

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Tereza Zlochová

STANOVENÍ SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK  
VE CHMELU METODOU GC-MS

Determination of sensory active compounds in hops using  
GC-MS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Praha 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 30.8.2017

Podpis

### **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému konzultantovi Ing. Karlu Štěrbovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost během spolupráce a ochotu při konzultacích. Dále děkuji vedoucí bakalářské práce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. a konzultantce RNDr. Mgr. Janě Olšovské, Ph.D. za cenné rady. Také děkuji laborantce Lucii Dolejší za pomoc v laboratoři VÚPS. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a blízkým za podporu při sepisování této práce.

## **Stanovení sensoricky aktivních látek ve chmelu metodou GC-MS**

### **Abstrakt**

Cílem této práce bylo stanovit sensoricky aktivní látky ze vzorku chmele pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Pro stanovení byly vybrány chmelové silice, které i přes své nízké zastoupení ve chmelu obsahují až několik set složek. Silice byly extrahovány za použití nové metody extrakce na fluidním ethanolovém loži a extrakt byl podroben analýze na GC-MS. Nedílnou součástí této práce bylo určení výtěžnosti metody, která se stala nástrojem pro stanovení obsahu silic v různých odrůdách chmele. Bylo provedeno porovnání získaných výtěžků s literaturou a pátráno po spojitosti mezi chemickou povahou silic a jejich zastoupením ve vzorku chmele s ohledem na jeho stáří.

**Klíčová slova:** extrakce, chmel, chmelové silice, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **Determination of sensory active compounds in hops using GC-MS**

### **Abstract**

The goal of this bachelor's thesis was to determine sensory active compounds from a sample of hops by gas chromatographic-mass spectrometric detection. Hop oils were selected for this determination which, despite its low representation in hops, contain up to several hundred components. Hop oils were extracted using a new method based on fluidized-bed extraction. An integral part of this work was identifying the yield of the method that has become an instrument to defining the content of hop oils in different hop varieties. A comparison of the obtained extracts with the literature was made and a search was done for the link between chemical structure of the hop oils and their representation in the hops sample with regard to its age.

**Keywords:** extraction, hops, hop oil, gas chromatography, mass spectrometry

## OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. CHMEL.....</b>	<b>10</b>
2.1 Odrůdy chmele.....	11
2.2 Chmelové silice .....	12
2.2.1 Chemické skupiny silic.....	12
2.2.2 Způsoby extrakce a stanovení silic .....	14
<b>3. PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....</b>	<b>16</b>
3.1 Průběh GC.....	17
<b>4. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....</b>	<b>21</b>
4.1 Typy hmotnostních analyzátorů .....	23
4.1.1 Kvadrupólový analyzátor .....	23
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>26</b>
5.1 Chemikálie, materiály, přístroje .....	26
5.2 Pracovní postup .....	28
5.2.1 Příprava standardních roztoků .....	28
5.2.2 Průběh extrakce .....	29
5.2.3 Přečištění extraktu .....	31
5.2.4 Chromatografická analýza.....	31
5.3 Vyhodnocení.....	32
<b>6. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>35</b>
6.1 Stanovení výtěžnosti metody.....	35

<b>6.2</b>	<b>Porovnání výtěžností na základě chemické struktury silic .....</b>	<b>36</b>
6.2.1	Chemické přeměny .....	36
6.2.2	Souvislost chemické struktury s výtěžnostmi vybraných zástupců .....	38
<b>6.3</b>	<b>Porovnání výtěžků různých odrůd chmele s literaturou .....</b>	<b>39</b>
6.3.1	Sledování vlivu stárnutí chmele na zastoupení silic ve vzorku .....	41
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>43</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>45</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DCM	dichlormethan
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$K_c$	distribuční konstanta
MS	hmotnostní spektrometrie
$m/z$	podíl hmotnosti a náboje [g/C]
PTFE	polytetrafluorethylen
RT	retenční čas [min]
$U$	stejnoseměrné napětí [V]
$U_m$	amplituda střídavého napětí [V]
v/v	objemové procento

## 1. Úvod

Chmel se jako surovina stal jednou z nepostradatelných součástí pivovarnického průmyslu. Dodává pivu nejen charakteristické aroma a hořkost, ale je spojován i s jeho trvanlivostí a stálostí pěny.[1] Existuje několik druhů chmele lišících se především zastoupením různých silic. Nejvýznamnější odrůdou pro Českou republiku je *Žatecký poloraný červeňák*, který byl získán z původních chmelů pěstovaných na území Čech. Mezi další odrůdy pro ČR patří například *Premiant*, *Agnus* či *Kazbek* a mnoho dalších.[6]

Přestože poznatků o chmelu, jeho struktuře, složení a vlivu na výsledný produkt – pivo – přibývá se zdokonalujícími se analytickými metodami, výzkum ještě není zdaleka u konce. Po celém světě jsou prováděny studie zaměřené hlavně na objasnění struktury chmelových sloučenin a jejich význam při vaření piva.[2]

Prvním krokem ke zjištění přítomnosti těchto látek je jejich co nejúčinnější oddělení od matrice. Pododíl 2.2 poskytuje informace o chmelových silicích, jakožto významné složce chmele. Bylo aplikováno několik metod pro stanovení silic ve vzorku, tou doposud nejvyužívanější byla destilace silic vodní párou. Jde o účinnou metodu, avšak působením vysokých teplot během procesu může docházet ke strukturním přeměnám látek, což má dopad na výsledné kvalitativní i kvantitativní složení směsi.[3;4] Dále byly silice extrahovány pomocí organických rozpouštědel, které omezují vlivy vysokých teplot, je však složité jejich odstraňování z výsledného produktu.[3] Za zmínku určitě stojí získávání silic extrakcí na pevné fázi pomocí oxidu uhličitého, které sice vylučují přeměny látek působením vysokých teplot, ale jsou časově i finančně náročné a mají složitou parametrizaci. [3;4;5]

Cílem této práce je stanovit senzoričky aktivní látky ve chmelu, čehož bylo dosaženo metodou Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s., extrakcí na bázi fluidního ethanolového lože. Na rozdíl od metod získávání silic postupy zmiňovanými výše, je tato metoda finančně a časově nenáročná účinná a, co je

nejdůležitější, má nejmenší vliv na přeměny extrahovaného vzorku, neboť při ní není potřeba extrémně vysokých teplot.[7] Extrakty mohou být dále analyzovány GC-MS a vyhodnocena spektra, která poskytnou informace o zastoupení a původu jednotlivých silic v analyzovaném vzorku. Tyto údaje pak lze porovnávat s již publikovanými záznamy a vyvodit uspokojivé závěry.

## 2. Chmel

Chmel (*Humulus*) je dvoudomá vytrvalá popínavá rostlina mírného pásu z čeledi Cannabaceae, kam patří spolu s rodem konopí.[2] Své využití nachází chmel nejen v potravinářském, ale díky svým dezinfekčním a zklidňujícím účinkům, také ve farmaceutickém průmyslu.[3]

Přestože existuje několik druhů chmele, pro pivovarnictví má největší význam kulturní chmel otáčivý (*Humulus lupulus*), konkrétně jeho samičí květy. Ty se po dozrání mění v nahnědlé hlávky se žlázami produkujícími lupulin, což je žlutý prášek obsahující pryskyřice a silice klíčové pro výrobu piva. Kromě pryskyřic a silic se v chmelových hlávkách nacházejí také lipidy, vosky, bílkoviny a samozřejmě celulóza – jsou to ale látky bez primárního vlivu na hodnotu piva, z analytického hlediska jde tedy spíše o matici.[2]

Dozrálé hlávky se sklízí na přelomu léta a podzimu, kdy je obsah pryskyřic nejvyšší.[2] Hlávky se suší, přečišťují a dále zpracovávají; například na prášek či granulát, což je vysušený, rozemletý a slisovaný chmel, nebo se vytváří prostý extrakt.[1;3;7] Tyto produkty zpracování se následně využívají během vaření piva. To se skládá ze 4 složek: voda, sladový ječmen, chmel a kvasnice. Kompozice těchto surovin má dopad na charakter a škálu stylů piva.[1]

### **Výroba piva**

Výroba piva začíná naklíčením a namletím sladových zrn, která jsou dále inkubována v horké vodě, což vede k následnému naštěpení polysacharidů na nižší cukry a vzniká sladina.[1;7] Sladina se přecedí od zbytků zrn a dále se vaří za přídavku chmele.[7]

Takto zpracovaný roztok je označován jako mladina, která je po přečištění a ochlazení fermentována pomocí kvasinek.[7] Ty zajistí přeměnu jednoduchých cukrů v alkohol a oxid uhličitý. Po fermentaci pivo dozrává a během skladování ještě mění své aroma i chuť.[1]

Chmel se přidává na začátku vaření, aby vlivem vyšších teplot došlo k chemickým změnám přítomných látek. Dosud bylo v pivu objeveno více než 1000 různých sloučenin, které pocházejí přímo ze surovin, ale byly vlivem zpracování chemicky pozměněny. Nevýhodou však je, že působením vyšších teplot a otevřenou atmosférou snadno dojde k vyprcháání chmelové vůně [7], proto se provádí tzv. pozdní chmelení, kdy se aromatický chmel přidá až po ukončení varu, čímž produkt získá chmelovou chuť i aroma. V dnešní době se za účelem dosažení vyššího chmelového aroma přidávají chmelové extrakty přímo do hotového piva. Chmel také v závislosti na použité odrůdě zajišťuje hořkost piva, zlepšuje konzistenci a stabilitu pивní pěny a díky antibakteriálním účinkům zabraňuje kazivosti výsledného produktu.[1]

## 2.1 Odrůdy chmele

Obsah silic ve chmelu a jejich vzájemný poměr závisí zejména na různých kulturních odrůdách chmele.[7] Existuje několik odrůd chmele lišících se původem a, co je důležitější, obsahem různých silic, jejichž kompozice dodává výslednému produktu charakteristické vlastnosti.[2] Seznam odrůd chmele pro ČR zapsaných ve *Státní odrůdové knize* čítá k červnu 2017 14 jmen[8], vybraní zástupci jsou popsáni níže.

### *Žatecký poloraný červeňák*

*Žatecký poloraný červeňák*, nebo-li Saaz, byl získán klonováním z původních chmelů pěstovaných na území Žatecka a Ústecka.[6] S obsahem silic až 8000 mg/kg chmele je charakteristický především svým jemným chmelovým kořeněným aroma.[6;7] Z odrůdy Saaz byl poprvé izolovaný farnesen.[2;7]

### *Sládek*

Jedná se o hybridní odrůdu chmele s *Žateckým červeňákem* v původu. Tento chmel je spolu s *Premiantem* a *Agnusem* hojně využíván pivovary.[6] Obsahuje zhruba 15000 mg silic v kilogramu chmele a vyniká svou jemnou chmelovou ovocnou vůní a vyváženou hořkostí.[6;7]

### *Premiant*

*Premiant* je hybridní odrůda chmele, která má ve šlechtitelské linii také *Žatecký poloraný červeňák*. [5;6] Pro tuto odrůdu je charakteristická výrazná hořkost, plná chuť chmele a ovocný charakter aroma.[6]

### *Agnus*

Jde o hybridní odrůdu chmele s americkým původem v genech.[5] Aroma je kořenité a velmi intenzivní díky bohatému obsahu silic až 30000 mg/kg chmele.[6]

### *Kazbek*

*Kazbek* je původem ruský planý chmel, který byl zkřížen a vyšlechtěn pro účely pivovarnictví a v dnešní době nachází uplatnění zejména v minipivovarech. Má plné citrusové aroma a obsah silic až 18000 mg/kg chmele.[6]

V Tabulce 1 (str. 15) je uveden seznam majoritních silic ve vybraných odrůdách chmele a jejich zastoupení v mg/kg chmele.

