., SPRAUL, M., GIL, A. M., KAMIŃSKI E., WASOWICZ, E.: *Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 1469-1473 (1998)

- [28] KARABÍN, M., BRÁNYIK, T., KRULIŠ, R., DVOŘÁKOVÁ, M., DOSTÁLEK, P.: *Využití chemicky modifikovaných hořkých látek v pivovarnictví*. Chem. Listy 103, 721-728 (2009)
- [29] VERZELE M., DE KEUKELEIRE, D.: *Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids*. Elsevier (2013)
- [30] POLSHIN, E., RUDNITSKAYA, A., KIRSANOV, D., LAMMERTYN, J.: *Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of beer*. Talanta (2009)
- [31] *Solid Phase Extraction*. AFFINISEP [online] [cit. 2018-10-17]. Dostupné z: <https://www.affinisep.com/technology/solid-phase-extraction/>
- [32] *Extrakční techniky*. Mendelova univerzita v Brně [online] 2017 [cit. 2018-10-17]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968
- [33] *Guide to Solid Phase extraction*. Bulletin 910 [online] 2016 [cit. 2018-10-17]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- [34] HENNION, M.-C.: *Solid-Phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A 856/1-2, 3-54 (1999)
- [35] WATSON, D. W., RAYNIE, D. E.: *Understanding and Improving Solid-Phase Extraction*. LCGC North America 32/12, 908-915 (2004)
- [36] PROCHÁZKOVÁ, D.: *Mikroextrakce tuhou fází a stanovení obsahu analytů*. Chem. Listy 96, 827-833 (2002)
- [37] FUSEK, M.: *Nový vstříkový ventil kombinující Solid Phase Microextraction (SPME) s HPLC*. Chem. Listy 67, 2530 (2008)
- [38] *SPME*. University of Waterloo [online] [cit. 2018-10-18]. Dostupné z: <https://uwaterloo.ca/pawliszyn-group/research/spme>
- [39] *SPME (Solid Phase Micro Extraction)*. Labicom [online] [cit. 2018-10-18]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/priprava-vzorku-prislusenstvi/spme>
- [40] CHMELKA, M.: *Stanovení těkavých organických látek metodou " head space - SPME" v reálných vzorcích povrchové a pitné vody*. Brno, 2008. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce RNDr. Josef Kupec.
- [41] *Vzorkování metodou SPME (Solid Phase Microextraction)*. Mendelova univerzita v Brně [online] [cit. 2018-10-17]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52969

- [42] *Mikroextrakce na pevné fázi (MEPS)*. Chromservis [online] [cit. 2018-10-22]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/i/micro-extraction-by-packed-sorbent-meps?lang=CZ>
- [43] MOEIN, M. M., SAID, R., BASSYOUNI, F., ABDEL-REHIM, M.: *Solid phase microextraction and related techniques for drugs in biological samples*. Journal of Analytical Methods in Chemistry (2014)
- [44] DAWES, P., DAWES, E., DIFEO, D., WYNNE, P.: *On-line and Of-line Application of Micro-SPE (MEPS)*. SGE Analytical Science. Austin (2007)
- [45] LICHTFOUSE, E., SCHWARZBAUER, J., DIDIER, R.: *Environmental Chemistry for a Sustainable World: Volume 2: Remediation of Air and Water Pollution*. Springer 189-193 (2012)
- [46] LAHOUTIFARD, N., DAWES, P., WYNNE, P.: *Micro Extraction Packed Sorbent (MEPS): Analysis of Food and Beverages*. SGE Analytical Science
- [47] SÝS, M.: *Mikroextrakční metody využívající tuhé sorbenty*. 2009. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Martin Adam, Ph.D.
- [48] BALTUSSEN, E., SANDRA, P., DAVID, F., CRAMERS, C.: *Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principle*. International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis 11, 737-747 (1999)
- [49] BICCHI, C., LIBERTO, E., CORDERO, C., SGORBINI, B., RUBIOLO, P.: *Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Headspace Sorptive Extraction (HSSE): An Overview*. LCGC North America 27/5, 376-390 (2009)
- [50] *Twister / Stir Bar Sorptive Extraction SBSE*. Gerstel [online] [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>
- [51] SOBOTKA, J.: *Aplikace sorpční extrakce na míchadélku (SBSE) pro monitorování alkylfosfátů a pižmových látek ve vodním prostředí*. 2015. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Ing. Branislav Vrana, Ph.D.
- [52] LICHTFOUSE, E., SCHWARZBAUER, J., DIDIER, R.: *Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Springer 177-189 (2012)
- [53] DAVID, F., SANDRA, P.: *Stir bar sorptive extraction for trace analysis*. Journal of Chromatography A 1152/1-2, 54-69 (2007)
- [54] OCHIAI, N., SASAMOTO, K., DAVID, F., SANDRA, P.: *Solvent-assisted stir bar sorptive extraction by using swollen polydimethylsiloxane for enhanced recovery of polar solutes in aqueous samples: Application to aroma compounds in beer and pesticides in wine*. Journal of Chromatography A 1455, 45-56 (2016)

- [55] OCHIAI, N., SASAMOTO, K., HOFFMANN, A., MACNAMARA, K.: *Solvent-assisted stir bar sorptive extraction by using swollen polydimethylsiloxane for enhanced recovery of polar solutes in aqueous samples: Application to aroma compounds in beer and pesticides in wine*. GERSTEL Application Note n. 198 (2018)
- [56] OCHIAI, N., SANDRA, P., MACNAMARA, K., DAVID, F.: “*Two decades of stir bar sorptive extraction: A retrospective and future outlook*”. TrAC Trends in Analytical Chemistry 112 (2018)
- [57] MASLAMANI, N., MANANDHAR, E., GEREMIA, D. K., LOGUE, B. K.: *ICE Concentration Linked with Extractive Stirrer (ICECLES)*. Analytica Chimica Acta 19, 41-48 (2016)
- [58] CÁRDENAS, S., LUCENA, R.: *Recent Advances in Extraction and Stirring Integrated Techniques*. Separations 4/1 (2017)
- [59] ALLUHAYB, A. H.: *The Analysis of Flavor Compounds in Green Tea Using Ice Concentration Linked with Extractive Stirrer (Icecles)*. 2017, Theses and Dissertations. South Dakota State University, Vedoucí práce Logue B. A.
- [60] BASAURI, O., NAVARRO, P., PRIETO, A., ZULOAGA, O.: *Stir Bar Sorptive Extraction and In-Tube Derivatization Thermal-Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Determination of Priority and Emerging Pollutants*. Kimika Analitikoia Saila.
- [61] NIE, Y., ALBINUS, T.: *Comparison of EG-Silicone-SBSE and Derivatization-PDMS-SBSE for the Analysis of Phenolic Compounds and Off-flavors in Water*. Gerstel (2012)
- [62] NAMIEŚNIK, J., ZABIEGAŁA, B., KOT-WASIK, A., PARTYKA M., WASIK, A.: *Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis: a review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 381/2, 279-301 (2005)
- [63] VÍTKOVÁ, L.: *Pasivní vzorkování polárních organických kontaminantů z vo.* 2011. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
- [64] *The Twister Sisters pick up the Flavors: Beverage Analysis*. Gerstel [online] [cit. 2018-10-31]. Dostupné z: http://www.gerstel.com/en/GSW15_Flavor_Analysis.htm
- [65] NIE, Y., ALBINUS, T.: *Comparison of EG-Silicone-SBSE and Derivatization-PDMS-SBSE for the Analysis of Phenolic Compounds and Off-flavors in Water*. Gerstel GmbH & Co: Global Analytical Solutions (2012)

