

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení linaloolu v pivu s využitím moderních
mikroextrakčních technik

Bc. Daniela Fikarová

Diplomová práce
2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Daniela Fikarová**
Osobní číslo: **C16602**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Stanovení linaloolu v pivu s využitím moderních mikroextrakčních technik**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na možnosti využití mikroextrakčních metod v kombinaci s metodou plynové chromatografie pro stanovení těkavých složek potravin. Zaměřte se především na metody mikroextrakce tuhou fází (SPME) a mikroextrakce jednou kapkou (SDME). Provéřte i možnosti kvantifikace složek potravin při použití uvedených mikroextrakčních technik. Zvláštní pozornost věnujte možnostem stanovení těkavých složek kapalných potravin, kam patří i piva vyrobená jak klasických chmelením, tak i tzv. chmelením za studena.
2. V experimentální části proveďte možnosti stanovení linaloolu v pivech. Pro tento účel vyzkoušejte metody SDME a SPME ve spojení s metodou plynové chromatografie. Jednotlivé metody optimalizujte a aplikujte na reálné vzorky pív včetně pív vyrobených postupem studeného chmelení. Provéřte, zda je možné pomocí analýzy linaloolu ověřit, zda při výrobě piva byl použit postup tzv. studeného chmelení. Obě optimalizované metody porovnejte a pokuste se zhodnotit jejich aplikovatelnost pro daný účel.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

Ing. Karolína Adámková

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

11. května 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

.....
Bc. Daniela Fikarová

Poděkování:

Mé poděkování patří doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. za cenné rady a odborný dohled při psaní diplomové práce. Ráda bych také poděkovala Ing. Jiřímu Hlaváčkovi a své rodině za významnou podporu.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá stanovením linaloolu v reálných vzorcích piv včetně piv za studena chmelených. Teoretická část je věnována pivu, linaloolu, mikroextrakčním technikám a plynové chromatografii. Experimentální část se zabývá stanovením linaloolu s využitím mikroextrakčních metod SDME a SPME ve spojení s metodou plynové chromatografie. Obě extrakční metody byly optimalizovány na standardním roztoku linaloolu. Optimalizovanými parametry byl objem a pH roztoku, doba extrakce a rychlost míchání. Následně byly obě optimalizované extrakční metody využity při analýze reálných vzorků. Finálně byly porovnány obsahy linaloolu v jednotlivých vzorcích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pivo, linalool, plynová chromatografie, SDME, SPME

TITLE

Determination of Linalool in Beer Using Modern Microextraction Techniques

ANNOTATION

This thesis deals with the determination of linalool in real samples of beers including dry-hopped beers. The theoretical part is devoted to beer, linalool, microextraction methods and gas chromatography. The experimental part deals with the determination of linalool using microextraction methods SDME and SPME in combination with the gas chromatography method. Both extraction methods were optimized using standard solution of linalool. The optimized parameters were the volume and pH of the solution, the extraction time and the stirring speed. Subsequently, both optimized extraction methods were used for the analysis of real beer samples. Finally, contents of linalool in individual samples were compared to each other.

KEYWORDS

Beer; Linalool; Gas Chromatography; SDME; SPME

Obsah

Seznam ilustrací	9
Seznam tabulek	10
Seznam použitých zkratk	12
Úvod.....	13
1 Teoretická část	14
1.1 Pivo	14
1.1.1 Suroviny na výrobu piva	15
1.1.1.1 Voda.....	15
1.1.1.2 Slad	16
1.1.1.3 Chmel.....	17
1.1.1.4 Kvasinky	19
1.1.2 Technologie výroby piva	20
1.1.2.1 Výroba sladu	20
1.1.2.2 Výroba piva.....	21
1.1.3 Zdravotní aspekty konzumace piva	24
1.2 Terpeny	27
1.3 Linalool.....	29
1.3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti linaloolu.....	29
1.3.2 Produkce	30
1.3.2.1 Výroba linaloolu firmou BASF	30
1.3.2.2 Výroba linaloolu firmou DSM.....	32
1.3.2.3 Výroba linaloolu firmou Kuraray	33
1.3.2.4 Výroba linaloolu firmou Millennium	34
1.3.1 Využití linaloolu	35
1.4 Extrakční techniky	38
1.4.1 Mikroextrakce jednou kapkou	38
1.4.1.1 Přímá mikroextrakce jednou kapkou	39
1.4.1.2 Headspace mikroextrakce jednou kapkou	41
1.4.1.3 Mikroextrakce přímo suspendovanou kapkou	42
1.4.1.4 Mikroextrakce v uspořádání kapalina/kapalina/kapalina	44
1.4.1.5 Mikroextrakce s využitím kontinuálního toku.....	46
1.4.1.6 Mikroextrakce ztuhlou kapkou v kapalné fázi.....	47
1.4.2 Mikroextrakce tuhou fází.....	49

1.4.3	Příklady využití mikroextrakčních metod pro stanovení těkavých složek potravin	52
1.4.3.1	Stanovení reziduí pesticidů v bílém víně, růžovém víně a v kokosové vodě s využitím metody přímé mikroextrakce jednou kapkou	52
1.4.3.2	Stanovení esterů kyseliny ftalové v kravském mléce s využitím metody mikroextrakce přímo suspendované kapky	53
1.4.3.3	Stanovení polotěkavých aditiv ve víně s využitím metody mikroextrakce tuhou fází v uspořádání headspace	54
1.4.3.4	Stanovení těkavých sloučenin v pomerančovém džusu s využitím metody mikroextrakce tuhou fází v uspořádání headspace	56
1.5	Plynová chromatografie	58
2	Experimentální část.....	61
2.1	Vzorky, chemikálie, přístroje a ostatní zařízení	61
2.1.1	Vzorky	61
2.1.2	Chemikálie	64
2.1.3	Přístroje	65
2.1.4	Ostatní zařízení	65
2.2	Pracovní postupy.....	66
2.2.1	Podmínky separace	66
2.2.2	Optimalizace přímé mikroextrakce jednou kapkou	66
2.2.3	Kalibrace pro přímou mikroextrakci jednou kapkou	66
2.2.4	Optimalizace přímé mikroextrakce tuhou fází.....	67
2.2.5	Kalibrace pro přímou mikroextrakci tuhou fází	68
2.2.6	Analýza reálných vzorků	68
2.2.7	Zjištění limitu detekce a limitu kvantifikace	70
3	Výsledky a diskuze	71
3.1.1	Zjištění limitu detekce a limitu kvantifikace	71
3.1.2	Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce jednou kapkou.....	72
3.1.3	Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce tuhou fází	75
3.1.4	Porovnání extrakcí	79
3.1.5	Analýza reálných vzorků	79
	Závěr	83
	Seznam použité literatury	84
	Přílohy.....	93
	Příloha I. Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce jednou kapkou.....	93
	Příloha II. Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce tuhou fází	100
	Příloha III. Analýzy reálných vzorků	108

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Rozdělení tvrdosti vody z hlediska rozpuštěných solí [8]	16
Obrázek 2: Řez chmelovou hlávkou [12]	18
Obrázek 3: Schéma výroby piva [21]	22
Obrázek 4: Technologické uspořádání při využití speciálního extraktoru chmele [25]	23
Obrázek 5: Izopentenylpyrofosfát [28]	27
Obrázek 6: Strukturní vzorec linaloolu [36]	29
Obrázek 7: Reakční schéma výroby linaloolu firmou BASF [32]	31
Obrázek 8: Příklady možných vedlejších produktů [41]	32
Obrázek 9: Reakční schéma výroby linaloolu firmou DSM [32]	33
Obrázek 10: Reakční schéma výroby linaloolu firmou Kuraray [32]	34
Obrázek 11: Reakční schéma výroby linaloolu firmou Millennium [32, 43]	35
Obrázek 12: Přitažlivost a odpuzivost hmyzu linaloolem nebo lilacovými sloučeninami [37]	37
Obrázek 13: Rozdělení mikroextrakce jednou kapkou do šesti podskupin [51]	38
Obrázek 14: Uspořádání přímé mikroextrakce jednou kapkou [51]	39
Obrázek 15: Vatou plněný a odnímatelný interface pro iontové kapaliny [56]	40
Obrázek 16: Uspořádání headspace mikroextrakce jednou kapkou [51]	41
Obrázek 17: Uspořádání mikroextrakce přímo suspendované kapky [51]	42
Obrázek 18: Extrakční rotační nádobka [47]	43
Obrázek 19: Změna profilu kapalného roztoku při různých otáčkách [47]	44
Obrázek 20: Mikroextrakce jednou kapkou v uspořádání kapalina/kapalina/kapalina [51]	45
Obrázek 21: Uspořádání mikroextrakce s využitím kontinuálního [52]	46
Obrázek 22: Uspořádání mikroextrakce ztuhlou kapkou v kapalně fázi, [51, 73]	48
Obrázek 23: Uspořádání mikroextrakce tuhou fází [51, 77]	50
Obrázek 24: Uspořádání konzervační metody využívající plazmu [87]	56
Obrázek 25: Uspořádání konzervační metody využívající ozon [87]	57
Obrázek 26: Schéma plynového chromatografu [89]	59
Obrázek 27: Plamenový ionizační detektor [93]	60
Obrázek 28: Plynový chromatograf Hewlett Packard 5890	65
Obrázek 29: Experimentální uspořádání přímé mikroextrakce jednou kapkou s detailním zobrazením kapky	69
Obrázek 30: Experimentální uspořádání přímé mikroextrakce tuhou fází s detailním zobrazením vlákna	69
Obrázek 31: Závislost průměrné výšky píků na koncentraci linaloolu (n = 3)	71
Obrázek 32: Závislost průměrné plochy píků na koncentraci linaloolu (n = 3)	72

Obrázek 33: Závislost průměrné plochy píků na objemu extrahovaného roztoku (n = 3)	72
Obrázek 34: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro veškeré časy (n = 3) ..	73
Obrázek 35: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech pro veškeré otáčky (n = 3) ..	73
Obrázek 36: Závislost průměrné plochy píků na pH (n = 3).....	74
Obrázek 37: Závislost průměrné výšky píků na koncentraci linaloolu (n = 3).....	75
Obrázek 38: Závislost průměrné plochy píků na koncentraci linaloolu (n = 3).....	75
Obrázek 39: Závislost průměrné plochy píků na objemu extrahovaného roztoku (n = 3)	76
Obrázek 40: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro veškeré časy (n = 3) ..	77
Obrázek 41: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech pro veškeré otáčky (n = 3) ..	77
Obrázek 42: Závislost průměrné výšky píků na koncentraci linaloolu (n = 3).....	78
Obrázek 43: Závislost průměrné plochy píků na koncentraci linaloolu (n = 3).....	78
Obrázek 44: Porovnání průměrných ploch veškerých reálných vzorků (n = 3)	80
Obrázek 45: Porovnání koncentrací linaloolu vyhodnocených z plochy píků metodou standardního přídatku v jednotlivých vzorcích piv	82