## 2.2 Chmelové silice

Stejně jako pryskyřice jsou silice vylučovány lupulinovými žlázami rostlin chmele. V literatuře také bývají označovány jako esenciální oleje, protože představují těkavou složku lupulinu a obohacují tak pivo zejména o aroma a příchut', zatímco pryskyřice mu dávají charakteristickou hořkost.[2;7]

Kilogram vysušeného chmele obvykle obsahuje 5000 – 30000 mg silic, přestože bylo zjištěno, že i takto malá frakce se sestává až 1000 složek v závislosti na odrůdě, zralosti při sběru, podmínkách růstu, skladování chmelu a dalších faktorech.[2;7]

Chemicky byly látky tvořící skupinu silic koncem 20. století rozděleny do tří obsáhlých skupin na uhlovodíky, kyslíkaté sloučeniny a sloučeniny obsahující síru.[2]

### 2.2.1 Chemické skupiny silic

#### **Uhlovodíky**

Skupina uhlovodíku je nejvíce zastoupenou skupinou ve složení silic (50 – 80 %), i přes svou vysokou nestálost.[2;7] Snadno se oxiduje a tvoří polymery, rozpustnost ve vodě je omezená a vzhledem k tomu, že jsou tyto látky velmi těkavé, většina se ztrácí odpařením. Uhlovodíky lze rozdělit do tří skupin na alifatické uhlovodíky, monoterpeny a seskviterpeny.[2] Nejvíce zastoupenou složkou je myrcen, následují humulen,

farnesen (Obr. 1, str. 14), karyofylen, ocimen, pinen a selinen, které zaručují pivu chmelové aroma.[1;2]

### **Sloučeniny obsahující síru**

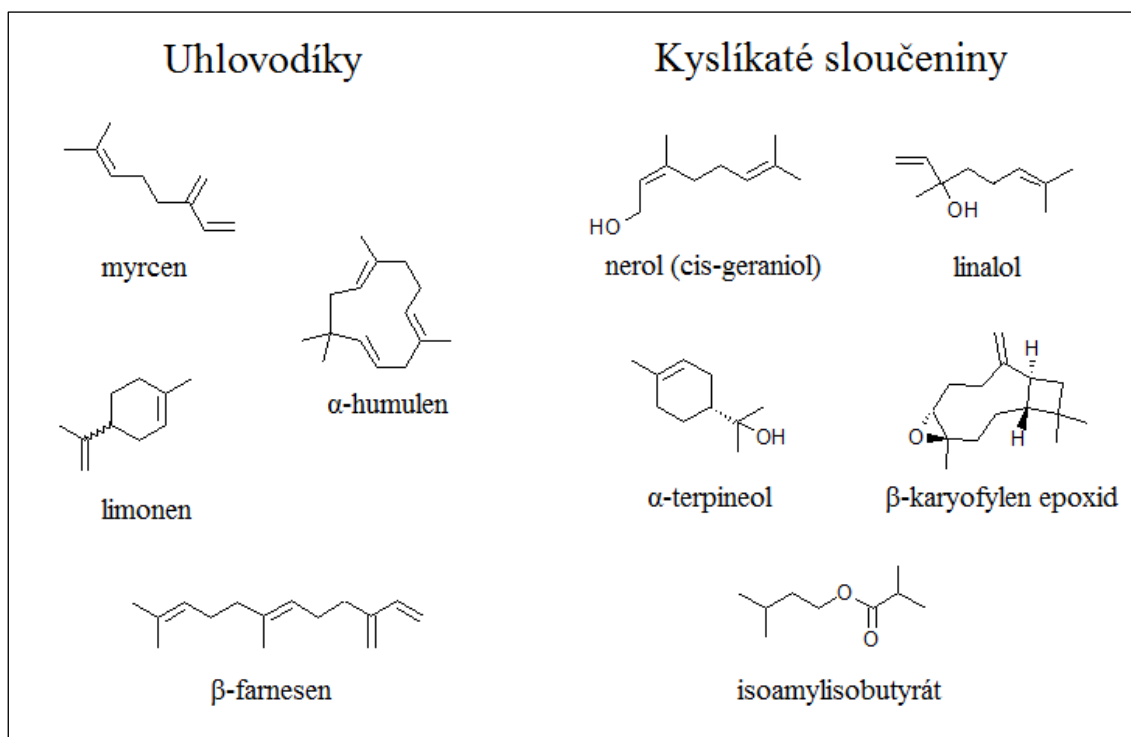
Přestože skupina silic obsahujících síru je nejméně obsáhlá, mají tyto sloučeniny velmi výrazné a mnohdy nepříjemné aroma, které je při výrobě piva nežádoucí. Mají totiž nízké sensorické prahy až 0,1 ppb [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] a nemusí být vždy instrumentálně detekovatelné.[2] Jejich poměr k ostatním složkám silic se se stářím chmele také nepatrně mění, neboť některé uhlovodíky, mezi něž patří například humulen či karyofylen, dokážou za určitých podmínek reagovat s elementární sírou za vzniku episulfidů.[7]

### **Kyslíkaté sloučeniny**

Kyslíkaté sloučeniny tvoří nejpestřejší skupinu ve složení silic, přestože se v celkovém zastoupení vyskytují pouze ze 30 %, většinou ve stopových množstvích. V kyslíkaté frakci lze nalézt různé sloučeniny od alkoholů přes aldehydy, ketony, kyseliny a epoxidy až po estery s nejvyšší participací.[2]

Důležité jsou zejména proto, že obsahují jak těkavé, tak netěkavé složky, u kterých je velmi pravděpodobné, že se dostanou až do výsledného produktu. Stejně jako uhlíkaté sloučeniny mohou postupem času měnit svou strukturu, častý je výskyt enantiomerů.[2]

Přestože je zastoupení uhlovodíků v čerstvých chmelových silicích značně vyšší než zastoupení kyslíkatých sloučenin, stárnutím chmele se tento poměr mění ve prospěch právě těchto sloučenin z důvodu samovolné oxidace uhlíkatých látek.[2] Například oxidací karyofylenu a humulenu vznikají epoxidy, které pomocí hydrolýzy přecházejí na alkoholy. Nejvýznamější zástupci této skupiny jsou nerol a linalol (Obr. 1, str. 14).[1]



**Obr. 1: Strukturní vzorce vybraných zástupců silic**

Převzato z: *NIST Chemistry WebBook* [9] (19.8.2017), vlastní úprava pomocí programu *ADC/ChemSketch Freeware* dostupného z: <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/>

### 2.2.2 Způsoby extrakce a stanovení silic

Většina silic je špatně rozpustná ve vodě, ale poměrně dobře mísitelná s organickými rozpouštědly.[7] Pro stanovení množství silic ve vzorku chmele existuje hned několik metod, mezi něž patří destilace vodní parou, extrakce pomocí organických rozpouštědel či oxidu uhličitého, extrakce za pomoci ultrazvuku, stanovení rozemletého vzorku chmele bez předchozí extrakce nebo relativně nová metoda získávání silic založená na extrakci na fluidním ethanolovém loži.[1;4;5;7]

První tři zmíněné metody mají však zásadní nedostatky. K destilaci parou je zapotřebí vysokých teplot po celou dobu procesu, které ale zapříčiňují strukturní změnu extrahovaných látek a mají vliv na kvalitu výsledné směsi.[3;4] U extrakce pomocí organických rozpouštědel sice nedochází k tak velkým kvalitativním změnám, je ale nevýhodná z důvodu pozdějšího odstraňování těchto rozpouštědel z finálního produktu za použití separačních procesů, během kterých může dojít ke ztrátám hmoty.[3] Získávání chmelových silic za pomoci oxidu uhličitého v kombinaci s extrakcí na koloně s pevnou fází už je sice dokonalejší metodou, kde jsou látky získávány

kvantitativně bez značných tepelných přeměn [4], nevýhoda však tkví v časové náročnosti metody, nedokonalé extrakci všech polárních sloučenin a složité parametrizaci procesní teploty a tlaku, které až příliš ovlivňují extrakční kolonu, a tudíž mají dopad na celý průběh extrakce.[3;5]

Existuje několik metod stanovení obsahu silic, mezi něž patří zejména plynová chromatografie ve spojení s olfaktometrií [7], plamenovou ionizační nebo hmotnostní detekcí.[4;5]

### Extrakce pomocí fluidního ethanolového lože

Způsob extrakce chmelových silic pomocí ethanolu je, na rozdíl od ostatních metod, méně časově náročná, s menší pravděpodobností tepelných změn extrahovaných látek a v kombinaci s vhodným standardem je navíc dobře opakovatelná. Je založená na míšení vzorku chmele na extrakčním filtru s odpařujícím se etanolem (Obr. 6, str. 30). Po ochlazení dochází ke kondenzaci ethanolových par a extrakci silic do roztoku.[5]

**Tab. 1: Kategorizace klíčových silic do chemických skupin a jejich hmotnostní zastoupení ve vybraných odrůdách chmele**

Silice	Skupina	Agnus	Kazbek	Žatecký poloraný červeňák
		mg/kg		
Celkové silice		<b>20000 – 30000</b>	<b>9000 – 18000</b>	<b>4000 – 8000</b>
β-farnesen	uhlovodík	< 300	< 180	560 – 1600
α-humulen	uhlovodík	3000 – 7500	1800 – 6300	600 – 2400
β-karyofylen	uhlovodík	1800 – 4500	900 – 2700	240 – 720
Limonen	uhlovodík	30 – 90	13,5 – 36,0	4 – 16
Myrcen	uhlovodík	8000 – 16500	3600 – 9900	1000 – 3200
α-pinen, β-pinen	uhlovodíky	120 – 360	45 – 162	16 – 64
α-selinen, β-selinen	uhlovodíky	200 – 900	90 – 540	20 – 120
Geraniol	alkohol	60 – 180	4,5 – 36	4 – 16
Linalol	alkohol	60 – 150	27 – 90	16 – 48
2-undekanon	keton	60 – 210	9 – 45	20 – 72
Isoamylisobutyryát	ester	100 – 300	54 – 225	< 0,8
Isobutylisobutyryát	ester	10 – 45	13,5 – 45,0	< 0,8
Methyl-4-decenoát	ester	200 – 540	45 – 180	40 – 140

Převzato z: *Humulus lupulus – a story that begs to be told* [2], *Atlas českých odrůd chmele* [6], vlastní zpracování

### 3. Plynová chromatografie

Chromatografie je analytická separační metoda založená na rozdělávání látek mezi stacionární a mobilní fází. Dělení látek je pak dáno jejich afinitami ke stacionární fázi, rozdílnými velikostmi částic či velikostmi jejich náboje.[10]

Podle skupenství mobilní fáze rozeznáváme tři druhy chromatografie, mezi které patří chromatografie plynová, jejíž mobilní fází je plyn.[11] Je založená na dělení látek podle jejich afinity ke stacionární fázi a relativních tenzí par při dané teplotě.[10] Tato metoda slouží především k analýze plynů, nedisociovatelných kapalin, ale i pevných organických i organokovových látek a těkavých sloučenin o molekulární hmotnosti 2 až 1000 daltonů.[10;11] Pomocí GC však nelze separovat makromolekuly a organické a anorganické soli.[11]

Výhody GC [10]:

- + spolehlivá a rychlá analýza v řádu desítek minut
- + relativně nenákladná a jednoduchá technika
- + účinná, vykazující vysoké rozlišení
- + metoda citlivá – schopná pracovat s koncentracemi v řádech ppm a často i ppb
- + poskytující přesnou kvantitativní analýzu s relativními směrodatnými odchylkami 1 – 5 %
- + stačí malé množství vzorku v řádu  $\mu\text{l}$
- + převážně nedestruktivní – výhodné pro kombinování s dalšími separačními či detekčními technikami

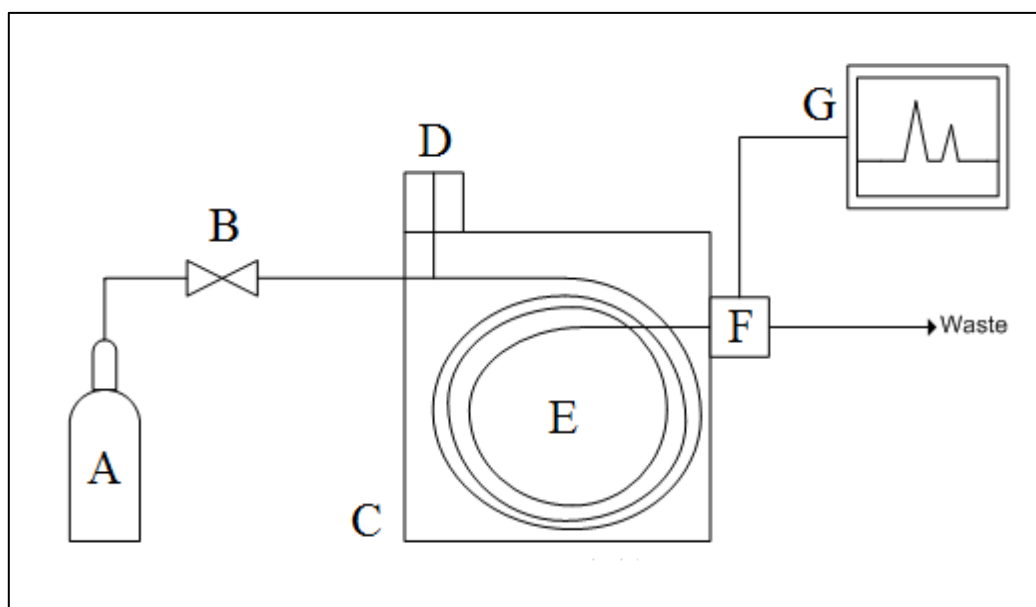
Nevýhody GC [10]:

- omezená pouze na analýzu těkavých vzorků
- nevhodná pro teplotně stabilní vzorky
- náročná co se přípravy velkých vzorků týče
- nedokáže poskytnout přesnou identifikaci sloučeniny – pro potvrzení kvality píků vyžaduje spektroskopickou detekci

### 3.1 Průběh GC

Samotná chromatografická analýza začíná zavedením nosného plynu (často jde o vodík, hélium, dusík nebo argon) pomocí průtokoměru do aparatury (Obr. 2).[11;12] Požadavky pro výběr vhodného nosného plynu jsou jeho čistota, netoxičita, nízké pořizovací náklady, žádná chemická interakce se vzorkem a stacionární fází, a aby byl vyhovující matricí ke zvolenému detektoru.[10;11]

Klíčovým krokem analýzy je zavedení vzorku do nástřikové hlavy (dávkovače), kde vlivem vysokých teplot dochází k jeho zplynění před vstupem do kolony.[10;11] Nástřik vzorku probíhá již převážně automatickými dávkovacími pro zachování co nejvyšší reprodukovatelnosti.[12] Nejostřejšího píku a nejvyššího rozlišení se dosáhne dávkováním nejnižších možných objemů.[10]



**Obr. 2:** Schéma aparatury pro plynovou chromatografii

A – nosný plyn; B – průtokoměr; C – termostat; D – dávkač; E – kolona; F – detektor; G – systém dat

Převzato z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas\\_chromatograph.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph.png) (18.8.2017), vlastní úprava

## **Kolona**

Vzorek je unášen nosným plynem skrz temperovanou kolonu se stacionární fází, pomocí které dochází k separaci složek. Ty putují k detektoru rozdílnou dobu, což je dáno jejich distribučními konstantami  $K_C$  závislými na teplotě.[11] Distribuční konstanta udává rozdělení složky mezi stacionární a mobilní fází.[12]

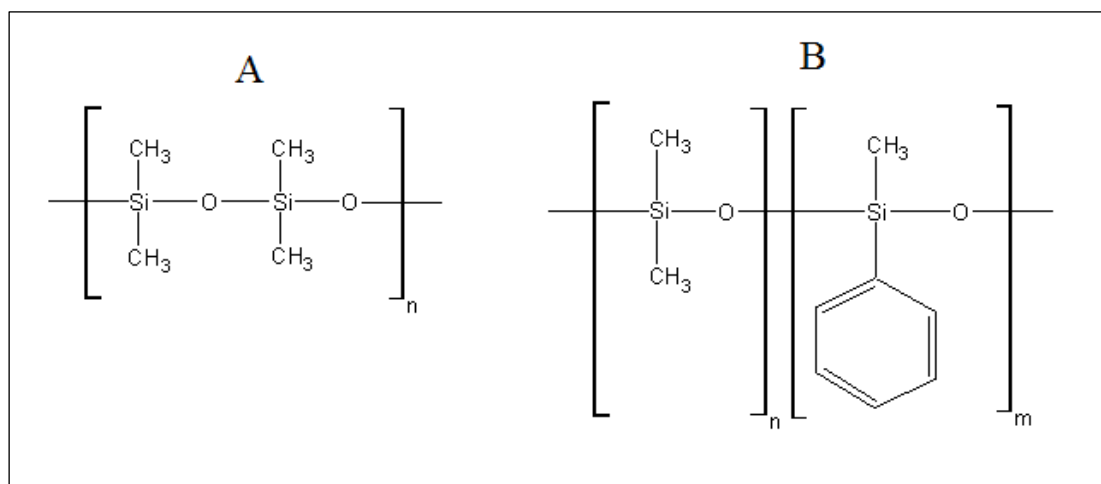
Teploty kolon by neměly přesáhnout hodnot bodů varu analytů; ačkoli zvýšením teploty zákonitě dojde k urychlení analýzy a poklesu retenčních časů separovaných látek, je vyžadován vyšší tlak nosného plynu a hrozí rapidní snížení rozlišení píků ve výsledném chromatogramu.[10;11]

Existují dva druhy kolon. Dnes už málo využívané náplňové kolony jsou vyrobeny ze skla či nerezové oceli s pevnými adsorbenty, mezi které patří silikagel, aktivní uhlí či molekulová síta o různých poloměrech a porézní polymery.[11;12] Jejich výhody tkví v nízké finanční nákladnosti, větší kapacitě a tudíž možnosti dávkovat větší objemy vzorku.[10;11;12]

Kapilární kolony mohou dosahovat délky až 60 metrů s vnitřním průměrem 0,1 – 0,5 mm. Jsou vyrobené z křemene potaženého polyimidem se stacionární fází upevněnou na inertním nosiči. Stacionární fáze by měla splňovat požadavek teplotní stálosti, nízké těkavosti a pevného navázání na nosič, čehož je docíleno zesíťováním či kovalentní vazbou. Příklady kapalných stacionárních fází v GC jsou hojně využívané silikonové (polysiloxany), dále polyestery, carbowaxy (polyethylenglykoly) či ucony (polypropylenglykoly).[11;12]

Silikonové stacionární fáze mají výhodu zejména v tepelné stálosti a nastavitelné míře polarit. Polarity mohou být zvoleny záměnou funkčních skupin za polárnější skupiny ve struktuře nejméně polárního dimethylpolysiloxanu [10], což je zobrazeno na Obr. 3 (str. 19).

Ostatní kapalně stacionární fáze se liší rozdílnými polaritami, molekulovými hmotnostmi, životností a hlavně mezními pracovními teplotami, do kterých je ještě možno kolonu použít. Při vyšších teplotách pak dochází k odpařování této kapalně fáze a falešnému signálu v detektoru.[10]



**Obr. 3: struktura polysiloxanu jako stacionární fáze v kapilárních kolonách**

V nejméně polární struktuře dimethylpolysiloxanu (A) lze zvýšit celkovou polaritu kolony nahrazením libovolného počtu methylů za polárnější molekuly, například fenylu (B) [10]

Vytvořeno pomocí programu *ADC/ChemSketch Freeware* dostupného

z: <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/>, vlastní úprava

Polarita kapilární kolony se volí podle povahy separovaných složek. Nepolárních kolon se využívá při separaci nepolárních molekul pouze na základě uhlíku a vodíku, například alkanů. Polární kolony se volí v případě separace molekul, u kterých se vyskytují násobné vazby či jiné atomy než uhlík a vodík. Vhodné jsou například pro separaci alkenů, arenů, ketonů, aminů, thiolů, esterů, éterů, polychlorovaných bifenyků atd.[11]

### Detektor

Na přítomnost analytů reaguje detektor intenzitou signálu buď v závislosti na objemu mobilní fáze, nebo na čase, které uplynuly od počátku analýzy. Velikost tohoto signálu podává kvantitativní informaci o obsahu látky, kdežto doba, která uplynula, poskytuje kvalitativní informaci o povaze látky.[11]

Detektor je volen v závislosti na typu stanovovaného analytu (selektivita detektoru) a jeho množství ve vzorku (citlivost, nebo-li detekční limit).[11] Podle těchto dvou kritérií se rozlišuje několik druhů detektorů vhodných pro GC (Tabulka 2; str. 20), mezi které patří například detektor tepelně vodivostní (TCD), plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD), hmotnostní spektrometr (MS) atd.[11;12]

Pro tuto práci jsou podstatné zejména detektory hmotnostní, které jsou podrobně popsány v Kapitole 4.

**Tab. 2: charakteristiky nejpoužívanějších detektorů v GC**

	TCD	FID	ECD	MS
Selektivita	univerzální	selektivní	selektivní	specifický
Destruktivní	ne	ano	ne	ano
Citlivý	středně	velmi	středně	velmi
Nosný plyn	helium	helium, dusík	dusík	helium
Vhodné pro látky	látky lišící se tepelnou vodivostí od mobilní fáze	uhlovodíky	halogenderiváty, nitroderiváty	převážně organické sloučeniny

Převzato z: *Basic gas chromatography* [10], *Moderní analytické metody* [11], *Laboratoř hmotnostní spektrometrie* [13], vlastní zpracování

Detektor dále předává informaci o přijatém signálu vyhodnocovacímu zařízení, které již během analýzy na základě těchto údajů sestruje kontinuální záznam s jednotlivými píky separovaných a detekovaných složek označovaný jako chromatogram.[11;14] Požadovaným výsledkem separace každé složky je ideální pík, který je co možná nejužší, s jedním vrcholem a symetrický po obou stranách.[10]

Důležitým krokem k dosažení co nejvyšší účinnosti separace je dosáhnout co nejvyšších hodnot chromatografického rozlišení. Při vyhodnocování chromatografických spekter je rozlišení používáno k vyjádření míry, do jaké jsou od sebe odděleny dva sousední píky.[10]