- [66] *Efficient flavor profiling of beverages that contain involatile matrix*: See the big picture - and every little detail. Gerstel [online] [cit. 2018-10-31]. Dostupné z: <http://www.gerstel.com/en/GSW11-DHS-GCMS-Whiskey-analysis.htm>
- [67] PEREIRA, C., RODRIGUES, T., YARIWAKE, J.: *Quantification of Harman Alkaloids in Sour Passion Fruit Pulp and Seeds by a Novel Dual SBSE-LC/Flu (Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Chromatography with Fluorescence Detector) Method*. Journal of the Brazilian Chemical Society 25/8, 1472-1483 (2014)
- [68] *Reextracción con Twister TBE*. Grupo Biomaster [online]. [cit. 2018-10-31]. Dostupné z: <https://grupobiomaster.com/reextraccion-con-twister-tbe/>
- [69] *New SBSE Twisters Detect Hard-to-Analyze Flavors*. Gerstel [online]. [cit. 2018-11-19]. Dostupné z: <http://www.gerstelus.com/blog/entries/new-sbse-twisters-detect-hard-to-analyze-flavors>
- [70] OCHIAI, N., SASAMOTO, K., KISHIMOTO, T.: *Development of a Method for the Quantitation of Three Thiols in Beer, Hop, and Wort Samples by Stir Bar Sorptive Extraction with in Situ Derivatization and Thermal Desorption–Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63/30, 6698-6706 (2016)
- [71] HORÁK, T.: *Possibilities of utilization of modern sample preparation methods for gas chromatographic analyses in beverage and namely brewing analytics. Part III. – Solid-phase microextraction*. Kvasný Průmysl 56/11-12, 418-422 (2010)
- [72] HORÁK, T.: *Stir Bar Sorptive Extraction – New Approach for the Determination of Some Beer Flavours*. Kvasný Průmysl 54/4, 418-422 (2008)
- [73] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint
- [74] *HPLC Help Center*. IDEX [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.idex-hs.com/literature-tools/educational-materials/hplc-center>
- [75] POOLE, C. F.: *Liquid Chromatography: Applications*. Second Edition. Elsevier (2017)
- [76] HAUSER, B., POPP, P., BAUER, C., KLEINE-BENNE, E.: *Semi-Automated Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) in Combination with HPLC - Fluorescence Detection for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water*. Gerstel: Global Analytical Solution (2002)
- [77] *The LCGC Blog: Diode Array Detector Settings - Five Minutes to Change Your Chromatography Forever*. LC/GC: Solutions for Separation Scientists [online] 2014

[cit. 2018-11-21]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-diode-array-detector-settings-five-minutes-change-your-chromatography-forever>

[78] *Trusted Laboratory Solutions*. GMI [online] [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: <https://gmi-inc.com/agilent-1100-series-g1321a-fluorescence-detector-flid.html>

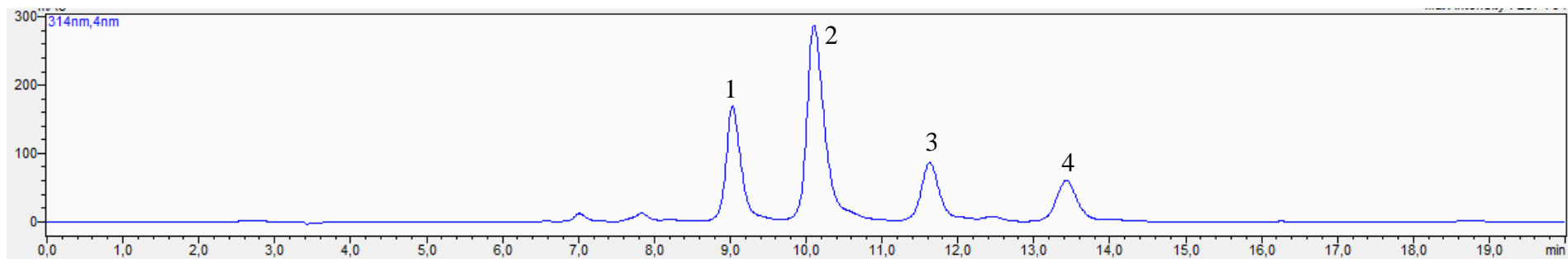
Přílohy

Příloha I: Vzorové chromatogramy separace hořkých kyselin

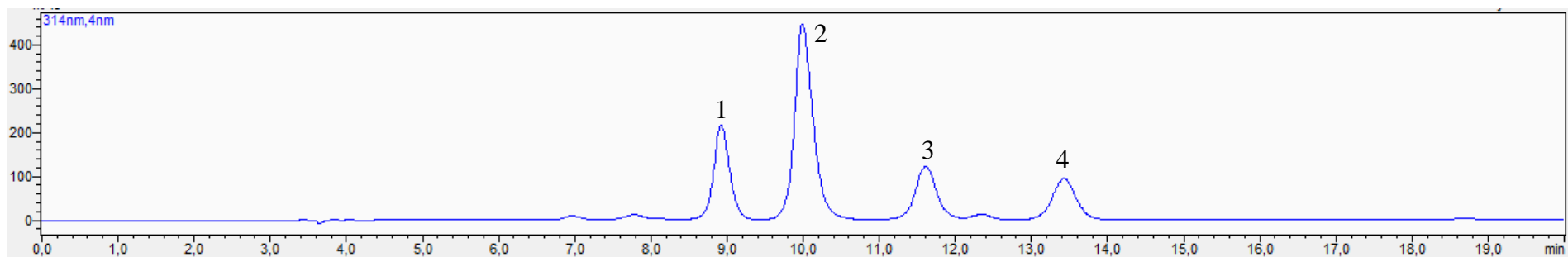
Příloha II: Vygenerované podmínky pokusů pro optimalizace extrakcí

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

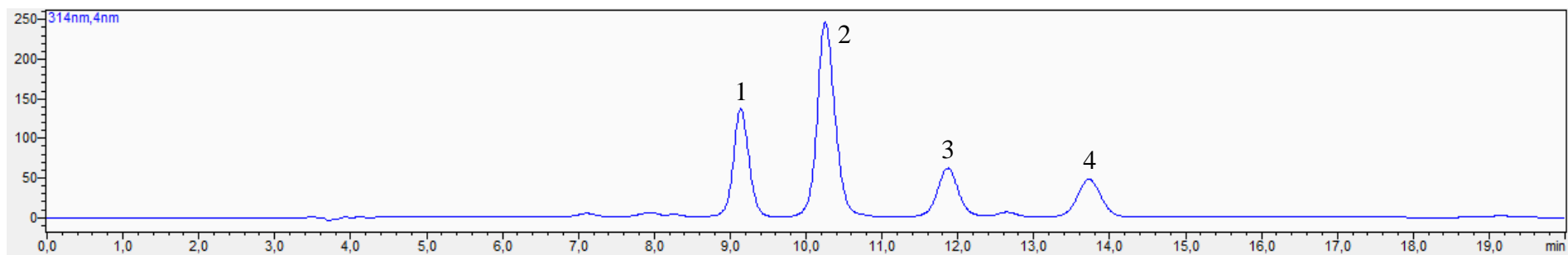
Příloha I: Vzorové chromatogramy měření hořkých kyselin



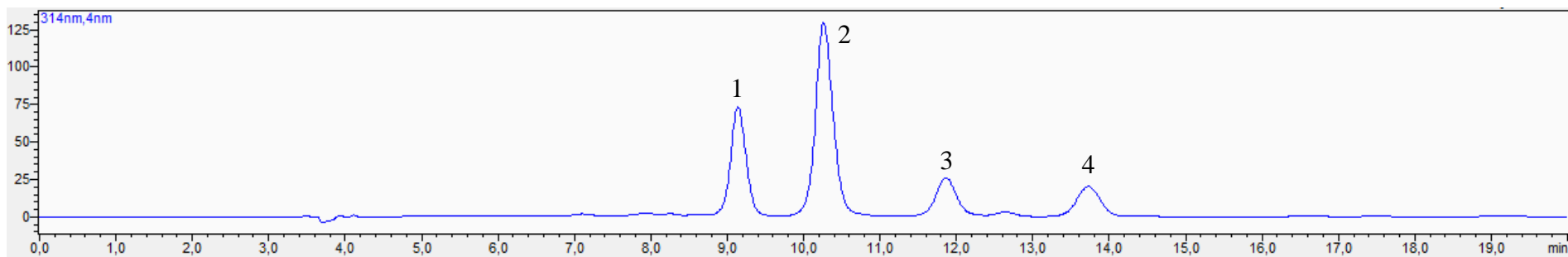
Obrázek I.1- Vzorový chromatogram z měření kalibrace bez extrakce
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon, 3- kolupulon, 4- adlupulon + lupulon)