Seznam tabulek

Tabulka 1: Členění piva [2]	14
Tabulka 2: Energetická a nutriční hodnota v 1 litru klasického českého ležáku [6]	26
Tabulka 3: Přehled důležitých terpenoidů nacházejících se v pivu [1, 12]	28
Tabulka 4: Fyzikální vlastnosti linaloolu [36, 38, 39].....	30
Tabulka 5: Rozpouštědla vhodná pro mikroextrakci ztuhlou kapkou v kapalně fázi [73].....	48
Tabulka 6: Přehled vybraných typů vláken [80].....	51
Tabulka 7: Reálné vzorky piv vyrobených klasickým způsobem	61
Tabulka 8: Reálné vzorky piv vyrobených způsobem studeného chmelení	63
Tabulka 9: Kalibrační řada pro přímou mikroextrakci jednou kapkou	67
Tabulka 10: Kalibrační řada pro přímou mikroextrakci tuhou fází	68
Tabulka 11: Kalibrační řada pro zjištění limitu detekce a limitu kvantifikace.....	70
Tabulka 12: Limit detekce a limit kvantifikace pro metodu plynové chromatografie	71
Tabulka 13: Limit detekce a limit kvantifikace pro přímou mikroextrakci jednou kapkou	74
Tabulka 14: Limit detekce a limit kvantifikace pro přímou mikroextrakci tuhou fází.....	78
Tabulka 15: Obsah linaloolu vyjádřený jako nanogramy v 1 ml reálného vzorku klasicky chmelených piv	81
Tabulka 16: Obsah linaloolu vyjádřený jako nanogramy v 1 ml reálného vzorku za studena chmelených piv	81

Seznam příloh

Příloha I. Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce jednou kapkou.....	93
Příloha II. Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce tuhou fází	100
Příloha III. Analýzy reálných vzorků	108

Seznam použitých zkratek

APA	American Pale Ale
CAR	Carboxen, pórovitý sorbent obsahující aktivní uhlí
CFME.....	mikroextrakce s využitím kontinuálního toku
ČR	Česká republika
DI-SDME.....	přímá mikroextrakce jednou kapkou
DI-SPME	přímá mikroextrakce tuhou fází
DON.....	4-deoxyvalenol
DSDME	mikroextrakce přímo suspendovanou kapkou
DVB	divinylbenzen
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HDL	cholesterol vyskytující se v lipoproteinech o vysoké hustotě
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS-SDME.....	headspace mikroextrakce jednou kapkou
HS-SPME.....	headspace mikroextrakce tuhou fází
USA	Spojené státy americké
KEG	vratný sud z nerezové oceli
IPA.....	India Pale Ale
LDL.....	cholesterol vyskytující se v lipoproteinech o nízké hustotě
LLLME	mikroextrakce v uspořádání kapalina/kapalina/kapalina
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LPME.....	mikroextrakce kapalnou fází
MS.....	hmotnostní spektrometr/spektrometrie
PA	polyakrylát
PDMS.....	polydimethylsiloxan
PEEK	polyetheretherketon
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
SD-LPME	mikroextrakce ztuhlou kapkou v kapalně fází
SDME	mikroextrakce jednou kapkou
SIM	monitorování vybraných iontů
SPME.....	mikroextrakce tuhou fází
TIC.....	celkový iontový proud
TRP	syntetická pryskyřice

Úvod

Tato diplomová práce pojednává o stanovení linaloolu, jakožto terpenového alkoholu, v pivech chmelených za studena. Způsob výroby těchto piv, pocházející z britského pivovarnictví, v současné době nachází největší uplatnění především v USA, ale také ve Velké Británii, Skandinávských zemích, Austrálii a Kanadě. Své uplatnění začíná nacházet i v České republice. Způsob chmelení spočívá v extrakci chmele pivem prováděné bez použití zvýšené teploty. Tuto extrakci lze provést několika způsoby: aromatické odrůdy chmele lze přidat do ochlazené mladiny, do piva v průběhu kvašení, do KEG sudů nebo lze pivo chmelit přímo při jeho čepování s využitím chmelových patron, přes které čepované pivo protéká. Na extrakci složek chmele má vliv řada faktorů, jako je obsah alkoholu v pivu, teplota piva, obsah CO₂, odrůda chmele, typ chmelového výrobku, čas přídatku a množství chmele, způsob extrakce, doba extrakce, přítomnost kvasinek a také složení piva. Za studena chmelená piva dosahují specifického chmelového aroma, které je ovlivňováno odrůdou chmele a dobou jeho setrvání v pivu. Jádrem chmelového aroma je terpenový alkohol linalool, jehož extrakce má při studeném chmelení klíčový význam. Výhodou tohoto chmelení je získání zřetelné chmelové vůně a minimální hořkosti. Zmíněná nižší hořkost může být někdy nevýhodou spočívající v možné mikrobiální kontaminaci výsledného piva surovým chmelem nebo z důvodu nepovaření sladiny s chmelem v mladinové pánvi. Další nevýhodou je také rychlé sensorické stárnutí piv. Proto bývá záruka stabilní kvality a chuti těchto piv maximálně tři měsíce (v USA u některých piv i pouze deset dnů).

1 Teoretická část

1.1 Pivo

Pivo jako jeden z nejstarších „národních“ nápojů, někdy se též označující jako „tekuté zlato“, se v České republice vaří přes tisíc let. Z důvodu identických vstupních surovin byla dřívější výroba piva úzce spojena s pečením chleba. Tato piva byla značně rozdílná od těch dnešních – byla hustší, sladší, s nižší koncentrací alkoholu a naopak s vyšším obsahem bílkovin. V průběhu středověku, kdy čistota vody byla nejistá a nápoje jako káva a čaj byly neznámé, bylo pivo považováno za velice vydatný a bezpečný nápoj [1]. Pivo je definováno jako „pěnový nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových produktů, který vedle kvasným procesem vzniklého alkoholu (ethylalkoholu) a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu“ [2]. Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. je pivo děleno do několika skupin, které se dále mohou členit do několika podskupin. Toto členění je uvedeno v tabulce 1 [2]. Z důvodu úpravy řady parametrů, například nových pravidel pro označování kategorií pív, došlo k novelizaci výše uvedené vyhlášky. Novelizovaná vyhláška o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí je prozatím na seznamu předpokládaných zahájení legislativních prací [3].

Největší spotřeba piva, přes 140 l/osobu/rok, na světě je v České republice, přičemž nejvíce produkovaným pivem (až 90 %) je pivo plzeňského typu [4].

Tabulka 1: Členění piva [2]

Druh	Skupiny	Podskupiny
Pivo	stolní	pšeničné pivo pivo z jiných obilovin kvasnicové pivo ochucené pivo
	výčepní	
	ležák	
	speciální pivo	
	porter	
	se sníženým obsahem alkoholu	
	nealkoholické	

1.1.1 Suroviny na výrobu piva

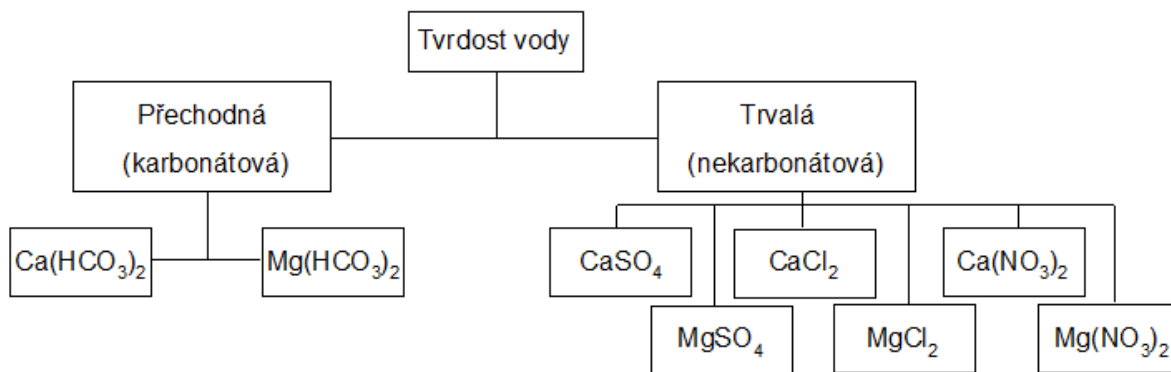
Mezi základní suroviny potřebné k výrobě piva patří voda, sladový ječmen, chmel a kvasinky. Složení každé suroviny včetně kombinace jejich chutí má značný vliv na konečný charakter piva, a proto je dnes k dispozici rozsáhlá nabídka piv. Kromě vody, zbytkových cukrů a ethanolu pivo obsahuje také aromatické sloučeniny podílející se na chuti každého piva. Doposud bylo v pivech odhaleno více než 1000 různorodých aromatických látek pocházejících ze surovin nebo vznikajících během výroby [5].