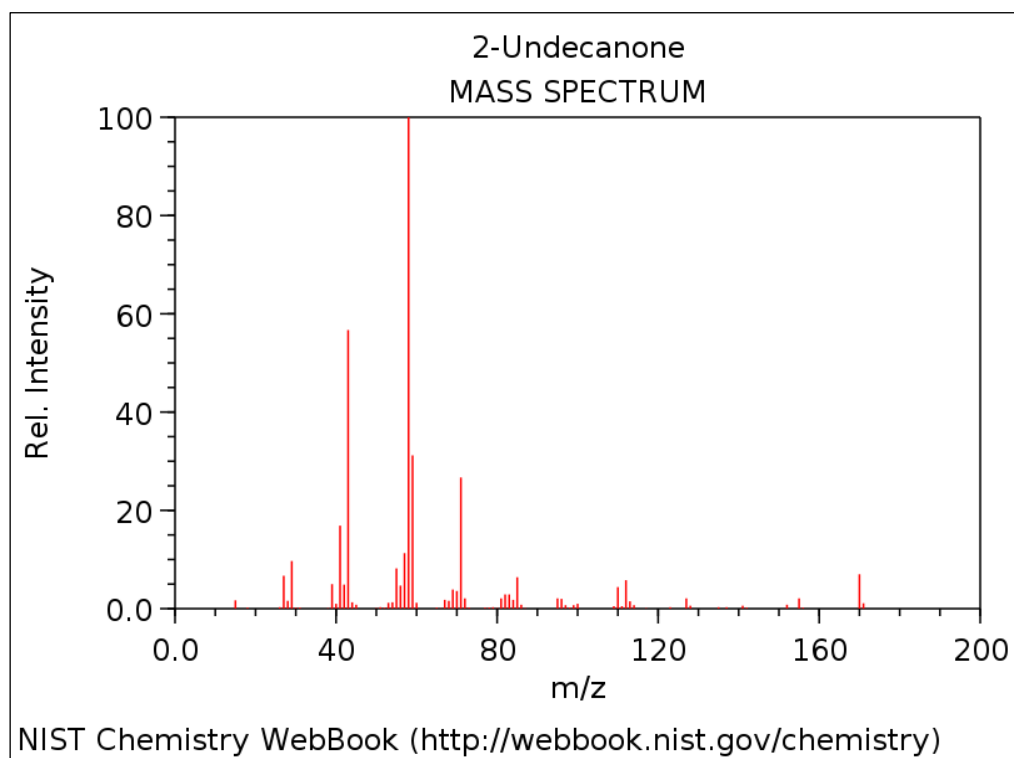
## 4. Hmotnostní spektrometrie

Metoda hmotnostní spektrometrie je jednou z běžně dostupných, velmi všestranných a hojně využívaných technik pro zkoumání organických látek v analytickém, farmaceutickém a v neposlední řadě potravinářském průmyslu.[13;16;17]

Spojení MS s GC je velmi kompatibilní.[10] Najde své využití v rámci kvantitativních analýz, během nichž se takto dá detekovat široká řada sloučenin, ale i analýz kvalitativních, kdy se jejich prostřednictvím stanovují molekulové hmotnosti či struktury separovaných látek na základě porovnání s databázemi hmotnostních spekter.[13]

Každý hmotnostní spektrometr se sestává z vakuového systému, který redukuje počet srážek letících částic, iontového zdroje, analyzátoru a detektoru.[14,18] Právě podle použitého analyzátoru se rozlišuje několik typů hmotnostních spektrometrů, mezi něž patří kvadrupólový, s iontovou pastí, magnetický a průletový[17], které jsou podrobněji popsány v Pododdíle 4.1.

MS nevyžadují nutně úplnou chromatografickou separaci stanovovaných látek ve směsi, neboť je každá sloučenina ionizována a její signál je zaznamenáván pomocí poměru hmotnosti a náboje.[16] Nabité částice, vznikající ionizací v hmotnostním spektrometru z neutrálních molekul separovaného vzorku, se pak dělí podle  $m/z$  a až poté jsou detekovány v podobě hmotnostních spekter.[13] Hmotnostní spektrum látky představuje závislost četnosti detekovaných fragmentů molekuly na jejich poměru hmotnosti a náboje.[10] Na Obr. 4 (str. 22) je vyobrazeno hmotnostní spektrum 2-undekanonu.



**Obr. 4: digitalizované hmotnostní spektrum 2-undekanonu**

Červené čáry představují relativní zastoupení konkrétních molekulárních iontů o určité hodnotě  $m/z$ , charakteristických pro danou látku. Iont s nejvyšším zastoupením (v tomto případě  $m/z = 58$ ) se označuje jako základní pík a je mu datovým systémem připsána hodnota 100 %. Podle tohoto iontu se odvozují píky ostatních přítomných iontů.[10]

Převzato z: *NIST Chemistry WebBook* [9], dostupné z:

<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Spec=C112129&Index=0&Type=Mass&Large=on> (13.8.2017)

Přestože není úplné chromatografické rozdělení látek nutné, musí být nějakým způsobem definována sada iontů, která bude použita k určení kvantity a následnému potvrzení identity sloučeniny. Tato sada se skládá z různých komponentů za účelem dostatečného signálu detektoru (tzn. snížení mezi kvantifikace analytické metody), zároveň ale musí být zabráněno izobarickým interferencím, což je stav, při kterém má více prvků stejný  $m/z$ . [16,18] Největší vliv mají ve směsi ionty, které mají nejvyšší četnost ve fragmentovaném vzorku.[16]

Způsob detekce látek z hmotnostních spektrometrů může probíhat několika způsoby. První je pomocí tzv. Faradayova poháru. Signál se zde zaznamenává změnou napětí na elektrodách úměrnou počtu iontů, které na elektrody dopadnou. Dalším způsobem detekce jsou elektronové násobiče založené na principu vyrážení elektronů z elektrod

po dopadu iontu. Elektrony se postupně zesilují díky soupravě dynod, a tak je na konci tohoto procesu poskytnut dostatečný měřitelný signál.[18]

#### 4.1 Typy hmotnostních analyzátorů

Prvními používanými hmotnostními analyzátorů, které se začaly používat při analýzách, byly **spektrometry magnetické**. Poskytují vysoce reprodukovatelné výsledky a zároveň mají vysoké rozlišení i citlivost.[17] Fungují na principu zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém poli.[14]

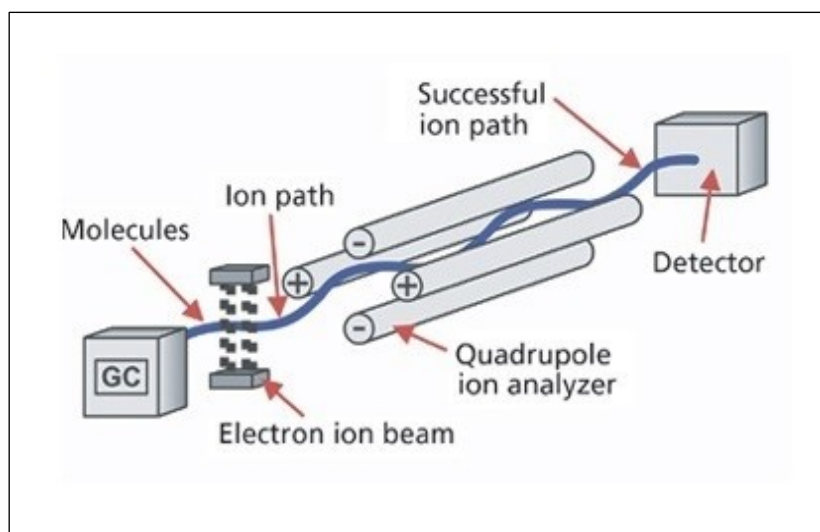
Spektrometry **s iontovou pastí** jsou výhodné pro svou selektivitu, čehož se využívá pro analýzu směsí.[17] K analýze iontů dochází ve stejném prostoru, ve kterém jsou látky ionizovány, zachycením na elektrodách pomocí vloženého napětí.[11;14] Tyto detektory snižují detekční limity a poskytují informace o strukturách analyzovaných látek, čehož je využíváno zejména ve forenzní a farmaceutické oblasti.[17]

**Průletové analyzátorů** jsou nejnovější a také nejnákladnější technologií ve spojení s plynovou chromatografií. Výhodné jsou zvláště z důvodu urychlení analýz a mají nejvyšší hmotnostní rozsah za všech hmotnostních analyzátorů.[17] Pracují na principu měření doby, za kterou dokážou ionty s různým  $m/z$  překonat určitou vzdálenost, proto se také označují jako time-of-flight (TOF) analyzátorů.[14]

V praxi jsou ale nejvíce využívané hmotnostní **spektrometry kvadrupólové** díky své jednoduchosti, cenové dostupnosti, schopnosti provádět kvantitativní i kvalitativní analýzu zároveň a širokému spektru využití pro rutinní analýzy, nejčastěji ve spojení se separačními technikami HPLC a GC.[14;17] Nicméně poptávka po ostatních typech hmotnostních analyzátorů stoupá s cílem dosáhnout nižších detekčních limitů a vyšších rozlišovacích schopností.[17]

##### 4.1.1 Kvadrupólový analyzátor

Tento druh analyzátorů tvoří 4 identické kovové elektrody s kruhovým průřezem poskládané rovnoběžně vedle sebe do čtverce (Obr. 5, str. 24). Délka těchto elektrod se pohybuje okolo 20 – 30 cm. Během analýzy je na první dvě diagonální tyče vloženo stejnosměrné napětí kladné, na druhé dvě diagonální stejnosměrné napětí záporné.[14]



**Obr. 5: schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru**

Molekuly separované pomocí GC postupně přicházejí do MS. Proud těchto molekul je nejdříve ionizován pomocí iontového zdroje, poté jsou tyto ionty přivedeny do osy kvadrupólu, kde začnou oscilovat důsledkem elektrického pole. Pouze ionty o určité hodnotě  $m/z$  projdou skrz osu tyčí k detektoru, kde je zaznamenávána jejich četnost. Průchod iontů analyzátozem zajišťuje vakuum, které je realizováno vakuovým systémem (není vyobrazen).[14]

Převzato z: <http://www.chromatographyonline.com/comparing-capabilities-time-flight-and-quadrupole-mass-spectrometers-0> (11.8.2017), vlastní úprava

Kvadrupólové analyzátozem se řadí mezi dynamické analyzátozem a dělí ionty na základě hýbání s parametry elektrického pole.[18] Ion po vletu do prostoru mezi elektrodami kvadrupólu začne oscilovat. Jen ionty s určitou hodnotou  $m/z$  dosáhnou pro nastavenou hodnotu stejnosměrného napětí  $U$  a amplitudy střídavého napětí  $U_m$  stabilních oscilací a projdou skrz kvadrupól až k detektoru jako je tomu na Obr. 5.[14]

Ostatní ionty za těchto podmínek až příliš oscilují v elektrickém poli mezi elektrodami a k detektoru neprojdou do doby, než se změni hodnoty napětí, nebo amplitudy, přičemž poměr těchto dvou veličin zůstává stejný. Snížením poměru  $U/V$  sice lze docílit zvýšení hmotnostního rozsahu pro ionty, které projdou analyzátozem, avšak dojde zároveň ke snížení rozlišení. To v porovnání s ostatními hmotnostními analyzátozem není příliš vysoké - spektra vykazují relativně nízkou rozlišovací schopnost, tzn. že dojde k rozlišení iontů, které mají alespoň o jednotku různý  $m/z$ . [14]

### **Trojité kvadrupólový analyzátor**

Tento analyzátor se skládá ze tří kvadrupólových analyzátorů umístěných v řadě za sebou, z čehož prostřední funguje jako kolizní cela. Kolizní cela má zavedené střídavé napětí a přívod kolizního plynu (nejčastěji argonu či dusíku), který způsobuje srážky s ionty přiváděnými z prvního kvadrupólu. Po srážce iontu s atomem plynu dojde ke kolizním aktivacím, které mohou za rozštěpení tohoto iontu na menší ionty fragmentové, které jsou pak analyzovány ve třetím kvadrupólu stejným principem podle svého  $m/z$ . [14]