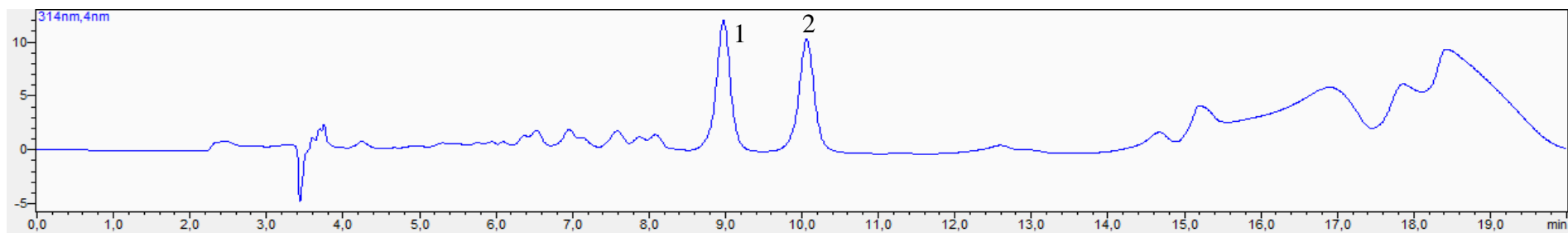
Obrázek I.2- Vzorový chromatogram z měření kalibrace SBSE-PDMS
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon, 3- kolupulon, 4- adlupulon + lupulon)



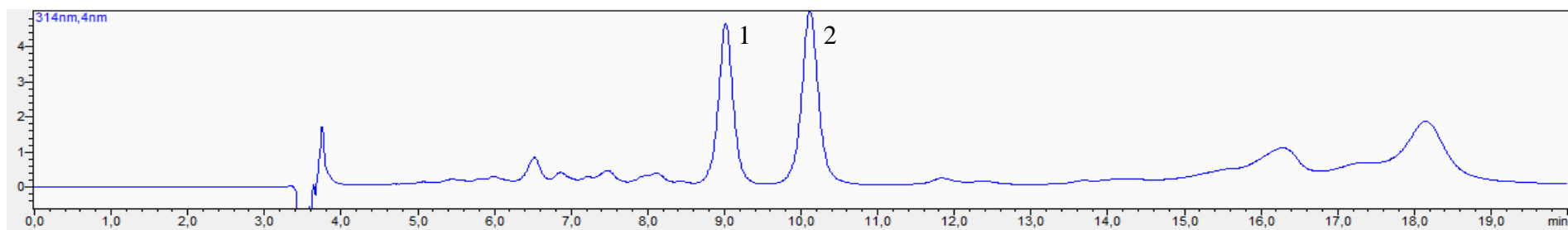
Obrázek I.3 - Vzorový chromatogram z měření kalibrace extrakce SBSE-EG
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon, 3- kolupulon, 4- adlupulon + lupulon)



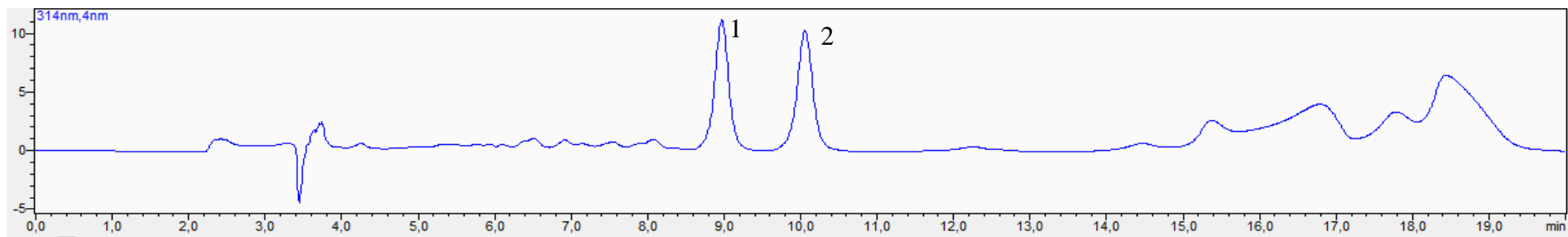
Obrázek I.4- Vzorový chromatogram z měření kalibrace extrakce SA-SBSE-PDMS
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon, 3- kolupulon, 4- adlupulon + lupulon)



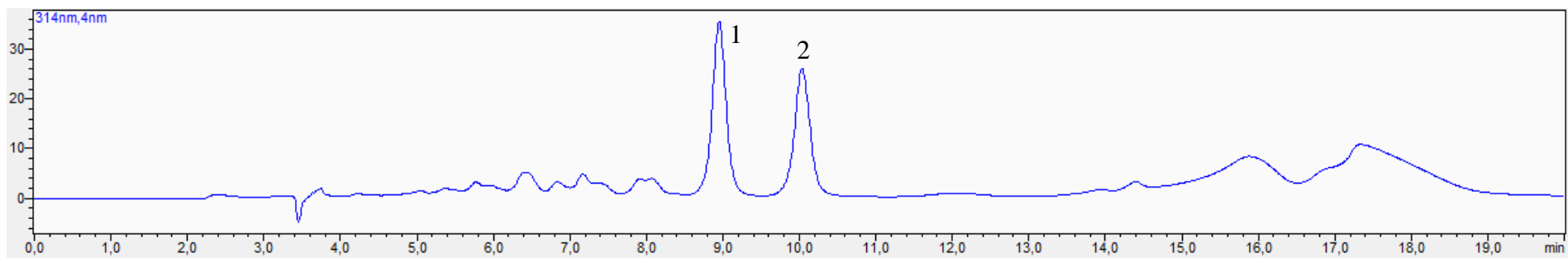
Obrázek I.5- Chromatogram z měření extrakce piva *Bakalář za studena chmelený*
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



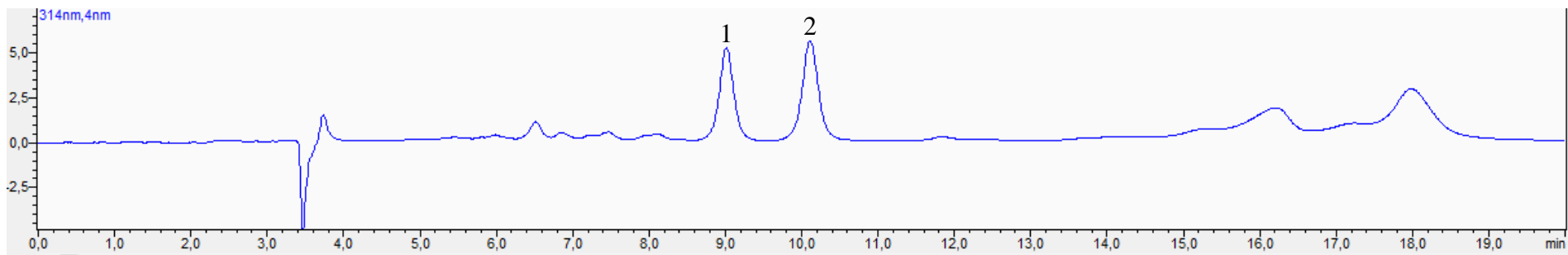
Obrázek I.6- Chromatogram z měření piva *Bakalář nealko za studena chmelený*
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



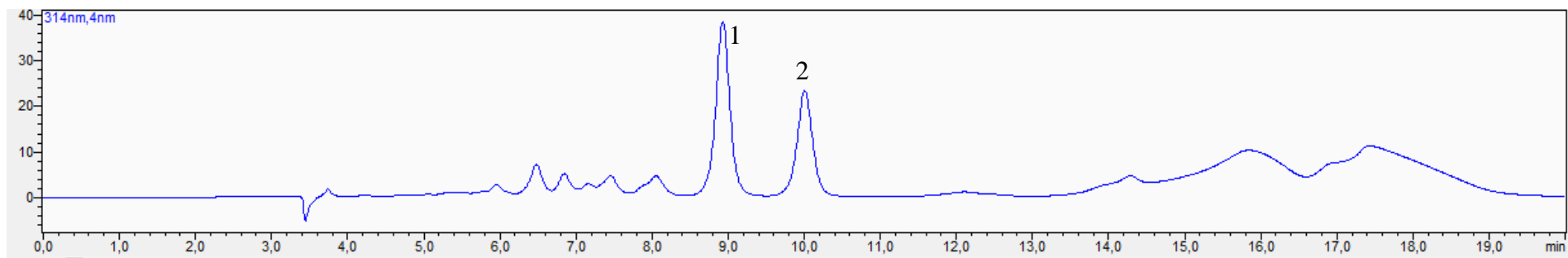
Obrázek I.7- Chromatogram z měření piva *Bakalář ležák*
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