1.1.1.1 Voda

Hlavní složkou piva je varní voda tvořící více než 90 %, někdy i více než 94 %, konečné hmotnosti podle typu výrobku. Kromě varní vody se využívá voda provozní, mycí a sterilační. Výběr varní vody se řídí dle několika parametrů: voda musí splňovat veškeré právní požadavky (jak chemické tak i mikrobiologické) a také musí vyhovovat normám pivovaru svou čírostí, chutí, vůní a barvou. Zdroje vody, jejíž majoritní část se využívá ve sladovnách k máčení ječmene a v pivovarech zejména k mytí, čištění, chlazení a v kotelnách, lze rozdělit na zdroje spodní vody a vody povrchové. Mezi spodní zdroje patří voda pramenitá, studniční a infiltrační (z vrtů poblíž povrchových zdrojů). Mezi povrchové zdroje patří voda říční, voda z přehrad, rybníční, jezerní a další. K vlastní výrobě piva se smí používat výhradně voda pitná, proto při využití spodní nebo povrchové vody musí docházet k patřičným úpravám závislých na charakteru dané surové vody. Úprava spodních vod spočívá především v odstranění Fe^{2+} , Mn^{2+} a někdy též rozpuštěného CO_2 . Principem odstranění Fe^{2+} a Mn^{2+} je jejich převedení na sloučeniny s vyšším oxidačním stupněm, kdy dvojmocné železo přechází vlivem oxidace na trojmocné a dvojmocný mangan přechází na čtyřmocný. Oxidace dvojmocného železa probíhá snadno a lze ji realizovat pouhým dostačeným provzdušňováním vody. K oxidaci dvojmocného manganu je nutné využít silnějších oxidovadel jako je Cl_2 , ClO_2 nebo KMnO_4 . Výsledkem je tvorba nerozpustných sloučenin $\text{Fe}(\text{OH})_2$ a MnO_2 . Úprava povrchových vod je komplikovanější a zahrnuje mechanické odstranění tuhých nečistot pomocí sít nebo česel, koagulaci pomocí koagulačních činidel jako jsou např. soli Fe^{3+} a Al^{3+} , sedimentaci, filtraci nejčastěji na vrstvě zrnitého materiálu (písku) a v neposlední řadě také zajištění mikrobiologické nezávadnosti pomocí Cl_2 , ClO_2 , ozónování nebo působení UV paprsků. Značnou nevýhodou zmíněné chlorace vody jsou problémy při následující technologii piva, zejména při kvašení. Mimo výše uvedené zdroje vod se v pivovarnictví využívá také voda z městských vodovodních řádů, která splňuje požadavky na pitnou vodu a lze ji plně využít jako vodu varní. Úprava městské vody spočívá zejména v dechloraci, tedy v odstranění chloru způsobující problémy především při

kvašení. Dechlorace se nejčastěji provádí filtrací přes filtry s aktivním uhlím o vysoké adsorpční kapacitě, která je dána specifickým povrchem aktivního uhlí [1, 6-10].

Velmi důležitým parametrem vody je její tvrdost, která je tvořena především rozpuštěnými vápenatými a hořečnatými solemi. Na tvrdosti vody se podílejí také strontnaté a barnaté soli, jejichž význam je ale zanedbatelný. Tvrdost vody je dvojího typu, a to tvrdost stálá (nekarbonátová) a tvrdost přechodná (karbonátová). Stálou tvrdost tvoří stabilní sloučeniny nerozkládající se varem, tedy sírany, chloridy, křemičitany a další. Naopak přechodná tvrdost je tvořena hydrogenuhličitanu rozkládající se varem zcela nebo částečně. Vliv rozpuštěných solí na tvrdost vody zobrazuje obrázek 1. Na základě tvrdosti vody, která se obvykle vyjadřuje v mmol/l Ca^{2+} a mmol/l Mg^{2+} , jsou vody děleny na vody měkké ($< 1,3$ mmol/l), středně tvrdé ($1,3 - 2,5$ mmol/l), tvrdé ($2,5 - 3,8$ mmol/l) a velmi tvrdé ($> 3,8$ mmol/l) [7, 8].



Obrázek 1: Rozdělení tvrdosti vody z hlediska rozpuštěných solí [8]

1.1.1.2 Slad

Základními surovinami pro výrobu sladu je ječmen a voda. Kromě ječmene lze sladovat i jiné druhy obilí, např. pšenici za účelem získání pšeničného sladu pro výrobu pšeničných piv. Důležitou složkou obilovin je zásobní sacharid nacházející se u ječmene ve formě škrobu uvnitř buněk endospermu zaujímající převážnou část obilky, která je dále tvořena obalovými částmi (pluchy a plušky) a zárodkem (klíček, embryo). Z důvodu nemožného využití škrobu jako zdroje živin pro kvasinky a tím i nemožné fermentace, musí být ječmen před vlastním procesem sladován. Výsledek sladování jsou světlé, tmavé a speciální slady. Mimo pivovarnictví lze slad využít také na výrobu ethanolu, whisky, krmné biomasy či sladových výtahů využívaných v textilním průmyslu, potravinářských výrobcích nebo ve farmacii [5, 7].

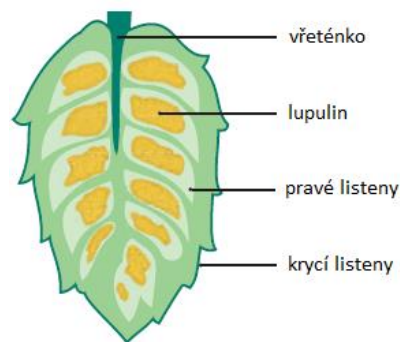
V České republice je nejvíce produkován slad plzeňského typu (světlý) a bavorského typu (tmavý), jiné druhy sladů jsou produkovány v menším množství pro speciální účely. Světlý slad, mající přibližně 4 % vody, se využívá pro výrobu světlého, lehkého a také speciálního piva. Pro tento slad je typický příznivý extrakt, dostatečná enzymatická síla a světlejší barva.

Naopak tmavý slad, mající přibližně 2 % vody, má tmavší barvu, výraznější aroma a vyšší obsah bílkovin a produktů Maillardových reakcí. Méně produkovaným sladem je slad vídeňského typu (polotmavý). Jedná se o přechod mezi sladem plzeňského a bavorského typu. Mimo to existují i slady pšeničné a speciální (např. karamelové, proteolytické a jiné) [6, 8].

1.1.1.3 Chmel

Zdrojem specifického aroma a hořkosti piva je chmel, patřící do čeledi konopovitých rostlin (*Cannabaceae*). Do této čeledi patří také chmelu nejvíce příbuzná rostlina, a to konopí, které může být též využito k hořčení piva. Zprvu byl chmel využíván pro ochucování medoviny. V pivovarnictví začal být využíván až později, kdy byl postupem času volně rostoucí chmel nahrazen cíleně pěstovaným chmelem z vhodných klimatických oblastí, mezi které v současné době patří oblasti zejména na Žatecku, Ústecku a Tršicku. Odrůdy českého chmele vynikají svou kvalitou, jedinečností a především velice dobrými pivovarskými vlastnostmi. O tom vypovídá i mnoho ochranných prvků a také skutečnost, že za světový standard pivovarské kvality je považována odrůda Žatecký poloraný červeňák. Tato odrůda patří mezi nejkvalitnější. Již několik let je zapsána mezi produkty chráněného označení původu a nese označení ŽATECKÝ CHMEL (jako ŽATECKÝ CHMEL smí být označen pouze jemný aromatický chmel Žatecký poloraný červeňák vypěstovaný v Žatecké chmelařské oblasti). Kromě této odrůdy se v České republice pěstují i další odrůdy, jako je Sádek, Harmonie, Bor, Premiant a další, lišící se především svou výnosností, obsahem α - a β -hořkých kyselin, a také svým aromatem [11-13].

Chmelová rostlina je složena z kořenové soustavy, listů, květenství a z révy s pazochy (postranní větévky, na kterých z révy vyrůstají listy a květenství). Chmelové hlávky, vznikající v průběhu zrání z květenství, se skládají z věténka a z krycích a pravých listenů, na kterých se nalézají lupulinové žlázy tvořící lupulin (zdroj hořkých látek chmele). Řez chmelovou hlávkou je zobrazen na obrázku 2. Z hlediska dvoudomosti nebo jednodomosti je chmel řazen mezi dvoudomé rostliny, což znamená, že se jedná o rostlinu s jednopohlavnými květy – na jedné rostlině jsou květy samčí (prašnickové) a na druhé naopak květy samičí (pestíkové). V pivovarnictví se využívají pouze neoplozené samičí rostliny, samčí rostliny se z důvodu horší kvality nepoužívají [12, 14].



Obrázek 2: Řez chmelovou hlávkou [12]

Významnými látkami chmele jsou chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly. Chmelové pryskyřice představují až 30 % hmotnosti chmelových hlávek a jejich základem jsou α - a β -hořké kyseliny, které propůjčují pivu charakteristickou hořkost, pomáhají při eliminaci vysokomolekulárních dusíkatých látek z mladiny, jsou bakteriocidní, ovlivňují vlastnost piva tvořit pěnu a jsou i konzervantem. α -hořké kyseliny jsou ve vodě téměř nerozpustné látky, ze kterých během chmelovaru izomerací vznikají izo- α -hořké kyseliny, které jsou přibližně z 85 % zdrojem hořké chuti piva. Nejvýznamnějším zástupcem α -hořkých kyselin je humulon, poskytující v porovnání s kohumulonem jemnější charakter hořké chuti, dále adhumulon, posthumulon a prehumulon, jejichž obsah je ale relativně nízký. Oproti tomu β -hořké kyseliny nejsou primárním zdrojem hořké chuti, pouze ji ovlivňují a harmonizují. Tyto kyseliny se v pivu vyskytují v původní formě (během chmelovaru neizomerují), ale vzhledem k jejich nízké stabilitě může docházet v průběhu zrání a skladování piva k jejich rozkladu vedoucímu ke změně chuťového profilu piva. Mezi β -hořké kyseliny patří adlupulon, kolupulon a lupulon. Rozdíl mezi izo- α - a β -hořkými kyselinami je mimo jiné také v průběhu jejich stárnutí a oxidaci, kdy platí, že izo- α -hořké látky ztrácejí hořkost, zatímco β -hořké látky na hořkosti nabývají [11, 12].

Chmelové silice představují pouze 0,5 – 3 % hmotnosti chmelových hlávek a dohromady utváří typické aroma jednotlivých odrůd chmele. Jedná se o směs vonných látek různého chemického složení, polaritu a těkavosti. Tyto látky se hromadně podílejí na tvorbě typického chmelového aroma a jejich obsah je odlišný pro jednotlivé odrůdy chmele a také pro různé podmínky pěstování. Chmelové silice se skládají z terpenické frakce převažující v čerstvě sklizeném chmelu, z kyslíkaté frakce vznikající oxidací původních uhlovodíků v průběhu zrání, zpracování a skladování chmele a ze sírné frakce. Terpenická frakce tvoří až 75 % hmotnosti silic a skládá se zejména z monoterpenů (především z myrcenu, ale také z limonenu nebo pinenu) a sesquiterpenů (především z humulenu, farnesenu a karyofylenu). Kyslíkatá frakce představuje 24 % hmotnosti silic a je tvořena především alkoholy (např. geraniol nebo

linalool), epoxidy (např. humulenepoxid I, II nebo karyofylenepoxid) a estery kyselin (např. methylestery). Zbylé 1 % připadá na frakci sirných sloučenin vyskytujících se ve formě sulfidů, polysulfidů, thiolů a thioesterů, které i při nízkých koncentracích nepříznivě ovlivňují aroma piva. Důvodem jsou jejich nízké prahové hodnoty vnímání. Během výroby piva dochází u většiny složek chmelových silic k chemickým, fyzikálním, ale i biochemickým změnám, jen u nepatrného množství silic (linalool, geraniol, humulenepoxidy nebo geranylacetát) během chmelovaru k žádným změnám nedochází [8, 12, 15, 16].