Trojité kvadrupólový analyzátor významně redukuje molekulární interference díky srážkám v kolizní cele a zvyšuje rozlišení při analýze eliminací tzv. izobarických interferencí u prvků se shodným  $m/z$ . [18]

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Chemikálie, materiály, přístroje

#### Chemikálie

vzorek chmele odrůdy *Kazbek* (granule typ 90), *Agnus*, *Žatecký poloraný červeňák*

standardy

- vnitřní standard 3-hepten-1-ol o koncentraci zásobního roztoku 23,58 g/l (připravený 2.4.2017)
- standardní roztoky
  - *silice B, C, D, S1, S2* (připravené 24.2.2017)
  - *silice ZR1 a ZR2* (připravené 2.4.2017)koncentrace a složení těchto standardních roztoků silic jsou vypsány v Tabulce 3 (str. 28)
- $\beta$ -karyofylen, 4-terpineol, methylheptanoát, methyldekanoát, 2-undekanon

Všechny základní standardní roztoky silic pocházejí od Sigma-Aldrich, Česká republika a jejich čistota je  $\geq 96,0\%$ , GC.

ethanol 96% p.a. (Lach-ner, Česká republika)

dichlormethan (Merck, Německo)

*n*-hexan (Merck, Německo)

síran sodný bezvodý p.a. (Lach-ner, Česká republika)

destilovaná voda

### **Materiál**

50ml odměrný válec

50ml odměrné baňky se zábrusem, A

pipety – dělené 1ml, 5ml, 10ml, A

stříkačka Hamilton 25 $\mu$ l

extrakční PTFE filtry o průměru 47 mm s velikostí pórů 10  $\mu$ m

kolonky EXTrelut NT 20 (Merck Millipore, USA)

kádinky

nálevka

míchadélko

kovová lžička

kapátko

vialky opatřené inzertem

kapilární kolona TG WAX MS (Thermo Scientific, USA) o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm, tloušťce filmu 0,25  $\mu$ m

### **Přístroje a programy**

mlýnek Bosch

předvážky (Mettler Toledo, Švýcarsko), analytická váha (AND, Japonsko)

extraktor fexIKA vario kontrol (IKA-WERKE GmbH)

- IKAMAG – RET kontrol
- chladicí + topný blok KH 135.2
- skleněná sada GF 260
- stojan + kontroler KHS 1
- distributor G 700
- teplotní čidlo PT 100.52

software Labworldsoft 4.7

oběhový chladič Julabo FL 601 (GmbH)

plynový chromatograf-MS: Trace GC Ultra- DSQ II (Thermo Scientific, USA)  
s datovým systémem Xcalibur (GC-MS) (Thermo), databáze NIST MS Search 20

## 5.2 Pracovní postup

### 5.2.1 Příprava standardních roztoků

#### 1. sada

Koncentrace a složení základních roztoků přidávaných k referenčnímu vzorku chmele jsou vyneseny v Tabulce 3. Objem nadávkovaných standardů činil pro roztoky *silice B, C, D, S1* a *S2* 1 ml, pro *silice ZR1* a *ZR2* 0,1 ml. Silice  $\beta$ -trans-ocimen, caren a alloocimen jsou látky z jednoho standardu.

**Tab. 3: Zastoupení a koncentrace různých silic ve standardních roztocích**

Silice	Koncentrace silic v základních roztocích			Silice	
	<i>ZR1</i>	<i>silice*</i> mg/l			<i>ZR2</i>
$\alpha$ -pinen	1074		100	984	Isobutylisobutyryát
$\beta$ -pinen	1090	100		984	Methylhexanoát
Myrcen	916	100		962	Isoamylisobutyryát
Limonen	1060	100	100	934	$\beta$ -trans-ocimen, caren, alloocimen
Methylheptanoát	994	100		972	2-nonanon
Linalool	970			1 106	Methyloktanoát
4-terpineol	1106	100		1 082	Methylnonanoát
$\beta$ -karyofylen	1036		100	912	2-dekanon
$\beta$ -farnesen	930		100	1136	Methyldekanoát
$\alpha$ -humulen	910	100	100	952	2-undekanon
$\alpha$ -terpineol	900	100		1038	Methylgeranát (1 a 2)
Nerol	1060	100		952	2-dodekanon
$\alpha$ -ionon	1132		100	936	Geranylacetát
$\beta$ -ionon	886	100	100	1102	2-tridekanon
$\alpha$ -iron	1196		100		
$\beta$ -karyofylelenepoxid	800				
Farnesol (1 a 2)	928				

\* **B C D S1 S2** , pouze orientační koncentrace

## 2. sada

Pro porovnání výtěžností a sledování vlivu složení směsí na separaci iontů bylo připraveno dalších 5 standardních roztoků  $\beta$ -karyofylenu, 4-terpineolu, methylheptanoátu, methyldekanoátu a 2-undekanonu (připravené 25.4.2017).

Příprava probíhala umístěním 50ml odměrné baňky na analytické váhy, zvážením a zapsáním hmotnosti jedné kapky standardu silice firmy Sigma-Aldrich. Objem byl následovně doplněn po rysku připraveným roztokem dichlormethanu a *n*-hexanu (dále jen DCM $\times$ hexan) v poměru 1:1 *v/v* a postup zopakován se zbylými 4 standardy. Koncentrace vyrobených standardních roztoků pro jednotlivé látky v zápětí činila:  $\beta$ -karyofylen ( $c = 376$  mg/l), 4-terpineol ( $c = 578$  mg/l), methylheptanoát ( $c = 644$  mg/l), methyldekanoát ( $c = 242$  mg/l), 2-undekanon ( $c = 506$  mg/l).

Objem takto připravených standardů aplikovaných na referenční vzorek činil 1 ml. Dále byl zvýšen přidavek standardního roztoku *ZRI* k referenci na 0,25 a 0,5 ml.

Příprava vzorku k extrakci počínala namletím chmelových pelet typu 90 odrůdy *Kazbek*. Po namletí byly do každé kondenzační trubice na extrakční filtr naváženy 2,00 g prášku. Dalším krokem bylo přidání 10  $\mu$ l vnitřního standardu 3-hepten-1-olu o koncentraci 23,58 g/l a patřičného množství konkrétního standardního roztoku.

### 5.2.2 Průběh extrakce

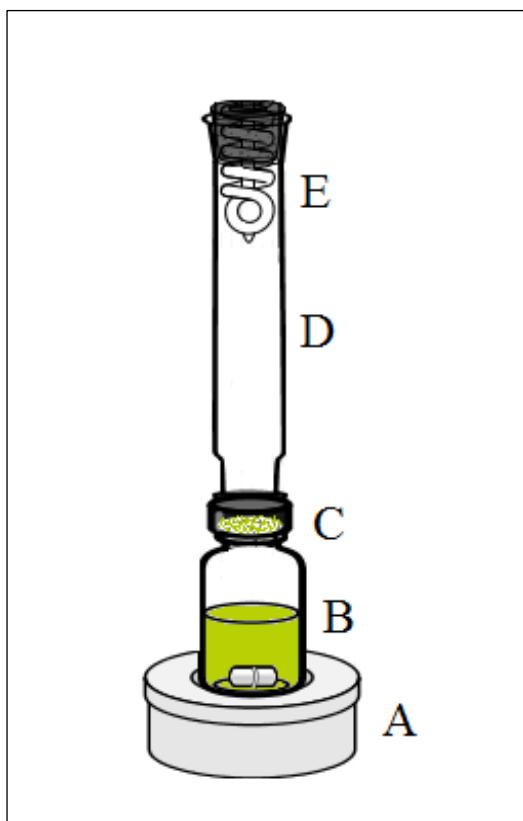
Kondenzační trubice se vzorkem byla našroubována ke spodní nádobě naplněné zhruba 40 ml 96% roztoku bezvodého ethanolu a míchadlem a z vrchu utěsněna kondenzačním zařízením. Takto sestrojená aparatura (Obr. 6, str. 30) byla připravena k extrakci vzorku silic pomocí extraktoru fexIKA vario kontrol (IKA-WERKE GmbH) napojeného na chladič Julabo FL 601 (GmbH).

Proces extrakce se pro co nejučinnější převedení silic do rozpouštědla opakoval ve formě 4 cyklů; extrakční čas pro první cyklus 7 minut, následující cykly již po 6 minutách. Cílová teplota topného bloku byla nastavena na jedenapůlnásobek bodu varu rozpouštědla, pro ethanol byla tato hodnota 117°C. Teplota chlazení mezi cykly činila 60°C, čekací doba po ochlazení bloku byla 1 minuta. Po posledním cyklu se směs ochladila na 40°C. Celý průběh byl kontrolován a zaznamenáván softwarem Labworldsoft 4.7.

### Průběh metody

Během ohřívání spodní nádoby začnou skrz vzorek prostupovat páry, které jsou následně kondenzovány na vrchu kondenzační trubice. Kondenzovaný ethanol je vlivem vyššího tlaku par ve spodní nádobě zadržován na filtru se vzorkem chmele a dochází

k míšení se vzorkem díky dalším postupujícím parám. Po ochlazení spodní nádoby klesne tlak ethanolových par a ethanol obohacený o analyty steče zpět do nádoby (Obr. 6). Po ukončení extrakce byl extrakt kvantitativně převeden do 50ml skleněné odměrné baňky se zátkou a objem doplněn po rysku 96% ethanolom.



**Obr. 6:** Schéma aparatury pro extrakci pomocí fluidního ethanolového lože

A- zařízení pro ohřev; B – nádoba s ethanolom a míchadlem; C – exktrakční filtr se vzorkem;  
D – kondenzační trubice; E – chladicí zařízení

Vytvořeno pomocí programu ChemDoodle verze 8.1.0 dostupného z: <https://www.chemdoodle.com/>,  
vlastní úprava

### 5.2.3 Přečištění extraktu

Ethanolové extrakty byly přečištěny a nakoncentrovány pomocí kolon EXTrelnut NT 20 pro extrakci lipofilních sloučenin z vodných roztoků. Kolona se nejdříve zvlhčila po dobu 15 minut přidavkem 10 ml destilované vody. Dále bylo na kolonku rovnoměrně nanášeno 5,0 ml extraktu a ponecháno 5 minut vsáknout. Extrahováno bylo 5×5 ml připraveného roztoku DCM×hexan, s dávkováním po 5 minutách.

Do kádínek bylo získáno přibližně 10 ml eluátu, ke kterému bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného pro odstranění vlhkosti. Eluát byl nadávkován do insertu vialek, uzavřen víčkem s teflonovým septem a v případě potřeby uchován v mrazáku do doby chromatografické analýzy.

### 5.2.4 Chromatografická analýza

K chromatografické analýze bylo využito kalibračních roztoků *K1*, *K2*, *K3* a *K4* připravených do 50ml baňky. Kalibrační roztoky byly vyrobeny z roztoku vnitřního standardu o koncentraci přibližně 1000 mg/l, zásobních roztoků *ZR1* a *ZR2* o koncentracích přibližně 1000 mg/l a objem doplněn DCM×hexan po rysku (Tabulka 4). Přídavek vnitřního standardu 3-hepten-1-olu byl do všech kalibračních roztoků stejný, a to 500 µl.