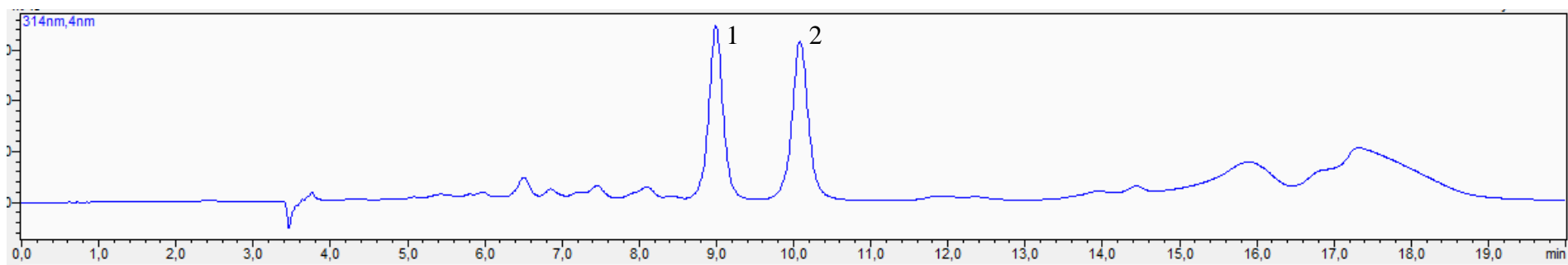
Obrázek I.8- Chromatogram měření piva Lobkowicz ALE
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



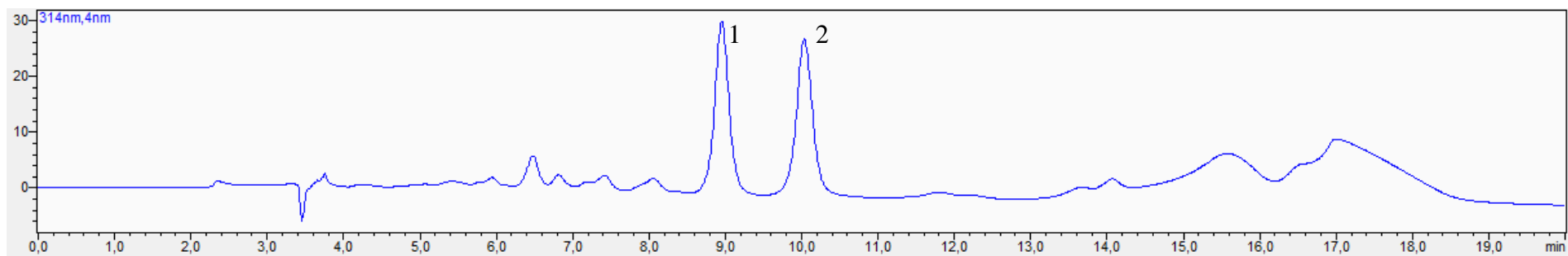
Obrázek I.9- Chromatogram měření piva Lobkowicz premium
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



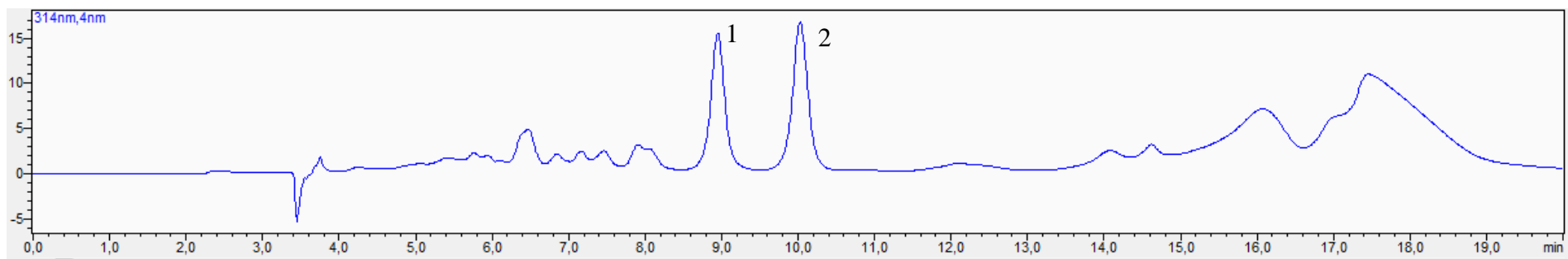
Obrázek I.10- Chromatogram měření piva Primátor IPA
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



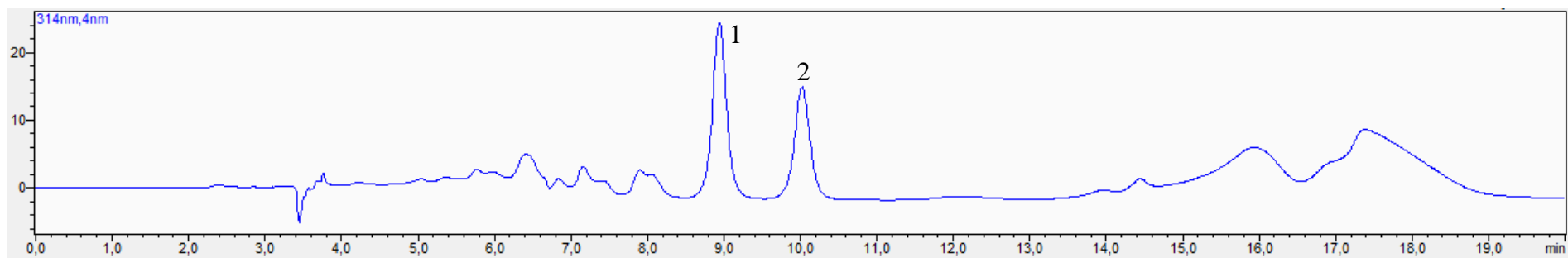
Obrázek I.11- Chromatogram měření piva Primátor premium
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



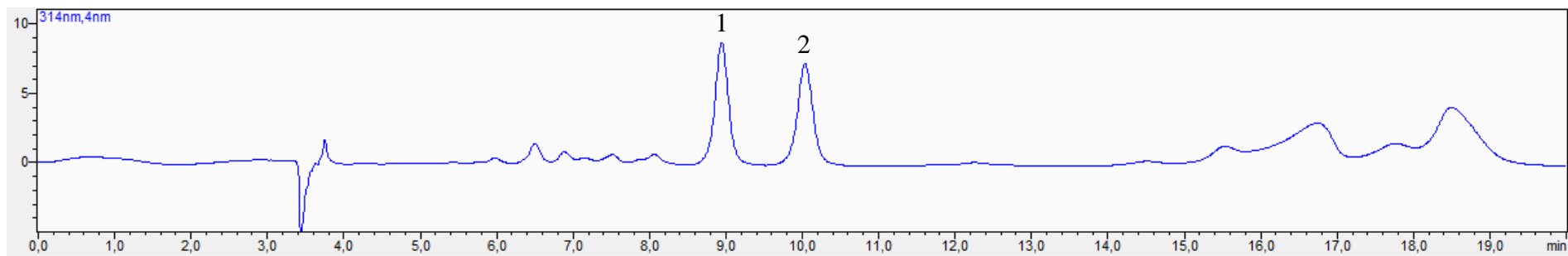
Obrázek I.12- Chromatogram měření piva Krušovice za studena chmelené
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