Kromě chmelových pryskyřic a silic chmel také obsahuje polyfenoly mající funkci antioxidantů, zabraňují tedy stárnutí piva, ale také mohou v pivu vytvářet nežádoucí látky. Jedná se o pestrou ve vodných roztocích dobře rozpustnou směs látek, ve které jsou nejvíce zastoupeny flavonové glykosidy, anthokyanogeny, katechiny a volné fenolové kyseliny (např. kyselina kávová, skořicová, kumarová a jiné). Tato směsice snadno podléhá oxidačně-redukčním přeměnám a vykazuje vysokou reaktivitu vůči bílkovinám. Dále chmel obsahuje polysacharidy, lipidy a další pro pivovarství méně důležité látky [8, 12].

1.1.1.4 Kvasinky

K fermentaci potravin a nápojů se kvasinky využívají již řadu let. V současné době jsou pro konkrétní fermentační procesy k dispozici různé kmeny kvasinek. Celosvětově nejvíce konzumovaným fermentovaným nápojem je pivo, zejména Ale a ležácká piva. Jako Ale piva jsou označovány různé typy svrchně kvašených piv. Mezi tato piva patří například typy jako India Pale Ale (IPA, vysoká chmelová hořkost, jantarová až bronzová barva a květinové aroma), American Pale Ale (APA, výhradně z amerického chmele, barva od velmi světlé až po bronzovou a slabě ovocné aroma), Pale Ale (světlá piva vyrobená ze světlých sladů a bronzové až měděné barvy), stout (tmavá piva s příchutí po praženém sladu, vysokým obsahem alkoholu a intenzivně připálenou chutí), pšeničné (z pšeničného sladu, světlé barvy, vůni po hřebíčku a říznou chutí), trapistické (výroba pouze v trapistickém klášteře, od světlé až po tmavou barvu, s obsahem alkoholu 5 – 10 % obj. a rozdílnou chutí) a další. Tato piva jsou fermentována pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které fermentují v rozmezí teplot 18 – 25 °C. Buňky těchto kvasinek mají tendenci ve formě suspenze zůstat ve fermentační nádobě, a proto jsou tyto kvasinky označovány jako svrchně kvasící. Tato piva jsou svými vlastnostmi podobná dřívějším pivům. Oproti tomu ležácká piva jsou fermentována pomocí kvasinek *Saccharomyces pastorianus* pocházející z mezidruhové hybridizace *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces eubayanus*. Jedná se o kvasinky spodně kvasící a fermentující v rozmezí teplot 5 – 15 °C [17, 18-20].

1.1.2 Technologie výroby piva

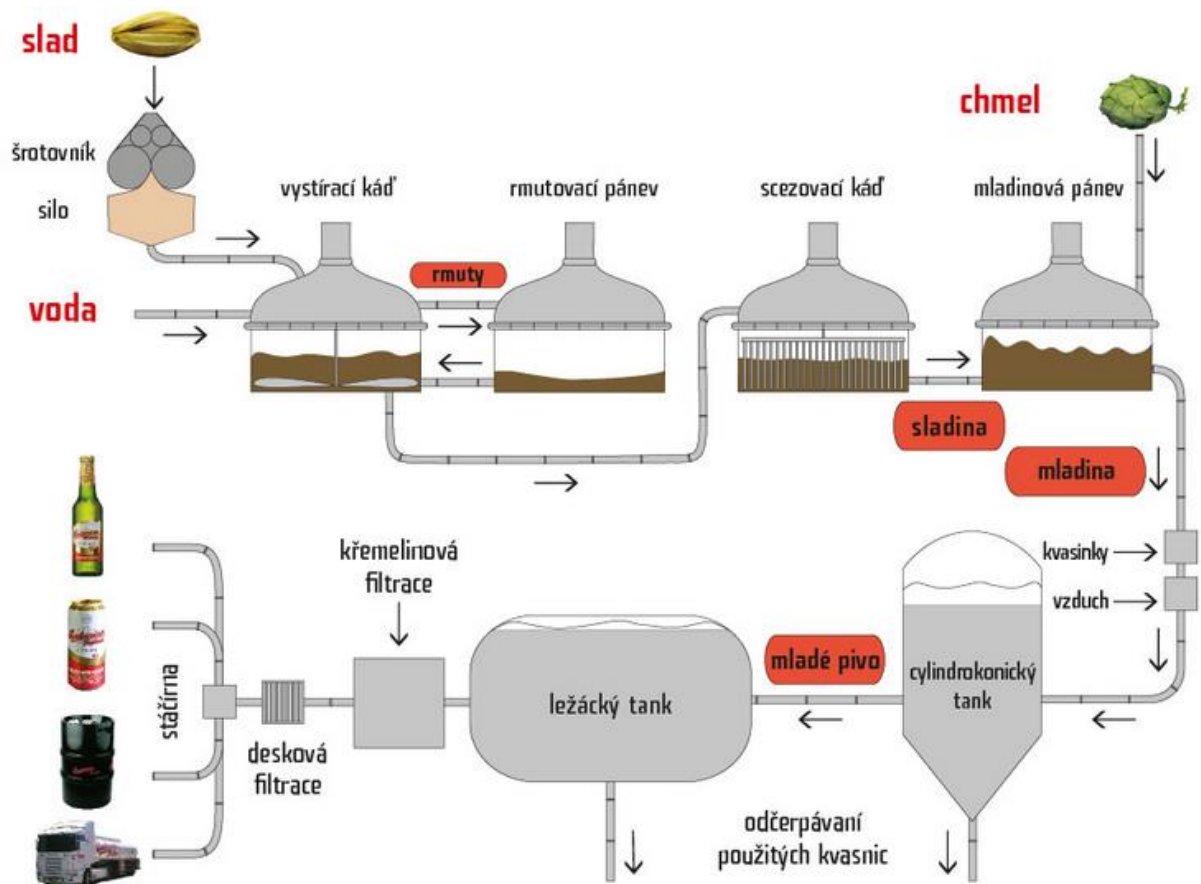
1.1.2.1 Výroba sladu

Na území České republiky jsou pro sladařské účely pěstovány především odrůdy jarního, dvouřadého níčího ječmene (*Hordeum distichum* var. *nutans*) spadající mezi světově nejkvalitnější odrůdy. Ve sladovně, kam je ječmen dopraven ihned po sklizni, nejprve dochází k jeho čištění a třídění dle velikosti zrna, odrůdy a jakosti. Tím je eliminován prach, nečistoty a příměsi snižující kvalitu i výtěžek sladu. Takto upravený ječmen, s utlumenými životními projevy a nacházející se ve stádiu základního klidu (dormance), je skladován na půdách nebo v silech. Po čištění a třídění následuje máčení, tedy zvýšení obsahu vody v zrně. Konečný obsah vody, neboli stupeň domočení, je pro světlé slady 42 – 45 %, zatímco pro tmavé slady 45 – 48 %. Máčení ovlivňuje řadu faktorů, jako je velikost zrna, teplota vody, složení použité vody, způsob máčení a zejména kyslík, který se s rostoucím obsahem vody spotřebovává za vzniku oxidu uhličitého. Při jeho nadměrném množství dochází ke změně aerobního dýchání v anaerobní dýchání související s kvašením, které poškozuje klíček. Proto jsou z důvodu odtahu vznikajícího oxidu uhličitého zavedeny vzdušné přestávky. Po ukončení máčení, trvající obvykle 72 hodin, následuje klíčení ječmene spočívající v aktivaci a produkci enzymů (zejména fosfatáz, cytáz, proteáz a amyláz). Stejně jako máčení, tak i klíčení je ovlivňováno řadou faktorů, mezi které patří stupeň domočení, teplota a přístup kyslíku. Výsledkem je zelený slad rozdělující se podle vývinu střelky na slad krátký (střelka do 1/3 – 1/2 délky zrna) a slad dlouhý (střelka nad 3/4 délky zrna). Posledním krokem sladařství je hvozďení sladu, při kterém dochází k sušení sladu a tím ke snížení obsahu vody pod 4 %. Vlivem toho jsou zastaveny vegetační pochody. Žádaná enzymová aktivita a vznik chuťových, oxidoredukčních a barevných látek podílejících se na charakteru sladu jsou ovšem zachovány. Hvozďení sladu probíhá ve třech etapách. První etapa, označující se jako fáze růstová, se provádí do teploty 40 °C při vlhkosti nad 20 %. Při této fázi v zrně stále probíhají veškeré vegetační pochody. Další fáze, tedy fáze enzymová, se provádí do teploty 60 °C, vlhkosti pod 20 %. Dochází při ní k zastavení vegetačních pochodů, zatímco reakce enzymové stále běží. Poslední fáze, nazývaná se fáze chemická, probíhá při teplotách nad 60 °C, vlhkosti pod 10 %. Probíhají při ní pouze reakce chemické vedoucí ke vzniku chuťových, barevných a oxidoredukčních látek, které se podílejí na charakteru, chuti, vůni, barvě a oxidoredukčních schopnostech sladu [7].