**Tab. 4: Složení kalibračních roztoků pro chromatografickou analýzu**

Přídavek	<i>IS</i> µl	<i>ZR1</i> ml	<i>ZR2</i> ml
<b><i>K1</i></b>	500	0,05	0,05
<b><i>K2</i></b>	500	0,50	0,50
<b><i>K3</i></b>	500	2,50	2,50
<b><i>K4</i></b>	500	5,00	5,00

### Podmínky GC-MS

Nosný plyn He o čistotě 5.0 s průtokem 1,2 ml/min;

Dávkování splitless, doba otevření děliče 1 minuta s celkovým průtokem 50 ml/min, teplota vstřikování a transfer line 250°C, objem nástřiku 1 µl;

Přístroj Trace GC Ultra DSQ II;

Kolona kapilární TG WAX MS, mírně polární; teplota nastavena na přechod ze 45 °C po 2 minutách na 100 °C rychlostí 10 °C/min a dále zvýšena na 230 °C rychlostí 15 °C/min a konečnou dobou trvání 6 minut;

MS detektor: zdroj vyhříván na 200°C.

Sběr dat byl prováděn systémem Xcalibur (GC-MS), ve kterém byla následně metodou vnitřního standardu vyhodnocena spektra a zaznamenány naměřené hodnoty.

### 5.3 Vyhodnocení

Prostřednictvím systému Xcalibur byly identifikovány analyzované látky a vyhodnoceno jejich kvantitativní zastoupení ve vzorku. Identifikaci silic bylo použito přibližných retenčních časů, které jsou vyneseny v Tabulce 5. Obsah konkrétních silic byl programem spočítán na základě vztahu mezi množstvím eluované látky a plochou píku z kalibrační křivky vnitřního standardu. Chromatografický záznam vzorku *Kazbek* (Obr. 7) je zobrazen na straně 34.

**Tab. 5: Přibližné retenční časy analyzovaných látek**

Silice	Retenční časy		Silice
	min		
$\alpha$ -pinen	4,17	11,21	2-undekanon
Isobutylisobutyřát	5,09	11,23	4-terpineol
$\beta$ -pinen	5,25	11,26	$\beta$ -karyofylen
Myrcen	6,04	11,48	Methylgeranát 1
Methylhexanoát	6,38	11,76	$\beta$ -farnesen
Isoamylisobutyřát	6,50	11,90	$\alpha$ -humulen
Limonen	6,55	12,03	Methylgeranát 2
$\beta$ -trans-ocimen	7,05	12,03	$\alpha$ -terpineol
Carene	7,30	12,12	2-dodekanon
Methylheptanoát	7,78	12,49	Geranylacetát
Alloocimen	8,87	12,82	Nerol
2-nonanon	9,07	12,95	2-tridekanon
Methyloktanoát	9,07	13,32	$\alpha$ -ionon
3-hepten-1-ol	10,02	13,97	$\beta$ -ionon
2-dekanon	10,18	14,04	$\alpha$ -iron
Methylnonanoát	10,18	14,30	$\beta$ -karyofylelenepoxid
Linalool	10,64	16,39	Farnesol 1
Methyldekanoát	11,17	16,59	Farnesol 2

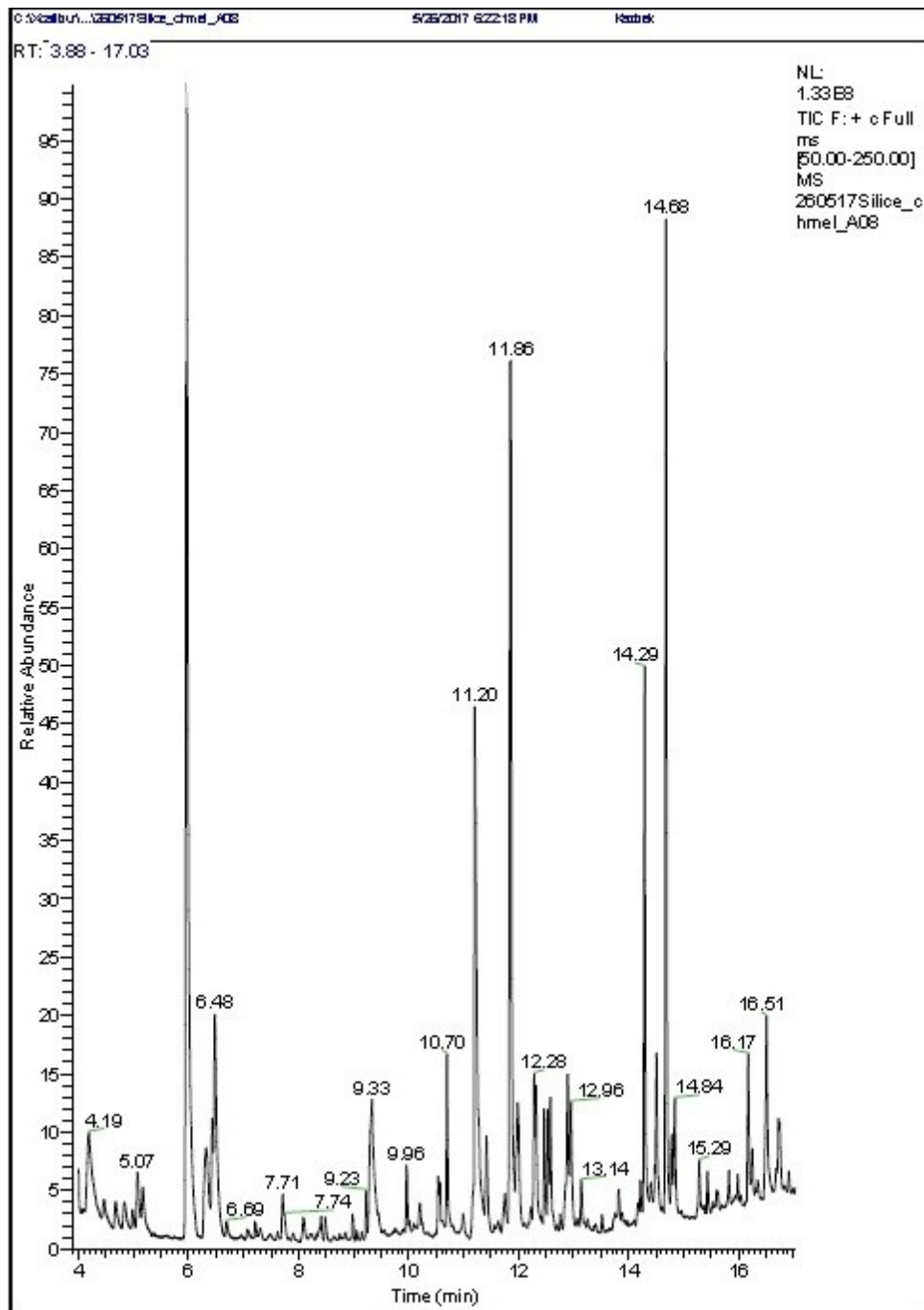
Programem vyhodnocené koncentrace eluovaných látek byly udány v mg/kg. Výtěžnost byla vypočítána na základě vztahu:

$$R = (c_{calc} - c_{ref})/c_{ad} \times 100 [\%],$$

kde  $R$  je výtěžnost,  $c_{calc}$  koncentrace složky po přidavku standardu,  $c_{ref}$  koncentrace složky bez standardu,  $c_{ad}$  množství přidavku standardu.

Opakovatelnost metody byla stanovena z několika opakovaných měření pomocí směrodatné odchylky určené z rozpětí hodnot těchto měření.

Dále byla pomocí regresní rovnice kalibrační přímky závislosti odezvy měřícího zařízení na koncentraci látky vypočítána mez detekce a mez stanovení.



**Obr. 7: Chromatografický záznam vzorku chmele odrůdy Kazbek**

Záznam je sestaven na základě relativního zastoupení látek oproti látce v nadbytku a tvoří tzv. základní pík. V tomto případě čerstvého chmele jde o myrcen (RT = 6,04 min). Dalšími významnými složkami jsou  $\alpha$ -humulen (RT = 11,86 min),  $\beta$ -karyofylenepoxid (RT = 14,29 min),  $\beta$ -karyofylen (RT = 11,20 min).

## 6. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Stanovení výtěžnosti metody

Výtěžnost jednotlivých látek byla spočítána vztahem pro výpočet výtěžnosti. Níže je na příkladu s přidavkem 0,25 ml standardního roztoku *ZRI* ke vzorku chmele demonstrován postup výpočtu výtěžnosti  $\alpha$ -humulenu:

$$c_{calc} = 121,49 \text{ mg/kg}$$

$$c_{ref} = 10,93 \text{ mg/kg}$$

$$m_{ad} = 227,50 \text{ } \mu\text{g}$$

naměřená koncentrace přidavku:

$$121,49 - 10,93 = 110,56 \text{ [mg/kg} = \mu\text{g/g]}$$

koncentrace přidavku vztažená na 2 g chmele:

$$110,56 \text{ } \mu\text{g/g} \dots\dots\dots 1 \text{ g chmele}$$

$$x \text{ } \mu\text{g/g} \dots\dots\dots 2 \text{ g chmele}$$

$$x = 221,12 \text{ } \mu\text{g}$$

výtěžnost:

$$R = 221,12 \text{ } \mu\text{g} / 227,50 \text{ } \mu\text{g} \times 100 \%$$

$$\mathbf{R = 97,20 \%}$$

Tímto způsobem byly dopočítány výtěžnosti ostatních silic ve všech roztocích a statisticky zpracovány (Tabulka 6, str. 38). Lze si všimnout, že některé výtěžnosti nedosahují, či přesahují interval ideálních výtěžností 89 – 103 %.

Mez opakovatelnosti byla stanovena v intervalu 0,25 – 2,90 % rel.

Meze detekce a stanovení byly spočítány pro poměr signálu a šumu S/N = 3/1.

Mez detekce byla vypočítána na 0,10 mg/kg vzorku.

Mez stanovitelnosti byla stanovena na 0,33 mg/kg vzorku.

## 6.2 Porovnání výtěžností na základě chemické struktury silic

Vypočítané výtěžnosti pro konkrétní silice byly mezi sebou porovnány, přičemž bylo zjištěno, že uhlovodíky mají obecně nižší výtěžnosti než kyslíkaté látky (Tabulka 6, str. 38).

Na snadě je vysvětlení, že se působením fyzikálních vlivů u extrahovaných látek urychluje chemická přeměna a katalyzují jejich vzájemné reakce. Nejen působení zvýšených teplot, ale také zvýšený tlak během extrakce může mít dopad na výsledné složení extraktu.[3]

### 6.2.1 Chemické přeměny

Mezi nejčastější chemické přeměny patří oxidace, během níž se mění jedna molekula na druhou navázáním kyslíkaté skupiny. Častá je tato reakce nejen vlivem zvýšených teplot a tlaků, ale také během stárnutí chmele (Pododdíl 6.3.1). Nenasycené uhlovodíky mají tendenci se autooxidovat. Tento jev se běžně vyskytuje u myrcenu, což by bylo jedno z vysvětlení jeho nízké výtěžnosti (Pododdíl 6.2.2).