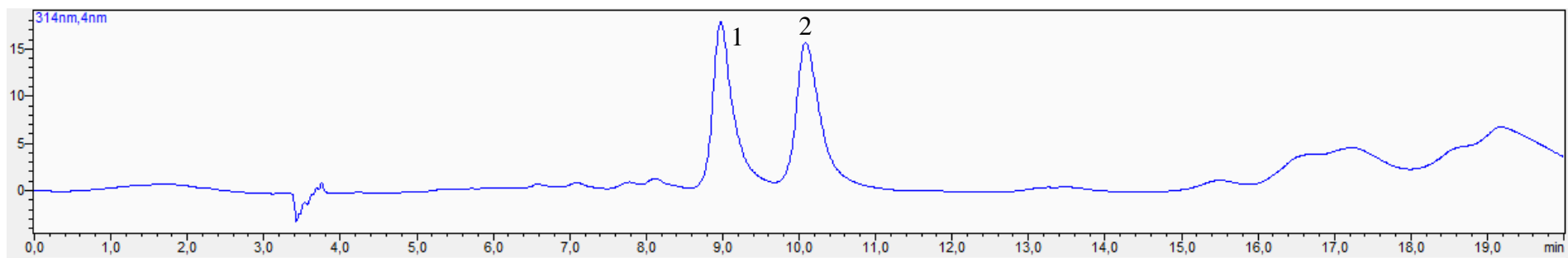
Obrázek I.13- Chromatogram z měření extrakce piva Krušovice 12° ze žateckého chmele
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



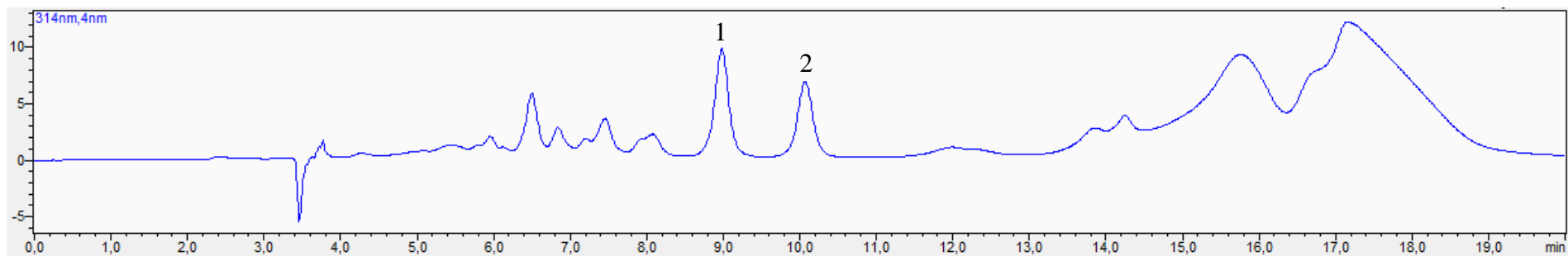
Obrázek I.14- Chromatogram měření piva Svijanský rytír
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



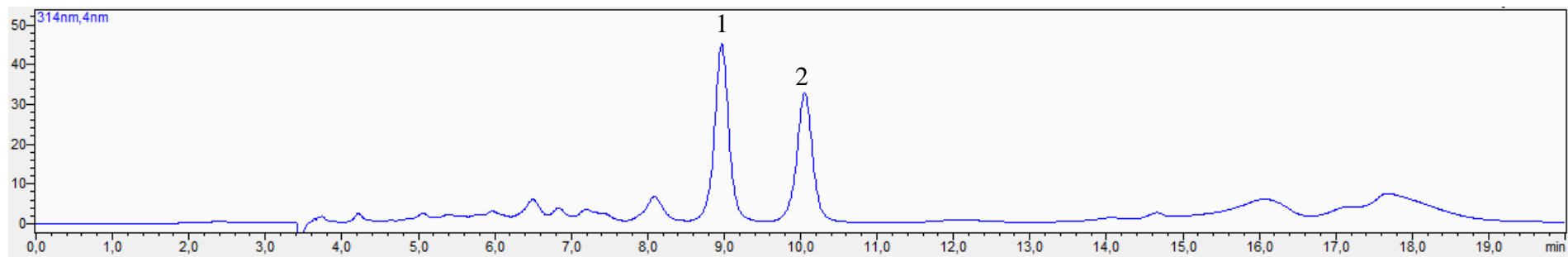
Obrázek I.15- Chromatogram měření piva Svijanský máz
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



Obrázek I.16- Chromatogram měření piva Jubilejní Hrabalův ležák
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



Obrázek I.17 - Chromatogram měření piva Francinův ležák
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)



Obrázek I.18 - Chromatogram měření piva New England IPA
(1- kohumulon, 2- adhumulon + humulon)

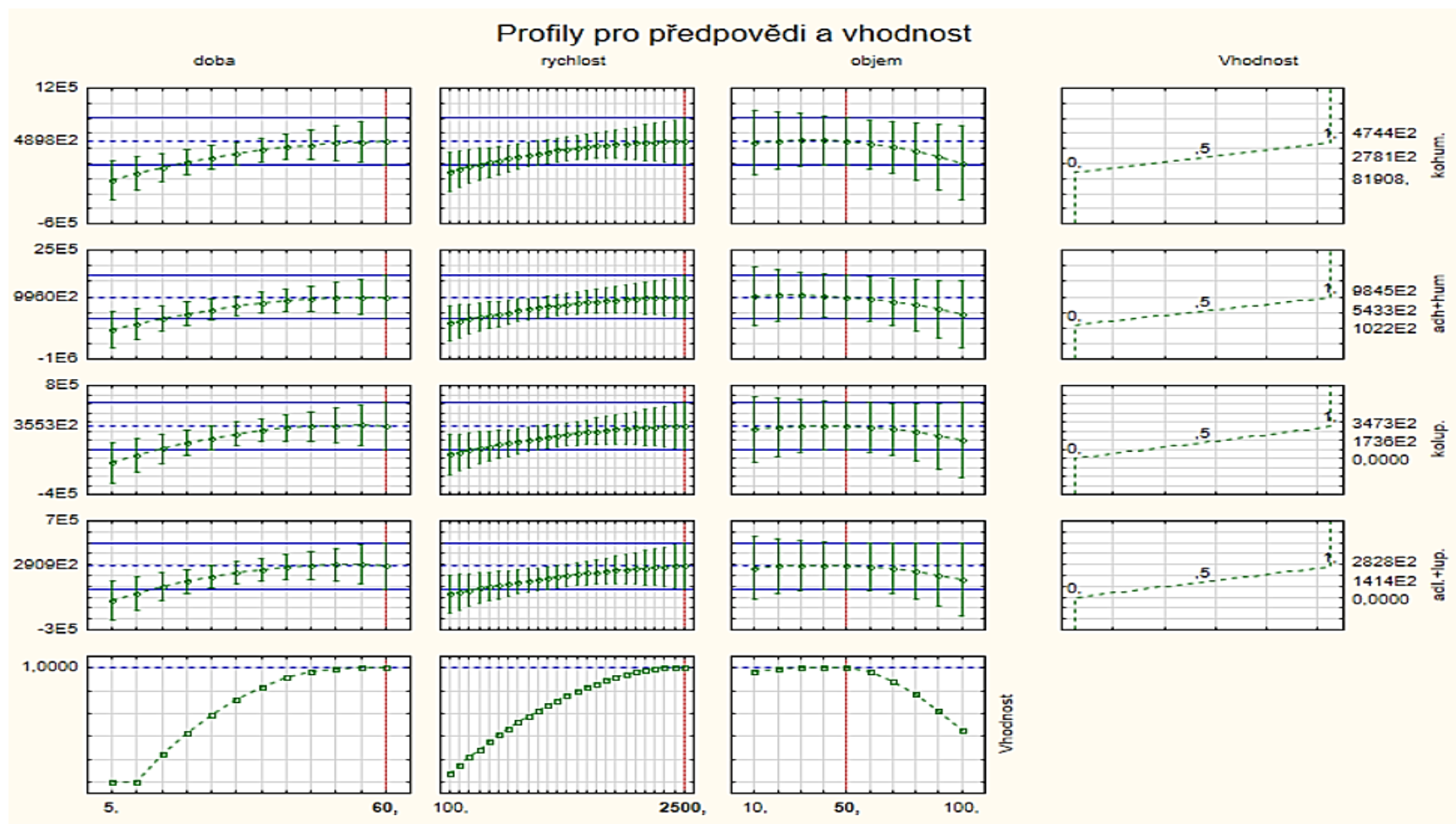
Příloha II: Vygenerované podmínky pokusů pro optimalizaci extrakce