1.1.2.2 Výroba piva

Prvním krokem pivovarnictví je výroba mladiny zahrnující kroky jako je šrotování sladu, vystírání sladového šrotu do vody, rmutování, scezování sladiny, vyslazování sladového mláta, chmelovar a konečné úpravy mladiny. Cílem je převedení škrobu na fermentovatelné sacharidy. Šrotování sladu, probíhající za sucha, za mokra nebo kondiciovaně (slad zvlhčený vodní parou), spočívá v mechanickém drcení zrna za účelem vymletí endospermu při zachování celistvosti pluch. Další krok, nazývaný se vystírání a probíhající ve varně, je smísení našrotovaného sladu, jehož množství se označuje jako sypání, s vodou, jejíž množství se označuje jako nálev. Výsledkem je vystírka, která je v následujícím kroku postupně zahřívána na jednotlivé rmutovací teploty odpovídající vhodným teplotám pro správnou činnost enzymů. Tato operace se nazývá rmutování. Způsoby rmutování se rozlišují na dekokční a infuzní. Dekokční způsob spočívá v oddělení části vystírky (rmutu), která je po samostatném zpracování a povaření vrácena zpět do vystírací pánve. Dle počtu opakování tohoto způsobu se rozlišují postupy jednormutové až třirmutové. V ČR se využívá dvourmutový postup. U infuzního způsobu se ohřev vystírky provádí v jedné rmutovací nádobě. Následující operací je scezování sloužící k získání sladiny (roztok extraktu), která je v scezovací kádi oddělována od mláta (tuhá část zcukřeného rmutu), ze kterého se pomocí vody o teplotě 75 °C získávají poslední zbytky rozpustného extraktu, neboli dochází k tzv. vyslazování mláta. Dalším krokem je chmelovar, při kterém dochází k mnoha fyzikálním, biochemickým a chemickým dějům souhrnně zajišťující požadované složení mladiny. Zásadní je vznik izo- α -hořkých kyselin pomocí izomerační reakce α -hořkých kyselin pocházejících z chmelu. Mimo to dochází také k řadě oxidačních reakcí mající vliv na senzoryckou jakost mladiny a piva. Získaná mladina, odpovídající svým složením vyráběnému pivu, se dále upravuje: provádí se odstranění hrubých kalů, chlazení, odstranění jemných kalů a provzdušňování za pomoci sterilního vzduchu. Po úpravách mladiny následuje kvašení, při kterém se využívají svrchní pivovarské kvasinky (*Sacharomyces cerevisiae*) kvasící při teplotách až 24 °C nebo spodní pivovarské kvasinky (*Saccharomyces pastorianus*) kvasící v rozmezí teplot 5 – 15 °C. K dokvašování a zrání slouží ležácké sklepy s teplotou 1 – 3 °C. Zde pivo v ležáckých tancích pomalu dokváší, zraje, číří se a sytí se pod tlakem vzniklého oxidu uhličitého. Předposledním krokem jsou finální úpravy vzniklého piva, mezi které patří filtrace, sloužící k odstranění zbytků mikroorganismů a koloidních částí, pasterace nebo membránové filtrace k docílení žádané biologické stability a stabilizace provádějí se u exportních piv a sloužící k odstranění zejména polyfenolů, vysokomolekulárních dusíkatých látek, rozpuštěného kyslíku a kovových iontů. Závěrečným

krokem je izobarické stáčení piva do cisteren, sudů, lahví, plechovek nebo plastových nevratných lahví. Schématické zobrazení výroby piva prezentuje obrázek 3 [7, 8, 18].



Obrázek 3: Schéma výroby piva [21]

Vlastnosti výsledných piv jsou významně ovlivňovány přidáváním chmele v průběhu vaření piva. V závislosti na tom, v jaké výrobní fázi je chmel aplikován, dochází k ovlivnění hořkosti, chuti a vůně. Zdrojem hořkosti jsou již zmíněné α -hořké kyseliny, zatímco chuť a vůně jsou ovlivňovány přítomností těkavých látek, které jsou z velké části během klasické výše uvedené výroby piv z vroucí mladiny odpařeny již během 15 – 20 minut. Z důvodu zachování co nejvíce těkavých látek, tedy zachování maximální chuti a vůně, začaly některé pivovary praktikovat tzv. suché nebo studené chmelení (z anglického *dry hopping*). Tento způsob chmelení vznikl před několika staletími ve Velké Británii a spočíval v přidávání chmele do sudu krátce před tím, než byl odeslán k zákazníkovi. Principem tohoto chmelení je za studena prováděná extrakce chmele, kterou lze provést několika způsoby. Na účinnost extrakce má značný vliv obsah alkoholu, kdy platí, že s rostoucím obsahem alkoholu roste i množství vyextrahovaných látek. Dalším faktorem ovlivňujícím extrakci je teplota, obsah CO_2 , odrůda chmele, typ chmelového výrobku (pelety, hlávkový chmel nebo preparáty čistých silic),

čas přidavku a množství chmele, způsob extrakce, doba extrakce, přítomnost kvasinek a také složení piva. Extrakce se rozlišuje nejenom podle technologického uspořádání, ale také podle použité formy chmele – nejvíce využívanou formou jsou chmelové pelety vytvářející velkou kontaktní plochu. V současné době studené chmelení spočívá v přidávání chmele do některé studené fáze výroby piva – obvykle po kvašení do tanků, sudů nebo až v ležáckém sklepě. Extrakci lze také provést průtokem piva přes chmelové patrony při jeho čepování do sklenic nebo při jeho stáčení do lahví. Nejčastěji se studené chmelení provádí pomocí speciálního zařízení zobrazeného na obrázku 4 a označovaného jako extraktor chmele, ve kterém přes patronu silně aromatického chmele protéká již prokvašené studené pivo. Výsledné pivo má vlivem krátké expozice a nízké teploty velmi výraznou vůni a nižší hořkost. Z důvodu možného odsycení a ztracení řízu musí být průtok piva pod stálým tlakem. Součástí extraktu je síto eliminující pronikání chmelových granulí do piva a usnadňující čištění, a také membránové čerpadlo zajišťující šetrné čerpání piva. Doba chmelení je dána objemem pivního tanku. Výhodou je získání piva s květinovou chmelovou esencí, intenzivní vůni a nižší hořkostí, která během klasické výroby vzniká při vaření vlivem izomerace α -hořkých kyselin na izo- α -hořké kyseliny. Nevýhodou je možná mikrobiální kontaminace výsledného piva surovým chmelem a rychlé sensorické stárnutí piv (proto bývá záruka stabilní kvality a chuti těchto piv maximálně tři měsíce). Ačkoliv chmel neposkytuje vhodné prostředí pro většinu typů bakterií a v případě jeho přidání do ochlazené mladiny po zahájení fermentace veškeré bakterie soutěží s energeticky aktivními kvasinkami nebo je růst bakterií potlačen obsahem alkoholu a nízkou hodnotou pH, představuje tato kontaminace možné riziko. Ke chmelení se využívají především aromatictější odrůdy s nízkým obsahem α -hořkých kyselin (kolem 6 % nebo méně), jako je odrůda Cascade, Crystal, Willamette, Fuggle a další [22-25].



Obrázek 4: Technologické uspořádání při využití speciálního extraktoru chmele [25]

1.1.3 Zdravotní aspekty konzumace piva

Pivo představuje významný zdroj minerálů, vitamínů, vlákniny a polyfenolů, které dohromady pozitivně přispívají ke zdravému životnímu stylu. Vitamíny rozpustné ve vodě jsou zastoupeny vitamíny skupiny B (zejména foláty, riboflavin, kyselina panthotenová, pyridoxin a niacin). V některých případech může být přítomna také kyselina askorbová, tedy vitamín C, který se ale do piva přidává jako antioxidant (během klasické výroby dochází vlivem vysokých teplot k jeho ztrátám). Vitamíny rozpustné v tucích se během výroby ztrácejí společně s nerozpustnými sloučeninami. Z hlediska minerálů je pivo významným zdrojem křemíku, který omezuje osteoporózu. Pivo také obsahuje látky s antioxidačními vlastnostmi, mezi které patří flavonoly (např. kvercetin), polyfenoly (např. xanthohumol) a fenolové kyseliny (např. kyselina ferulová nebo gallová). Bylo prokázáno, že tyto látky získané prostřednictvím piva jsou v lidském organismu účinnější v porovnání s jinými zdroji potravin, například rajčaty, a také jsou z piva lépe vstřebávány. Součástí piva jsou také degradační produkty polysacharidů a rozpustná vláknina fungující jako prebiotika [1, 26, 27].

Pivo představuje nápoj s relativně nízkým obsahem alkoholu (v průměru 4 – 5 %), jehož střídavá konzumace může mít příznivé účinky na zdravotní stav dospělé osoby. Pravidelná konzumace jednoho až dvou nápojů denně u mužů a jednoho nápoje u žen je spojena s nižším rizikem kardiovaskulárních onemocnění, cukrovky 2. typu a demence. Pivo také snižuje riziko aterosklerózy. Alkohol v něm obsažený snižuje v krevní plazmě hladinu „špatného“ LDL cholesterolu a naopak podněcuje hladinu „dobrého“ HDL cholesterolu a hladinu apolipoproteinů. Snižením hladiny fibrinogenu v plazmě se také snižuje riziko srážení krve. Nepříznivým účinkem konzumace piva, obecně alkoholu, může být vnímání potravy, která může být vnímána poněkud sušší. Důvodem je potlačení toku slin, a to i přes stimulační účinky chuti k jídlu vlivem alkoholu. Kromě toho pivo, ačkoliv méně než víno, stimuluje produkci hormonu gastrinu ovlivňující sekreci žaludečních šťáv. Dalším významným účinkem je ochrana před infekcí bakterií *Helicobacter pylori* způsobující vředy žaludku a dvanáctníku a rakovinu žaludku. Lupulon (β -hořká kyselina chmele) dokonce inhibuje růst této bakterie. Alkohol také urychluje vyprazdňování a snižuje počet žlučových kamenů. Pivo má vliv i na zdravotní stav ústní dutiny, neboť chmelové polyfenoly inhibující růst streptokoků zpomalují vznik zubního kazu. Tmavé pivo dokonce inhibuje syntézu polysacharidů, které zachycují tyto bakterie na zubní sklovině. Naopak piva, obsahující významné hladiny zbytkového cukru mají účinek na ústní dutinu škodlivý. Nežádoucím efektem alkoholu je jeho diuretický účinek, proto je důležité doplňovat tekutiny pitím dostatečného množství vody. I přes tento účinek, nebo možná díky němu, je pivo

nadřazeno samotné vodě při pročišťování ledvin, a to vlivem zjištění, že každá denně spotřebovaná láhev klasického ležáka snižuje riziko ledvinových kamenů až o 40 % [6, 26, 27].

Vlivem cizorodých látek, pocházejících ze surovin, z pomocných látek, z technologického zařízení nebo vznikajících během výroby, může mít pivo na lidské tělo účinek také škodlivý. Nejvíce škodlivou skupinou jsou těkavé N-nitrosaminy vznikající během hvozdní sladu reakcí oxidů dusíku s aminosloučeninami sladu, které lze eliminovat zavedením síření během hvozdní. Další skupinou jsou netěkavé nitrososloučeniny patřící mezi N-nitrosoaminy a vznikající v průběhu rmutování činností bakterií rodu *Bacillus* nebo účinkem bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* při hlavním kvašení případně činností cizích kvasinek. Mezi cizorodé látky patří i anorganické prvky, jako jsou olovo, kadmium, rtuť, chrom, nikl, arsen, selen, stroncium a beryllium. Zdrojem těchto látek jsou vstupní suroviny. Velmi závažnou skupinou jsou, plísňemi produkované, toxické látky označované jako mykotoxiny odolávající obvyklým technologickým postupům. Do piva se dostávají ze surovin, zejména z ječmene a sladu, ve kterých bývají nalezeny především aflatoxiny B a G, 4-deoxynivalenol (DON), ochratoxin A a zearalenon. Nověji byla odhalena přítomnost tzv. maskovaných, neboli skrytých, mykotoxinů, které se v pivu vyskytují v podobě glukosidů (např. DON-3-glukosid). Ty se v průběhu výroby hydrolyzují a navyšují tak celkové množství mykotoxinů nacházejících se v hotovém pivu. Zdrojem cizorodých látek, především alifatických halogenovaných uhlovodíků, může být také voda využívaná při výrobě, ve které tyto látky vnikají při její chloraci nebo bromaci. Z nátěrů technologického zařízení se mohou do piva uvolňovat polychlorované bifenyly, ze sladu naopak polycyklické aromatické uhlovodíky a vlivem mikrobiální kontaminace mléčnými bakteriemi bývají v pivu nacházeny také biogenní aminy a polyaminy, hlavně tyramin, histamin, putrescin a spermidin, zvyšující krevní tlak [6].