Jinými chemickými přeměnami jsou izomerace, v jejichž průběhu dochází buď k rozvětvení uhlíkatých řetězců, či změně polohy násobné vazby. Tyto reakce bývají katalyzovány kyselinami, které však chmel také obsahuje [7], takže tyto přeměny nelze vyloučit. Běžně se vyskytujícím příkladem je cis/trans-izomerace geraniolu na nerol (Obr 1, str. 14).[7]

Neopomenutelnou přeměnou molekul je otevírání a uzavírání cyklu. Kruh může nejčastěji vzniknout oxidací uhlovodíků na epoxidy, čehož je příkladem  $\alpha$ -humulen se svými oxidačními produkty běžně se vyskytujícími v pivu, nebo zacyklením acyklických sloučenin obsahujících násobné vazby. Je možné, že se tomu tak děje ku příkladu u nerolu zacyklením na  $\alpha$ -terpineol. Otvírat se pak může epoxid na dioly, nebo například konkrétně  $\alpha$ -terpineol dehydratací na limonen, který je prekurzorem pro pineny.[7]

Kromě hojně se vyskytujících chemických přeměn mohl stát za dalšími možnými chybami v měření nedostatečný počet měření či nepečlivé zacházení s připravenými standardy. U výtěžností vyšších než 100 % je jednou z možností cizí znečištění, například nedokonale umyté chemické sklo. U výtěžností podstatně nižších naopak mohlo dojít ke značným ztrátám těkavých složek v průběhu extrakce a přečištění na sloupci křemeliny.

### 6.2.2 Souvislost chemické struktury s výtěžnostmi vybraných zástupců

Jak si lze všimnout, uhlovodíky se pohybují v horní části Tabulky 6, což znamená, že žádný ze stanovovaných uhlovodíků nepřekročil svou výtěžností validovaný interval. Naopak kyslíkaté složky chmelových silic zabírají celou spodní část Tabulky 6 s velmi vysokými výtěžnostmi, ale vyskytují se i v horní části Tabulky 6 jako jedny s nejnižší výtěžností, jejich rozptyl je tedy velmi široký.

Tab. 6: Výtěžnosti jednotlivých silic s přihlédnutím na jejich chemickou povahu

UHLOVODÍKY			KYSLÍKATÉ SLOUČENINY		
2-dekanon 60,25%	methyldekanoát 66,74%	alloocimen 69,61%	myrcen 70,52%	isobutylisobutyryát 73,40%	isoamylisobutyryát 77,54%
$\beta$ -farnesen 79,20%	limonen 80,84%	$\beta$ -pinen 81,37%	$\alpha$ -pinen 83,15%	2-undekanon 86,00%	$\beta$ -karyofylen 89,46%
methylgeranát2 89,85%	$\beta$ -trans-ocimen 90,06%	2-nonanon 90,77%	linalol 92,08%	methylgeranát1 92,51%	carene 94,32%
$\alpha$ -terpineol 96,42%	$\alpha$ -humulen 96,90%	$\alpha$ -iron 97,31%	nerol 98,00%	methylnonanoát 100,74%	$\alpha$ -ionon 101,47%
methylheptanoát 103,15%	4-terpineol 105,60%	2-tridekanon 112,78%	methylhexanoát 112,91%	farnesol2 116,33%	methyloktanoát 116,41%
$\beta$ -ionon 116,44%	farnesol1 124,67%	2-dodekanon 130,92%	geranylacetát 131,14%	$\beta$ -karyofylenepoxid 138,05%	

Údaje pro tuto tabulku byly získány statistickým zpracováním výtěžností vypočtených pro každou silici zvlášť.

Shodu s validovanou výtěžností metody poskytují látky počínaje  $\beta$ -karyofylenem, methylgeranátem 2,  $\beta$ -trans-ocimenem, 2-nonanonem, přes linolol, methylgeranát 1, carene (izomer ocimenu),  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -humulen,  $\alpha$ -iron, nerol, až po methylnonanoát a  $\alpha$ -ionon, lze do intervalu zařadit ještě methylheptanoát.

#### Látky o nízké výtěžnosti

Podstatně nižších výtěžností vykazovaly 2-dekanon, methyldekanoát, alloocimen, myrcen, isobutylisobutyryát, isoamylisobutyryát a  $\beta$ -farnesen.

U 2-dekanonu mohla být takto velmi nízká výtěžnost způsobena mírnou chybou v měření v kombinaci s nízkým počtem měření. Vzhledem k tomu, že ostatní kyslíkaté látky, v tomto případě ketony, s podobnou chemickou strukturou (2-undodekanon, 2-dodekanon, 2-tridekanon) mají většinou výrazně vyšší výtěžnosti, nepřikládá se důležitost úbytku této látky, který byl zapříčiněn chemickými přeměnami. Obdobná situace nastala i u methyldekanoátu, který patří do skupiny esterů, mající podle

výsledků měření výrazně vyšší výtěžnosti (methyloktanoát, methylheptanoát, methylhexanoát).

Podstatně zajímavějšími látkami jsou alloocimen (trien) a myrcen (dien), které si jsou podobné svými strukturami, jelikož jde o silice patřící do třídy uhlovodíků. Stejně jako  $\alpha$ -humulen,  $\beta$ -karyofylen,  $\beta$ -farnesen, a pineny jsou i ocimeny a myrcen těkavé látky [1], které, zejména v souvislosti se stárnutím chmele (Pododdíl 6.3.1), často podléhají autooxidaci.

Myrcen svou nízkou výtěžností 70,52 % jen potvrzuje, že jeho značná část mohla být během analýzy, stejně tak jako během vaření piva, přeměněna na produkty oxidace. Z Obr. 1 (str. 14) je patrná chemická podobnost mezi myrcenem a jeho oxidačními produkty linalolem a nerolem.[7] Lze si povšimnout, že oxidace probíhá na dvojně vazbě.

Isobutylisobutyráty i isoamylisobutyráty patří do skupiny esterů a také vykazovaly výtěžnosti nižší než 89 %. Na rozdíl od methyldekanoátu je zde přítomná isobutylová či isoamyllová skupina, která také může podléhat výše zmíněné autooxidaci [7], a tím snižovat celkové zastoupení těchto dvou silic ve vzorku.

### **Látky o vysoké výtěžnosti**

Naopak velmi vysoké hodnoty byly zjištěny u  $\beta$ -karyofylenepoxidu, geranylacetátu, 2-dodekanonu, obou izomerů farnesolu,  $\beta$ -iononu a methyloktanoátu.

Silice o vůbec nejvyšší výtěžnosti 138,05 %  $\beta$ -karyofylenepoxid patří mezi epoxidy, jak již z názvu vyplývá, a je strukturně spojen s  $\alpha$ -humulenem (Obr. 1, str. 14). Nejenže je  $\alpha$ -humulen izomerem  $\beta$ -karyofylenu [3], ale  $\beta$ -karyofylenepoxid je jedním z jeho autooxidačních produktů, které lze mimo jiné nalézt po vaření v pivu [7], a jejichž koncentrace se pravděpodobně během extrakce a vlivem stárnutí chmele zvyšuje (Pododdíl 6.3.1).

Izomery farnesolu a  $\beta$ -ionon patří do skupiny alkoholů a svými výtěžnostmi také přesahují horní hranici 103 %. U těchto sloučenin je možné navýšení důsledkem jejich vzniku během působení zvýšených teplot a tlaku oxidací z uhlovodíků.

## **6.3 Porovnání výtěžků různých odrůd chmele s literaturou**

Pro toto porovnání byli vybráni 3 zástupci českých odrůd chmele – nejvýznamnější česká odrůda *Žatecký poloraný červeňák*, *Agnus* s relativně vysokým obsahem silic a *Kazbek*, který posloužil jako referenční vzorek při výpočtu výtěžnosti silic metodou extrakce na fluidním ethanolovém loži. Hodnoty naměřené pomocí GC-MS na celé

hmotnostní spektrum byly pomocí stanovených výtěžností přepočítány na hmotnostní zastoupení ve vzorku chmele a porovnávány s *Atlasem českých odrůd chmele* [6], který poskytuje pouze relativní zastoupení silic ve chmelu. Údaje jsou z roku 2012, takže musely být získány odlišnou metodou extrakce silic, což může hrát svou roli v celkovém zastoupení.

Zpří pohledu na Tabulku 7 je patrné, že naměřené hodnoty odrůdy *Agnus* lépe korespondují s *Atlasem chmele* [6] než odrůda *Žatecký poloraný červeňák*. Jedním z důvodů jsou širší intervaly zastoupení silic. Naměřené hodnoty, které jsou mimo vymezený interval stanovený literaturou v řádu jednotek či desítek (např.  $\alpha$ -humulen a 2-undekanon u *Žateckého červeňáku*), byly vyhodnoceny jako málo odchylené a velmi blízké, lze je tedy považovat za relevantní.

**Tab. 7: Porovnání zastoupení silic v odrůdách *Agnus* a *Žatecký poloraný červeňák* s *Atlasem českých odrůd chmele* [6]**

Silice	AGNUS		ŽATECKÝ ČERVENĚÁK	
	<i>Atlas chmele</i> [6] mg/kg	měření	<i>Atlas chmele</i> [6] mg/kg	měření
<b>Celkové silice</b>	<b>20000 – 30000</b>		<b>4000 – 8000</b>	
$\beta$ -farnesen	< 300	6,97	560 – 1600	289,51
$\alpha$ -humulen	3000 – 7500	1264,20	600 – 2400	586,53
$\beta$ -karyofylen	1800 – 4500	829,82	240 – 720	157,87
Limonen	30 – 90	75,80	4 – 16	23,99
Myrcen	8000 – 16500	4997,69	1000 – 3200	2044,77
$\alpha$ -pinen, $\beta$ -pinen	120 – 360	349,19	16 – 64	78,57
Linalol	60 – 150	135,58	16 – 48	26,63
2-undekanon	60 – 210	158,72	20 – 72	88,65
Isoamylisobutyryát	100 – 300	559,23	< 0,8	1,39
Isobutylisobutyryát	10 – 45	98,99	< 0,8	1,95

Zeleně zvýrazněné hodnoty zapadají do vymezeného intervalu; růžově zvýrazněné hodnoty horní hranici tohoto intervalu přesahují

### *Agnus*

U odrůdy *Agnus* naměřené hodnoty většinou zapadají do zdrojových dat. Je pozorovatelné pouze nízké zastoupení uhlovodíkových sloučenin. Důvody jsou vypsány již výše – největší podíl nese autooxidace probíhající na násobných vazbách, přechod na epoxidy a alkoholy, které lze po vaření možno nalézt i v pivu.

### **Žatecký poloraný červeňák**

Červeňák se již obsahy silic značně liší od *Atlasu chmele* [6]. Stejně jako v případě *Agnusu*, ani zde majoritní uhlovodíky nedosahují spodní hranice intervalu. Výjimkou je pouze myrcen, který i přes své charakteristicky nízké zastoupení v této odrůdě leží svým obsahem přibližně uprostřed.

U 2-undekanonu nejsou jeho vysoké hodnoty překvapením, neboť se obecně jeví jako relativně stálá látka. Toto tvrzení dokazuje i jeho zastoupení korespondující se zdrojem [6] i v případě ostatních odrůd chmele (Tabulka 7, str. 40; Tabulka 8, str. 42), bez ohledu na stáří těchto vzorků.

Stejně tak jako 2-undekanon i většina silic je svým obsahem spíše nad vrchní hranicí stanoveného intervalu. Odchytky od vytyčených intervalů mohou být způsobeny odlišným stářím analyzovaného vzorku chmele a způsobem jeho uchování (vysvětlení poklesu zejména u  $\alpha$ -humulenu a  $\beta$ -karyofylenu), odlišnou metodou stanovení silic, která neposkytovala tak vysoké výtěžky, chemickými změnami probíhajícími během těchto extrakcí, či odlišnou vyhodnocovací metodou.