Tabulka II 1- Podmínky pokusů pro optimalizaci extrakce SBSE-PDMS, SBSE-EG

Pokus	Blok	Čas [min.]	Rychlost [rpm]	Objem [ml]
1	1	15	450	25
2	1	15	450	75
3	1	15	1800	25
4	1	15	1800	75
5	1	45	450	25
6	1	45	450	75
7	1	45	1800	25
8	1	45	1800	75
9 (C)	1	30	1250	50
10 (C)	1	30	1250	50
11	2	3	1250	50
12	2	57	1250	50
13	2	30	50	50
14	2	30	2450	50
15	2	30	1250	5
16	2	30	1250	95
17 (C)	2	30	1250	50
18 (C)	2	30	1250	50

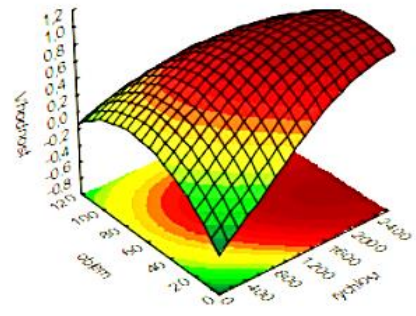
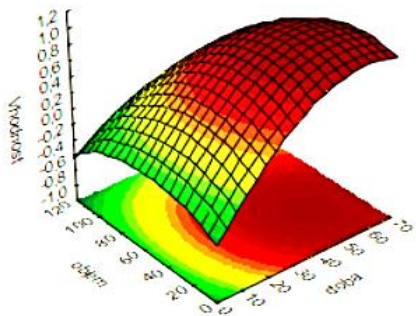
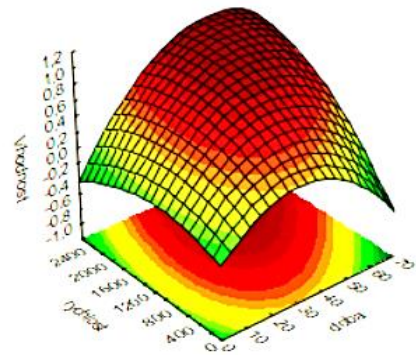
(C- centrální bod; čas- doba extrakce; rychlost- otáčky magnetické míchačky; objem- dávkovaný objem standardu či vzorku piva)

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

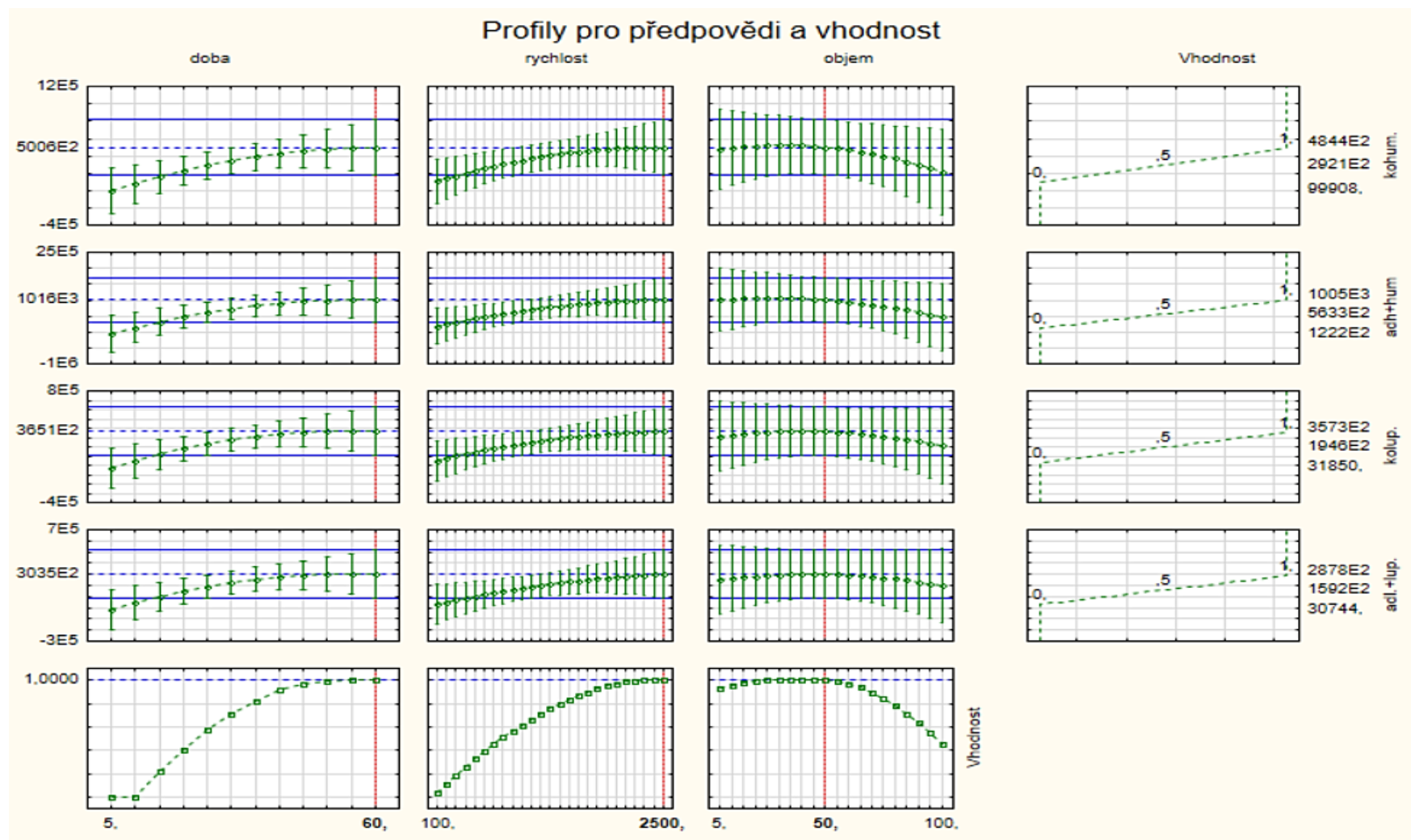


Obrázek III.1- Odezvový profil pro extrakci SBSE-PDMS standardního roztoku (mikroextrakce magnetickým míchadélkem s polydimethylsiloxanovou sorpční vrstvou)

Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda:Spline

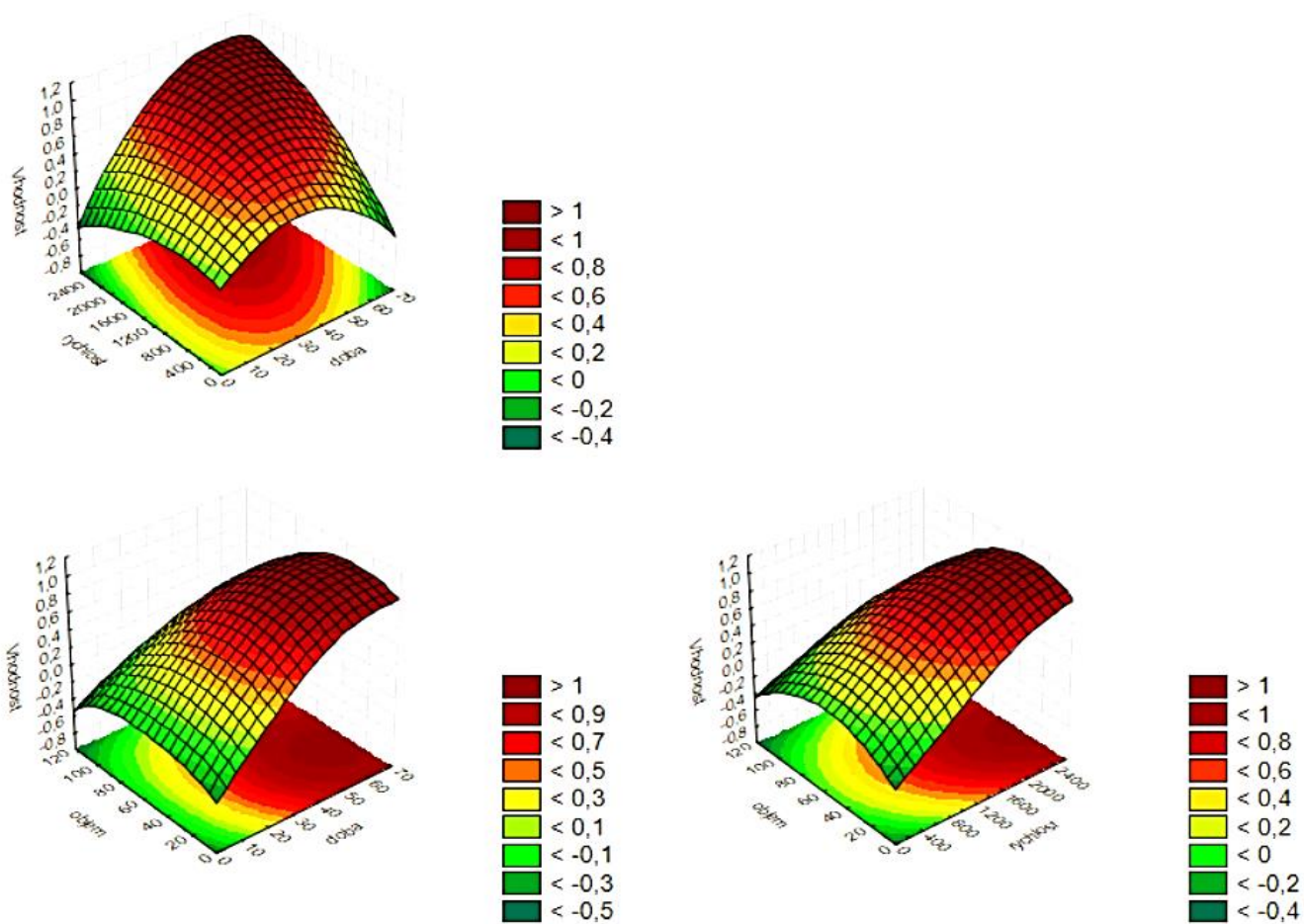


Obrázek III.2- 3D vhodnostní profil pro extrakci SBSE-PDMS standardního roztoku (mikroextrakce magnetickým míchadélkem s polydimethylsiloxanovou sorpční vrstvou)

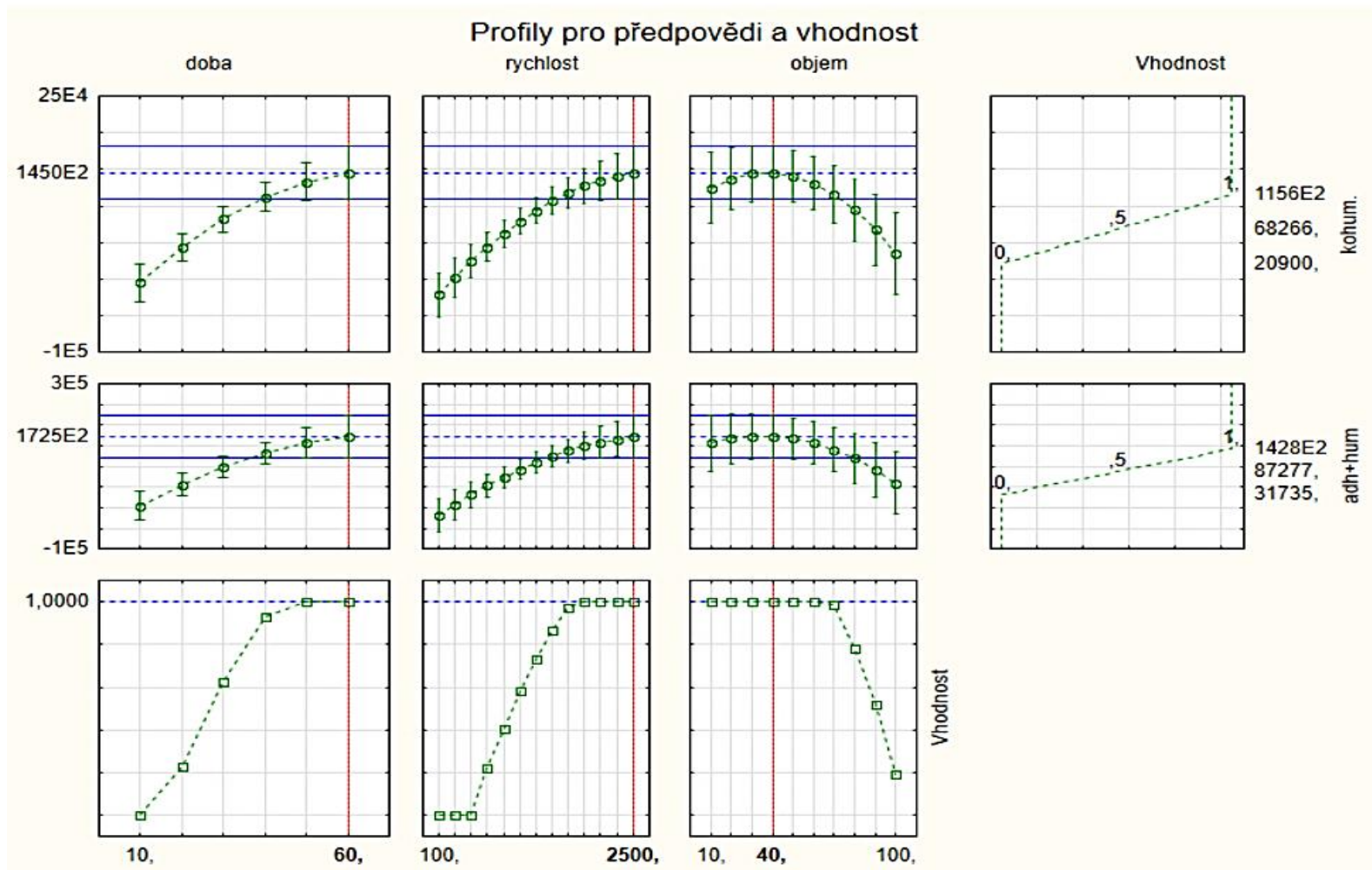


Obrázek III.3- Odezvový profil pro extrakci SBSE-EG standardního roztoku (mikroextrakce na magnetické míchadélko s ethylglykolovou sorpční vrstou)

Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda:Spline

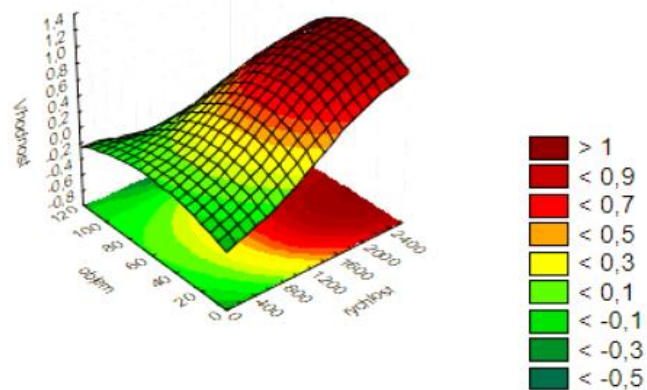
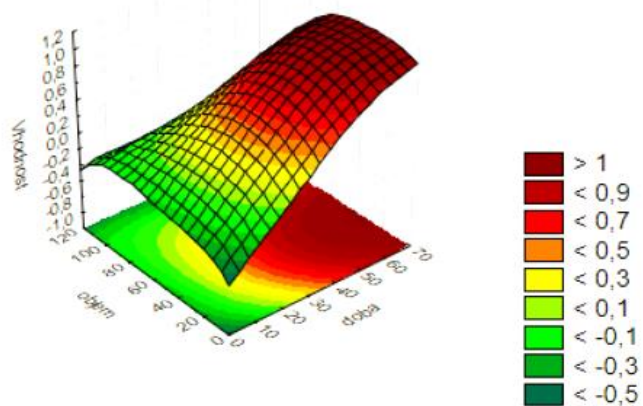
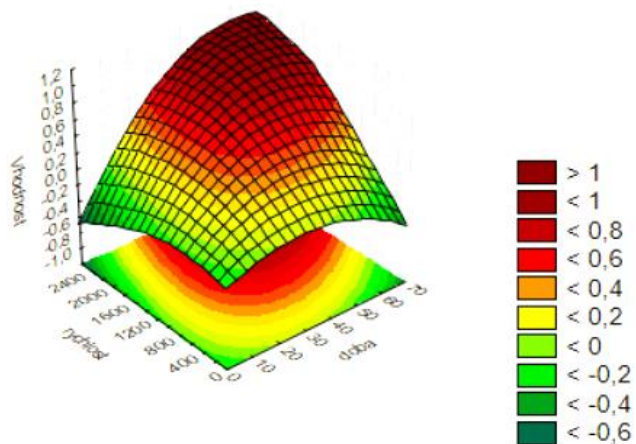