Díky nízké hodnotě pH, přítomnosti chmelových látek, anaerobnímu prostředí, obsahu alkoholu a také skutečnosti, že přítomné kvasinky metabolizují prakticky veškeré fermentované cukry, nebývají v pivu nacházeny žádné patogenní zárodky. Blahodárný vliv piva je dán také jeho složením, neboť obsahuje nízké množství sacharidů a má menší energetickou hodnotu (viz tabulka 2) v porovnání se stejným množstvím mléka nebo jablečné šťávy, navíc obsahuje užitečné aminokyseliny a neobsahuje žádná konzervační činidla. Platí, že většina zdravotních účinků konzumace piva je připisována rovnoměrnému pití během týdne, nikoliv nadměrnému pití při jedné příležitosti. Mírná konzumace piva by také měla být vždy považována za doplněk k vyvážené stravě. Pivo patří mezi alkoholické nápoje, jeho nadměrná konzumace může způsobit poškození v krátkodobém i dlouhodobém horizontu, např. může přispět ke vzniku

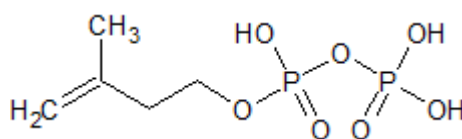
rakoviny prsu, kolorekta, hlavy a krku, jater nebo jícnu. Veškeré výše uvedené pozitivní vlivy jsou zpravidla připisovány klasickým pivům, tj. 10 a 12° [1, 26].

Tabulka 2: Energetická a nutriční hodnota v 1 litru klasického českého ležáku [6]

Látky, energie	Obsah v 1 litru piva
Energie	1 600 kJ (380 kcal)
Bílkoviny	4 g
Celkové sacharidy	27 g
Jednoduché cukry	4 g
Ethanol	37 g
Tuk	stopy
Vláknina	3 g
Sodík	0,04 g

1.2 Terpeny

Terpeny představují skupinu látek skládající se z několika stavebních izoprenových (izopentylových) jednotek, které se převážně vyskytují v rostlinách a v přírodních produktech. Některé, zejména ty složitější jako je skvalen nebo lanosterol, lze nalézt i u zvířat. Dle počtu stavebních jednotek se terpeny rozdělují do několika skupin: monoterpeny (složené ze dvou izoprenových jednotek), sesquiterpeny (složené ze tří izoprenových jednotek), diterpeny (složené ze čtyř izoprenových jednotek) a triterpeny (složené ze šesti izoprenových jednotek). Terpeny lze také klasifikovat dle počtu cyklických kruhů ve struktuře na terpeny acyklické, monocyklické a bicyklické. Jednoduché terpeny jsou těkavé, rychle se odpařují a jsou považovány za éterické oleje dodávající rostlinám jejich specifickou vůni, vlivem které jsou přitahovány a odpuzovány jiné organizmy. Oproti tomu složitější terpeny často bývají prekurzory bioaktivních molekul, jako je cholesterol, steroidní hormony nebo voskovité látky sloužící u rostlin jako ochranná vrstva. Mezi terpeny patří také skupina látek označovaná jako terpenoidy, které se od terpenů liší přítomností funkční skupiny – ta může být pro různé terpenové sloučeniny rozdílná. Do skupiny terpenoidů patří látky jako alkoholy (např. geraniol, linalool nebo mentol), aldehydy (např. citronellal a geranial), ketony (např. menton a karvon), ethery (např. 1,8-cineol), estery (např. linalylacetát) a fenoly (např. thymol nebo karvakrol). Některé terpenoidy, pocházející z chmele a dávající pivu významné organoleptické vlastnosti, jsou uvedeny společně s jejich vůní v tabulce 3. Tyto terpenoidy, z nichž některé jsou během fermentace metabolizovány kvasinkami na jiné terpenoidní sloučeniny, jsou také odvozeny od izoprenu (izopentenylpyrofosfátu) znázorněného na obrázku 5. Metabolizace probíhá nejčastěji za vzniku terpenoidových alkoholů a esterů (zejména vznikají octany). Vlivem různých procesů, jako je odpařování, adsorpce na kvasinkové buňky nebo metabolizace kvasinkami, dochází v průběhu fermentace a zrání ke snížení koncentrace terpenoidů, a proto není jejich koncentrace v hotovém pivu stejná jako v čerstvé mladině nebo v surovém chmelu. Například linalool je během fermentace kvasinkami metabolizován na α -terpineol, geraniol a nerol. Přes značné rozdíly v typech, chuti a vůni piva jsou koncentrace mnoha terpenoidů podobné. Rozsah koncentrací nejvýznamnějších terpenoidů v pivech uvádí také tabulka 3 [1, 28-31].



Obrázek 5: Izopentenylpyrofosfát [28]

Tabulka 3: Přehled důležitých terpenoidů nacházejících se v pivu [1, 12]

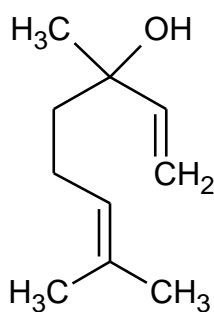
Terpenoid	Vůně	Koncentrace [μg/l]
Geraniol	Květinová, citrusová, vůně růže	2,2 – 6,1
Linalool	Květinová, svěží, koriandrová	0,0 – 21,9
Citronellol	Sladká, citrusová, vůně růže	3,0 – 22,1
Nerol	Květinová, svěží, zelená	–
α-terpineol	Vůně šeríku	0,0 – 45,0
Terpinen-4-ol	Kořeněná	–
Linaloové oxidy	Bylinná	–
Nerolidol	Květinová	–
Farnesol	Květinová, aroma zelených jablek a citrusů	0,0 – 0,1
β-myrcen	Citrusová, bylinná, mírně borovicová	0,0 – 0,5
α-pinen, β-pinen	Vůně borovice	–
Limonen	Sladká, kořeněná, citrusová, květinová	–
α-humulen	Bylinná	0,0 – 0,2
β-karyofylen	Bylinná, citrusová, kořeněná	0,0 – 0,2
β-karyofylen oxid	Kořeněná	–
Citral	Květinová	–

1.3 Linalool

Acyklická monoterpenová sloučenina nesoucí označení linalool se nachází v různých rostlinách (např. v levanduli nebo bergamotu), v kořeni a v mnoha esenciálních a rostlinných olejích (např. v levandulovém oleji nebo bazalkovém oleji evropského typu, který má nejenom nejjemnější vůni, ale také je považován za nejkvalitnější olej). Mezi nejznámější producenty této látky patří rostliny z čeledi vavřínovité (*Lauraceae*), hluchavkovité (*Lamiaceae*), miříkovité (*Apiaceae*) a z čeledi routovité (*Rutaceae*). Linalool je obsažen z více jak 90 % z celkového obsahu silic v kafrovníku lékařském a získává se parní destilací dřeva a listů. Tento stále zelený strom patřící do čeledi vavřínovitých pochází z Číny a Tchaj-wanu. Tak jako i jiné vonné terpeny (např. limonen nebo geraniol) podléhá linalool při pokojové teplotě autooxidaci, při které vznikají oxidační produkty (zejména hydroperoxydy a nesenzibilizující ethery) způsobující kontaktní alergii [32-35].

1.3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti linaloolu

Po chemické stránce se jedná o 3,7-dimethyl-1,6-oktadien-3-ol, jehož strukturní vzorec je zobrazen na obrázku 6, zatímco jeho základní fyzikální vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 4. Tuto látku lze nalézt také pod výrazy linalyl alkohol, 7-methyl-3-methylenocta-4,6-dien-2-ol, allo-ocimenol, muguol a další. V chemickém kontextu je označení „linalool“ zavádějící, neboť znamená jednu sloučeninu. Ve skutečnosti linalool existuje ve formě dvou konfiguračních izomerů, a to jako (3R) a (3S) enantiomer, ale z důvodu enormní podobnosti vlastností těchto enantiomerů bývá jejich analytické rozdělení obtížné a proto často bývají označovány souhrnným názvem „linalool“ [32, 35-37].



Obrázek 6: Strukturní vzorec linaloolu [36]

Tabulka 4: Fyzikální vlastnosti linaloolu [36, 38, 39]

Sumární vzorec	C ₁₀ H ₁₈ O
Molekulová hmotnost	154,25 g/mol
Skupenství	kapalina
Barva	bezbarvá
Zápach	květinový, kořeněný, dřevnatý
Chuť	kořeněná, citrusová
Bod varu	194 – 197 °C
Bod tání	< 25°C
Bod tuhnutí	< -74 °C
Bod vzplanutí	78 °C (uzavřený kelímek)
Rozpustnost	V alkoholu, etheru, olejích, propylenglykolu, nerozpustný v glycerolu
Rozpustnost ve vodě	1,59 mg/ml při 25°C
Relativní hustota	0,87 g/ml při 25 °C
Viskozita	4,465 mPa·s při 25 °C
pK_A	18,46