#### **6.3.1 Sledování vlivu stárnutí chmele na zastoupení silic ve vzorku**

Dopady stárnutí chmele na zastoupení jednotlivých silic ve vzorku byly sledovány na odrůdě *Kazbek*. V Tabulce 8 můžeme pozorovat velikost změny obsahu některých silic v závislosti na stáří chmele. Ač se stáří porovnávaných vzorků chmele liší pouze o rok – starý chmel je z roku 2015, nový chmel z roku 2016 – změny v obsahu silic jsou výrazné. V tomto případě se na rozdílných hodnotách značně podílí i další faktor, a tím jsou podmínky skladování. Zatímco chmelové pelety *Kazbeku* z roku 2015 byly skladovány v umělohmotném sáčku za laboratorní teploty a přístupu vzduchu i světla, vzorek z roku 2016 byl zabalen a uchováván v chladícím zařízení.

Hodnoty byly pro účely porovnání odečteny z chromatografického záznamu proměřením celého hmotnostního spektra GC-MS a přepočteny pomocí výtěžností.

Při dozrávání chmele se jako první objeví stopy kyslíkatých složek silic, poté cyklické seskviterpeny  $\alpha$ -humulen a  $\beta$ -karyofylen, jejichž různý poměr je klíčový při určování odrůdy chmele (jak si lze všimnout z Tabulky 7, str. 40 a Tabulky 8, str. 41), a teprve až pak se začíná formovat myrcen, jehož zastoupení udává zralost i stáří chmele.[7]

Již po krátké době se stárnutím chmele snižuje podíl těkavých uhlovodíků ve prospěch obsahu kyslíkatých sloučenin. Velmi časté jsou přechody  $\alpha$ -humulenu na své epoxidy či vznik alkoholů oxidací uhlovodíků.

Tab. 8: Zastoupení silic v různě starých vzorcích chmele odrůdy Kazbek

Silice	KAZBEK		
	Atlas chmele [6]	vzorek 2015	vzorek 2016
	mg/kg		
Celkové silice	<b>9000 – 18000</b>		
$\beta$ -farnesen	< 180	5,29	29,39
$\alpha$ -humulen	1800 – 6300	17,28	1065,09
$\beta$ -karyofylen	900 – 2700	9,00	678,10
Limonen	13,5 – 36,0	6,05	40,09
Myrcen	3600 – 9900	16,00	4484,11
$\alpha$ -pinen, $\beta$ -pinen	45 – 162	1,43	153,98
Linalol	27 – 90	11,57	56,32
2-undekanon	9 – 45	32,55	42,36
Isoamylisobutyryát	54 – 225	2,55	387,67
Isobutylisobutyryát	13,5 – 45,0	5,61	85,55

Zeleně zvýrazněné hodnoty zapadají do vymezeného intervalu; růžově zvýrazněné hodnoty horní hranici tohoto intervalu přesahují

Myrcen spolu s výše uvedenými seskviterpeny jsou hlavními nositeli chmelového aroma.[7] Postupem času úbývá těchto látek (Tabulka 8) a vzorek ztrácí svou charakteristickou vůni. Další výrazní nositelé aroma jsou kyslíkaté sloučeniny, nejčastěji jde o alkoholy a estery, obvykle se ale vyskytují ve chmelu v mnohem nižších koncentracích než uhlovodíky[7], takže jejich přínos v celkové kompozici je srovnatelný.

Vybrané silice uvedené v Tabulce 8 reprezentují celý soubor přítomných silic ve vzorku. Obecně vzato, stárnutím a špatným uchováváním chmele dochází k výraznému poklesu (v řádu stovek mg/kg chmel) všech silic, zaleží pouze na rychlosti, s jakou se ze vzorku vytrácejí či přeměňují. Pokles má pomalejší průběh u ketonů, v čele se zástupcem 2-undekanonem, u něž lze pozorovat pokles zhruba v rámci jednotek mg/kg chmele. Snížení zastoupení zaznamenal také  $\beta$ -karyofylenepoxid (není v tabulce), a to na polovinu, přestože existuje možnost, že během stárnutí přibýval. To znamená, že ne všechny analyzovaný  $\beta$ -karyofylenepoxid, stejně tak jako ostatní oxidační produkty uhlovodíků, musel být ve vzorku přítomen již od počátku. Zástupci čerstvějšího vzorku chmele jsou z velké většiny již ve shodě s intervalem vymezeným literaturou.

## 7. ZÁVĚR

V první části této práce byly shrnuty informace o chemické povaze silic a způsobech, kterými se dají stanovit a identifikovat. Experimentální část nastínila postup extrakce silic pomocí fluidního lože. Jde o relativně novou metodu, která spolehlivým a opakovatelným způsobem vede k získání výtěžků silic z chmele s co možná nejmenšími možnými ztrátami. Tato metoda mimo jiné vyniká i svou poměrně nízkou dobou trvání (v řádu několika desítek minut), její provoz není finančně náročný a je relativně bezpečná, protože není zapotřebí velkých množství toxických látek.

Výtěžnost každé silice ze vzorku byla spočítána z přídavek standardů o známých koncentracích k referenčnímu vzorku chmele odrůdy *Kazbek*. Byla zjištěna korelace mezi výtěžnostmi silic a jejich chemickými povahami. Uhlovodíky, reprezentující silice z cca 70 %, mají výtěžnosti obecně nižší v porovnání s kyslíkatými látkami, což je pravděpodobně dáno jejich nestálostí a chemickými přeměnami během extrakce. Tyto přeměny probíhají nejčastěji na dvojně vazbě uhlovodíků a ve většině případů jde o autooxidace na kyslíkaté látky, jejichž výtěžnost se v mnoha případech pohybuje okolo 100 %.

Dále bylo provedeno porovnání obsahů jednotlivých silic v různých odrůdách chmele s literárním zdrojem. Pro tento účel byl vybrán výše zmiňovaný *Kazbek*, *Agnus* a *Žatecký poloraný červeňák*. Největší shodu se zdrojem poskytoval právě vzorek *Kazbeku* ze sklizně 2016, který se neshodoval pouze sníženými hodnotami  $\alpha$ -humulenu a  $\beta$ -karyofylenu. Tyto izomerické seskviterpeny ochotně přecházejí na své epoxidy již po velmi krátké době od zpracování. U odrůdy *Agnus* byl také zaznamenán úbytek těchto dvou látek, navíc s myrcenem, který je hlavním nosičem aroma a ukazatelem staří chmele. Zastoupení silic v *Žateckém poloraném červeňáku*, který má co do obsahu silic jedny z nejnižších hodnot napříč různými odrůdami, ve většině případů přesahovalo interval stanovený zdrojem. Je možné, že bylo dosaženo vyšších výtěžků pomocí extrakce na fluidním loži, než jinými metodami využívanými ke stanovení obsahu silic v době tvorby tohoto zdroje. Zatím jde ale pouze o domněnku, tato oblast vyžaduje větší počet měření a hlubší prozkoumání.

Stárnutí chmele bylo zkoumáno na odrůdě *Kazbek* v posledním Pododdíle a poskytlo poměrně předvídatelné výsledky. Obsah všech silic ve chmelových peletách se snižoval v závislosti na staří vzorku a způsobu jeho uchování (teplota, přístup vzduchu, světla). Pokles v zastoupení má nejrychlejší průběh u uhlovodíků, následovaných estery, až po ketony, které se stárnutím vzorku vytrácejí nejpomaleji, což bylo patrné z obsahu 2-undekanonu ve všech odrůdách.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PIGGOTT, J., 2011. *Alcoholic Beverages : Sensory Evaluation and Consumer Research: Sensory Evaluation and Consumer Research*. Cambridge: Elsevier Science. ISBN 9780857095176. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/cuni/detail.action?docID=1584641> (19.8.2017)
- [2] ALMAGUER, C., SCHÖNBERGER, C., GASTL, M., ARENDT, E. K. a BECKER, T., 2014. *Humulus lupulus – a story that begs to be told*. A review. *Journal of the Institute of Brewing*. **120**[4], 289-314. DOI: 10.1002/jib.160. ISSN 20500416. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/jib.160> (13.8.2017)
- [3] KUPSKI, C. S., KLEIN, E. J., DA SILVA, E. A., PALÚ, F., GUIRARDELLO, R., a VIEIRA, M. G. A., 2017. *Mathematical modeling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hops [Humulus lupulus L.]*. *The Journal of Supercritical Fluids*. -[-], ---. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.011>. ISSN 08968446. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844617302413> (18.8.2017)
- [4] PREEDY, V.R., 2011. *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier Science. ISBN 9780080920498. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=hBO3N5qLTEIC> (22.8.2017)
- [5] ŠTĚRBA, K., ČEJKA, P., ČULÍK, P., JURKOVÁ, M., KROFTA, K., PAVLOVIC, M., MIKYŠKA, A. a OLŠOVSKÁ, J., 2015/06/01. *Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Detection*. **73**, s. - 158, 151 s. DOI: 10.1094/ASBCJ-2015-0406-01. Dostupné z: <http://www.asbcnet.org/publications/journal/vol/2015/Pages/ASBCJ-2015-0406-01.aspx> (17.8.2017)
- [6] NESVADBA, V., POLONČÍKOVÁ, Z., HENYCHOVÁ, A., KROFTA, K., PATZAK J., 2012. *Atlas českých odrůd chmele*. CHI Žatec. ISBN 978-80-87357-11-8. Dostupné z: <http://www.chizatec.cz/download/page5021.pdf> (13.8.2017)
- [7] BRIGGS, D.E., BOULTON, C.A. a BROOKES, P.A., 2004. *Brewing: Science and Practice: Science and Practice*. Taylor & Francis. ISBN 9780849325472.

- Dostupné z: [http://fars.itvhe.ac.ir/\\_fars/Documents/99ae7cc8-c9a8-4356-8d24-f6c208322cb7.pdf](http://fars.itvhe.ac.ir/_fars/Documents/99ae7cc8-c9a8-4356-8d24-f6c208322cb7.pdf) (14.8.2017)
- [8] ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ, *Věstník Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského: Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. června 2017*, 2017. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, **16**(3). Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/408615/\\_32017.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/408615/_32017.pdf) (17.8.2017)
- [9] LINSTROM, P.J. MALLARD, W.G., Eds, *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD. Dostupné z: <http://webbook.nist.gov/> (13.8.2017)
- [10] MCNAIR, Harold Monroe a James M. MILLER, 2009. *Basic gas chromatography*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley. ISBN 978-0-470-43954-8. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cuni/detail.action?docID=448849>
- [11] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2. Dostupné z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:79f8ee60-54bf-11e2-8888-005056827e51>
- [12] COUFAL, P., *Gas Chromatography, GC*. 1996. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html> (30.7.2017)
- [13] *Laboratoř hmotnostní spektrometrie: Hmotnostní spektrometrie* [online], [cit. 2017-07-31]. Dostupné z: <http://clab.vscht.cz/ms/spektrometrie-ms> (31.7.2017)
- [14] HOLČAPEK, M., *Hmotnostní analyzátory*. 45 s. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf) (8.8.2017)
- [15] COUFAL, P., 1996. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> (13.8.2017)
- [16] RANDON, J., MARET, L. a FERRONATO, C., 2014. *Gas chromatography–mass spectroscopy optimization by computer simulation, application to the analysis of 93 volatile organic compounds in workplace ambient air*. *Analytica Chimica Acta*. **812**[-], 258-264. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.016>. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014000622> (26.7.2017)
- [17] *Gas Chromatography--Mass Spectroscopy*, 2007. *LC-GC North America*. Advanstar Communications, **25**[10], 996-996. ISSN 15275949. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=27077415&site=ehost-live> (1.8.2017)
- [18] VACULOVIČ, T., *Laserová ablace se hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu –LA-ICP-MS*. Dostupné z: <http://docplayer.cz/46200537-Laserova-ablace-se-hmotnostni-spektrometrii-indukcne-vazaneho-plazmatu-la-icp-ms.html> (11.8.2017)