Obrázek III.4- 3D vhodnostní profil pro extrakci SBSE-EG standardního roztoku (mikroextrakce na magnetické míchadélko s ethylglykolovou sorpční vrstvou)

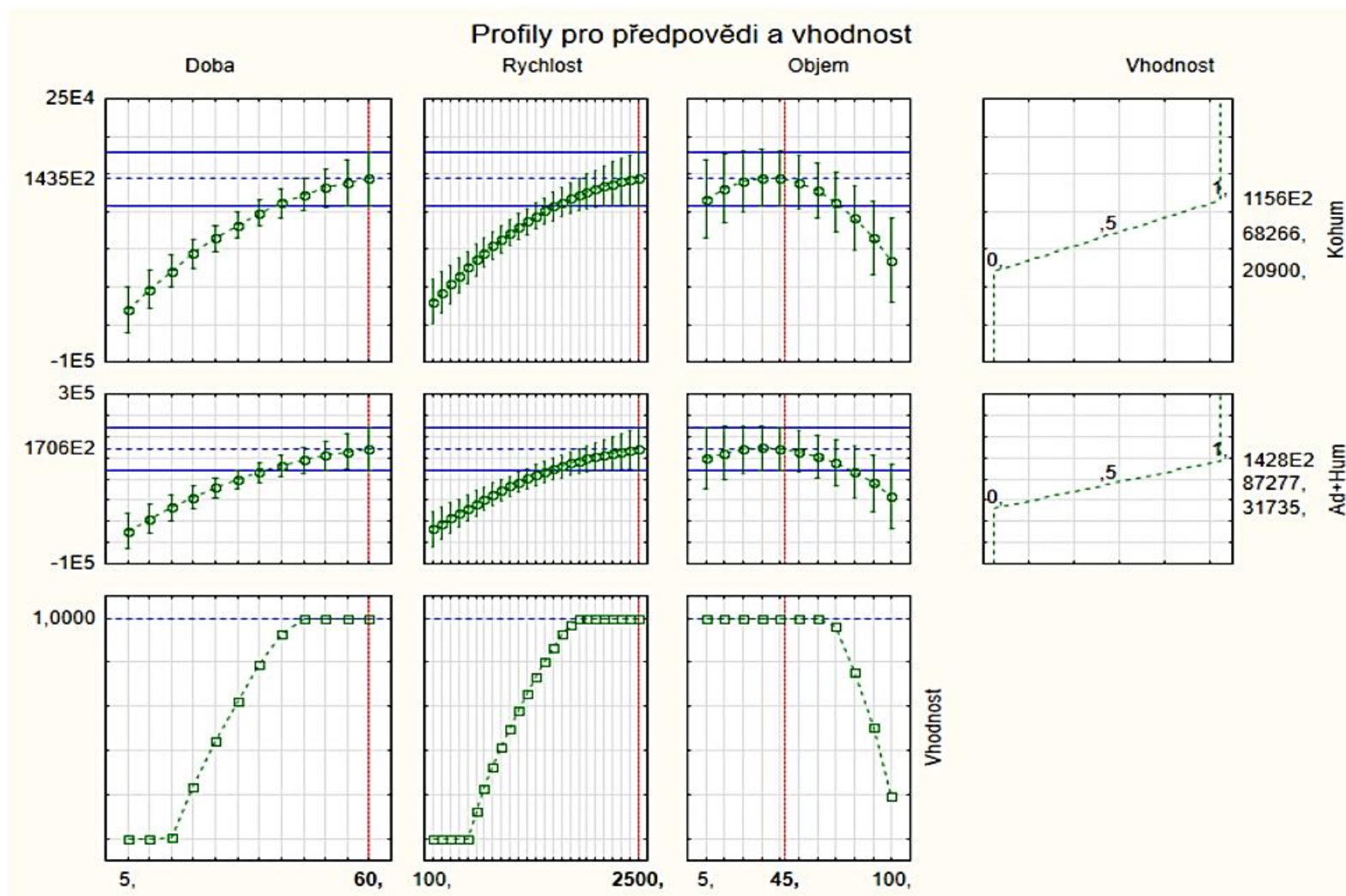


Obrázek III.5- Odezvový profil pro extrakci SBSE-EG vzorku piva (mikroextrakce na magnetické míchadlo s ethylglykolovou sorpční vrstvou)

Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda: Spline

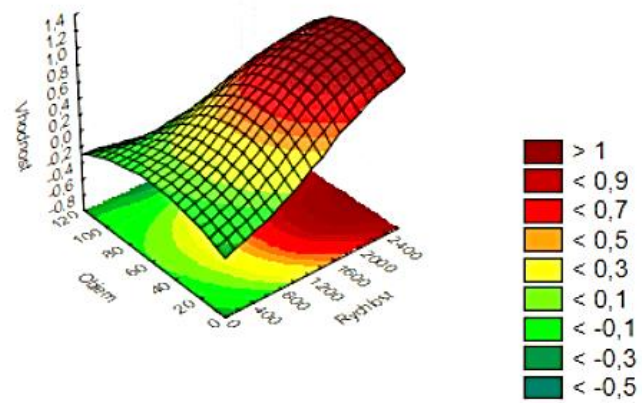
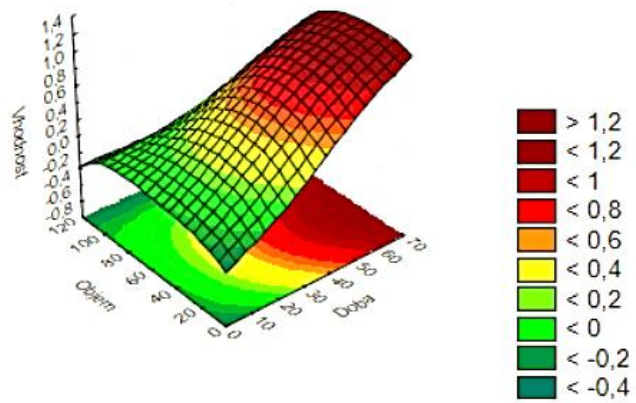
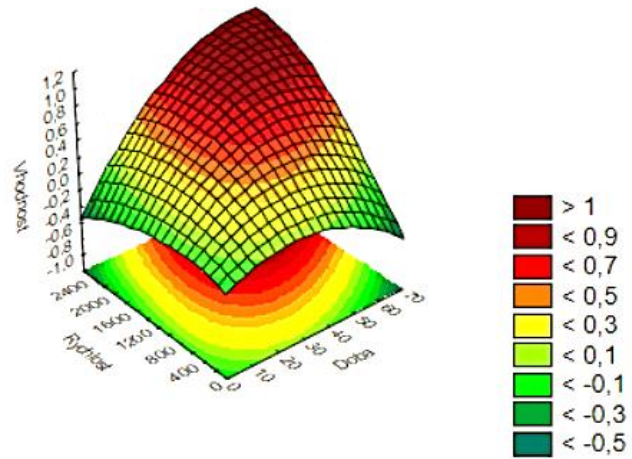


Obrázek III.6- 3D vhodnostní profil pro extrakci SBSE-EG vzorku piva (mikroextrakce na magnetické míchadélko s ethylglykolovou sorpční vrstvou)



Obrázek III.7- Odezvový profil pro extrakci SBSE-PDMS vzorku piva (mikroextrakce na magnetické míchadélko s polydimethylsiloxanovou sorpční vrstvou)

Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda:Spline



Obrázek III.8- 3D vhodnostní profil pro extrakci SBSE-PDMS vzorku piva (mikroextrakce na magnetické míchadélko s polydimethylsiloxanovou sorpční vrstvou)