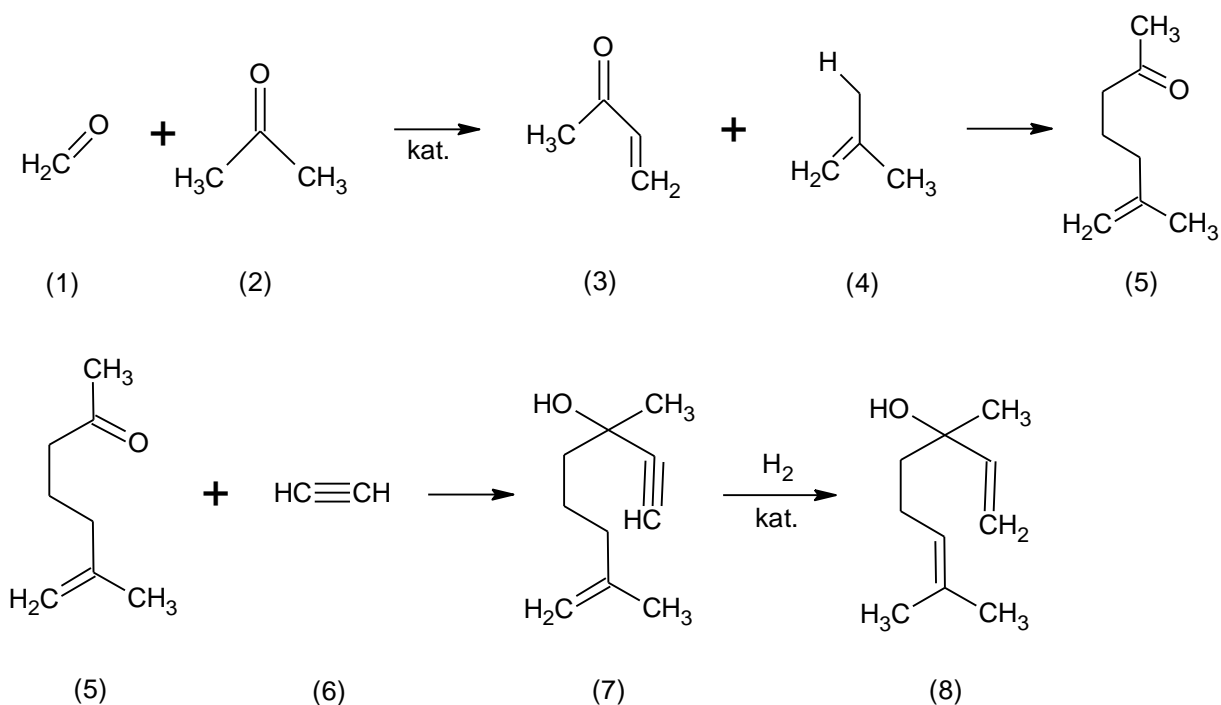
1.3.2 Produkce

Roční celosvětová výroba linaloolu dosahující přibližně 12 000 tun zahrnuje jak linalool chemicky syntetizovaný, tak i linalool získaný extrakcí nebo destilací přírodních látek. Přírodní linalool, s pořizovací cenou okolo 920 Kč/kg, je získáván zejména z brazilského palisandru a z kafrovníku lékařského. Méně významným zdrojem může být koriandrový olej, levandule nebo bergamot. Syntetický linalool, s pořizovací cenou 100-160 Kč/kg, je produkován čtyřmi hlavními výrobci, jimiž jsou firmy BASF (Badische Anillin- & Sodafabrik), DSM (State Mines), Kuraray a Millennium [32, 40].

1.3.2.1 Výroba linaloolu firmou BASF

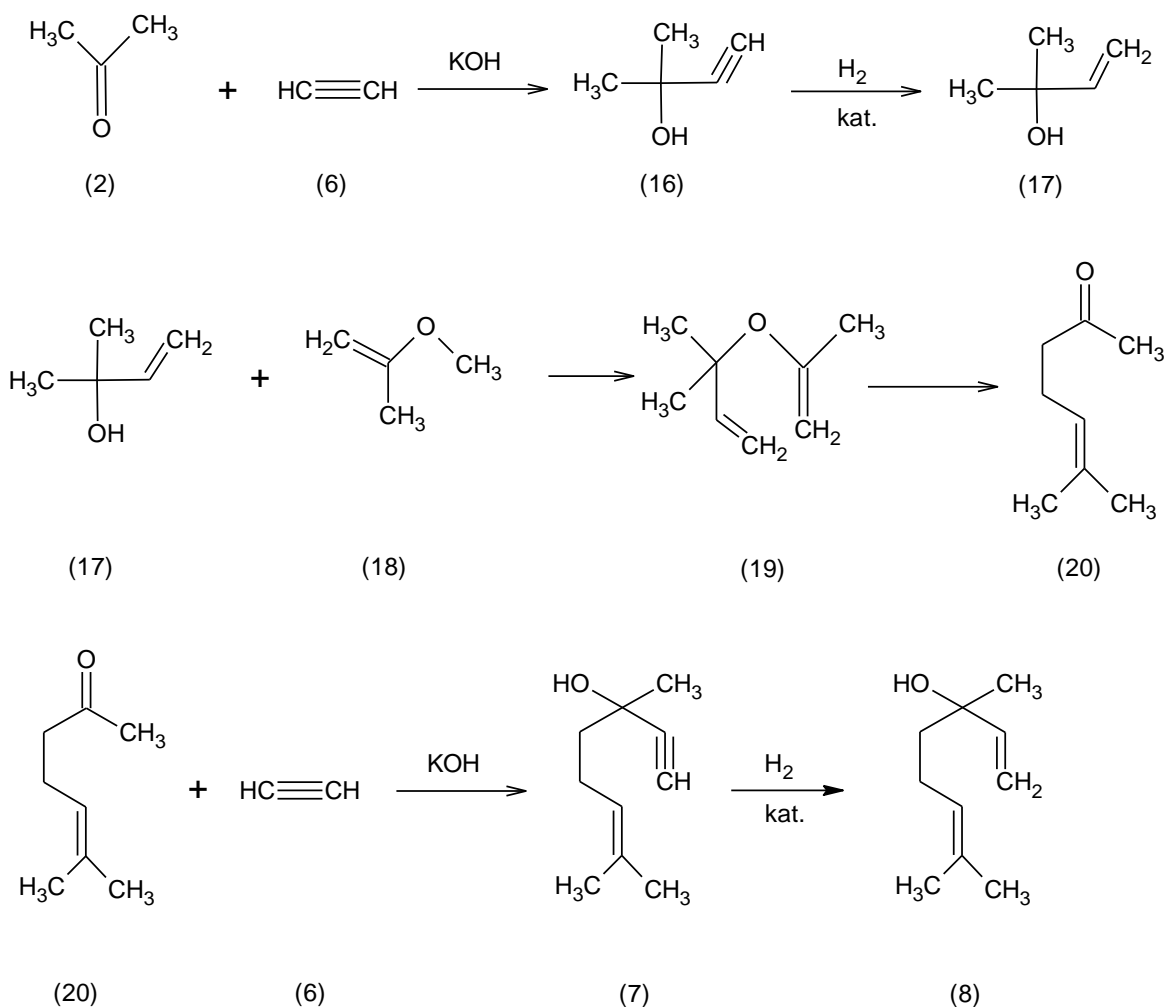
Prvním krokem je bazicky katalyzovaná reakce formaldehydu (1) a acetonu (2) vedoucí ke vzniku methylvinylketonu (3), který dále reaguje s izobutenem (4) za vzniku izomeru methylheptenonu, přesněji 6-methylhept-6-en-2-onu (5). Vzniklý methylheptenon následně reaguje s ethynem (6) za vzniku dehydrolinaloolu (7), který je v posledním kroku za použití Lindlarova

katalyzátoru (deaktivované palladium) hydrogenován na výsledný linalool (8). Reakce se provádí při teplotě 200 až 300 °C a při tlaku 10 MPa. Výrobu linaloolu firmou BASF znázorňuje reakční schéma na obrázku 7 [32, 41].



Obrázek 7: Reakční schéma výroby linaloolu firmou BASF [32]

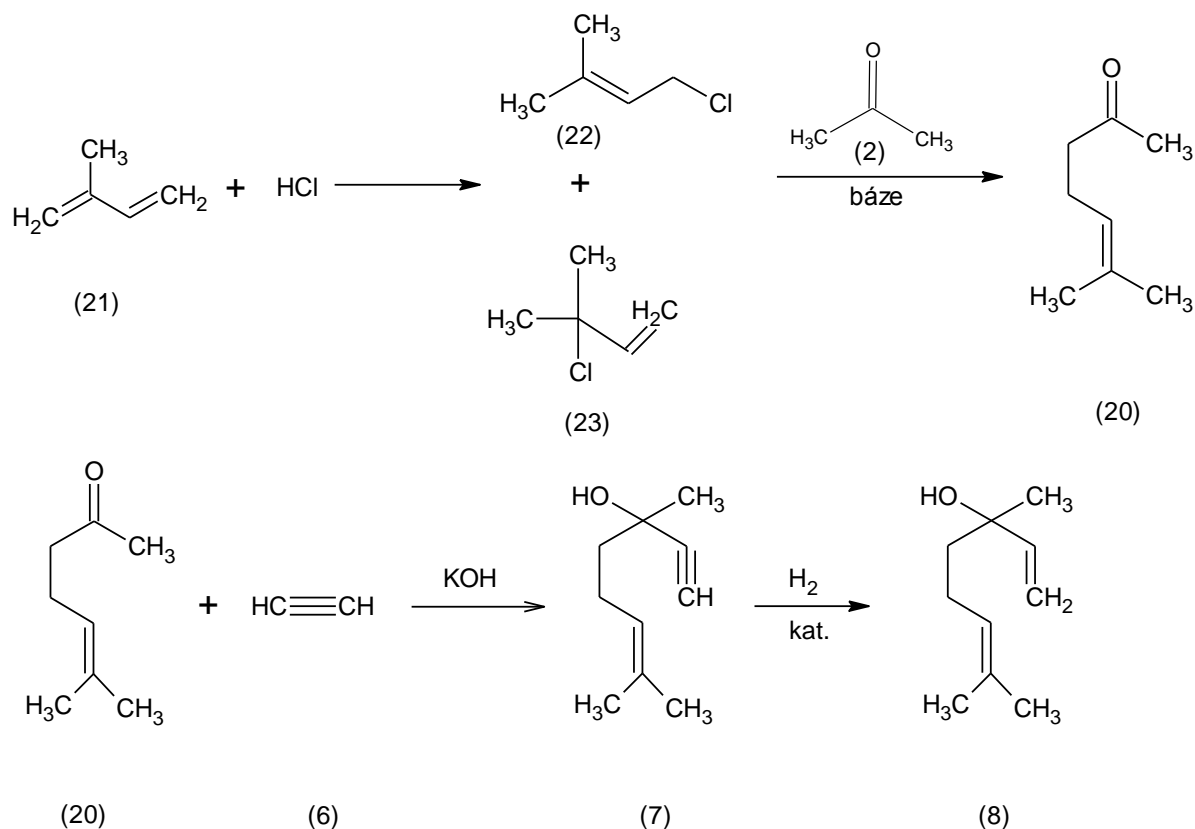
Výtěžnost methylheptenonu (5) je překvapivě vysoká, a to i přes možné vedlejší produkty uvedených látek, které mohou reagovat nejenom mezi sebou, ale také sami o sobě. Například formaldehyd (1) podléhá Cannizarově reakci za tvorby methanolu (9) a kyseliny mravenčí (10), izobuten (4) reaguje za tvorby dimethylhexenu (11) a trimethylcyklopentanu (12), reakcí formaldehydu (1) a izobutenu (4) vzniká 3-methylbut-3-en-1-ol (13), který je následně dehydratován na izopren (14) nebo může formaldehyd (1) reagovat s acetonem (2) za vzniku 3-methylbut-3-en-1-olu (13), který může snadno vytvářet methylvinylketon (15). I přes dostačující výtěžek je důležité zajistit takové reakční podmínky, při kterých bude vznik vedlejších produktů potlačen ve prospěch tvorby methylheptenonu. Vedlejší reakce jsou uvedeny na obrázku 8 [41].



Obrázek 9: Reakční schéma výroby linaloolu firmou DSM [32]

1.3.2.3 Výroba linaloolu firmou Kuraray

Výroba linaloolu japonskou firmou Kuraray se řídí dle obrázku 10. Úvodním krokem je hydrochlorace izoprenu (21) za vzniku 1-chloro-3-methyl-but-2-enu (22) a jeho izomeru 3-chlor-3-methyl-but-1-enu (23). Poměr mezi těmito látkami je dán reakčními podmínkami. Dalším krokem je reakce s acetonem (2) v přítomnosti báze za vzniku methylheptenonu (20), který reaguje s ethynem (6) za vzniku dehydrolinaloolu (7) podléhající v přítomnosti Lindlarova katalyzátoru hydrogenaci na výsledný linalool (8) [32].



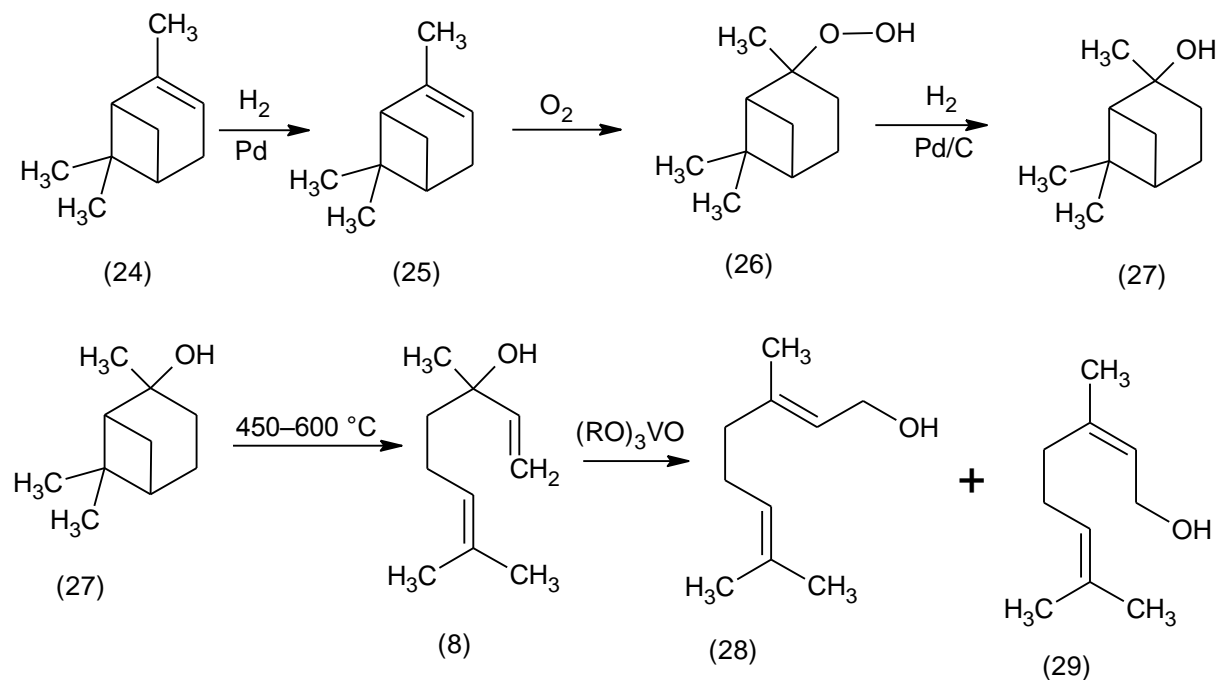
Obrázek 10: Reakční schéma výroby linaloolu firmou Kuraray [32]

1.3.2.4 Výroba linaloolu firmou Millennium

Čtyřstupňová syntéza linaloolu začíná hydrogenací α -pinenu (24), získaného ze surového sulfátového terpentinu, vedlejšího produktu z papírenského průmyslu, a to pomocí paladnatého katalyzátoru na cis- a trans-pinén (25). Důvodem této hydrogenace je nereaktivita α -pinenu. Následná oxidace poskytuje cis- a trans-pinén-2-hydroperoxid (26), který je za přítomnosti paladnatého nebo uhlíkového katalyzátoru hydrogenován na cis- a trans-pinanol (27) s poměrem izomerů cis/trans 75/25. Vzniklé pinanoly jsou destilovány a pyrolyzovány v teplotním rozmezí 450-600 °C na výsledný linalool (8), který lze dále přeměnit na geraniol (28) a nerol (29). Izomerace, prováděna za přítomnosti ortovanadátového katalyzátoru, se zlepšuje přeměnou linaloolu na jeho borátový ester. Tím je podstatně zvýšena výtěžnost nerolu a geraniolu až na 90 %. Získanou směs geraniolu a nerolu lze rozdělit pomocí destilace. Reakční schéma je uvedeno na obrázku 11 [32, 43].

Z důvodu eliminace tvorby nežádoucích plinolů (3-isopropenyl-1,2-dimethylcyclopentan-1-olů), alkoholů vznikajících intramolekulární reakcí (ene cyklizací) linaloolu, probíhá pyrolýza při poměrně nízké konverzi. Tvorbě plinolů, jakožto vedlejších produktů, není možné zabránit, protože pyrolýza pinanolu a ene cyklizace linaloolu jsou procesy tepelné a vzhledem k blízkosti bodu varu plinolu a linaloolu je jejich separace velmi obtížná [32, 44].

Malé odchylky reakčních podmínek, jako teplota, geometrie reaktoru atd., vedou k rozdílné selektivitě a výtěžnosti linaloolu. Vedlejší reakce (např. vznik myrcenu nebo limonenu dehydratační reakcí nebo vznik cyklopentanolu cyklickou ene reakcí) mohou být ovlivněny nebo dokonce potlačeny použitím krátkých reakčních časů nebo pomocí přísad (např. použitím dimethylaminu lze dosáhnout zvýšené výtěžnosti linaloolu). Bylo zjištěno, že krátké reakční doby v kombinaci s vysokou teplotou vedou k vysoké selektivitě a výtěžnosti linaloolu. Naopak teploty nad 500 °C vedou k tvorbě plinolů [43].



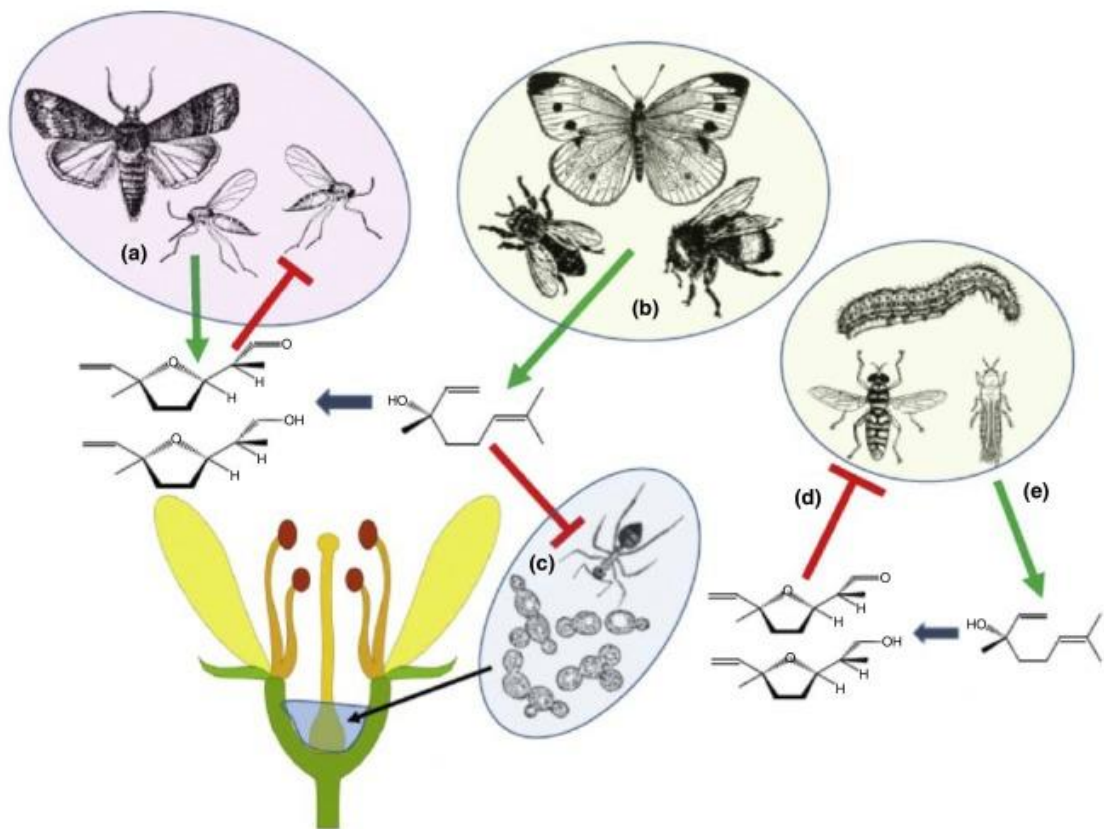
Obrázek 11: Reakční schéma výroby linaloolu firmou Millennium [32, 43]

1.3.1 Využití linaloolu

Linalool a rostliny produkující tuto látku se využívají v tradiční i v moderní medicíně jako antibakteriální, analgetická, protizánětlivá a sedativní činidla. Tato monoterpenová sloučenina je hlavní složkou většiny esenciálních olejů, které díky svým baktericidním a insekticidním vlastnostem našly uplatnění, jednak v léčivém odvětví na zmírnění příznaků a léčení řady akutních i chronických onemocnění, tak i v odvětví kosmetickém, a to již od padesátých let minulého století. Hlavní část synteticky vyrobeného linaloolu (až 95 %) se díky své čerstvé a květinové vůni a nízkým výrobním nákladům hojně využívá jako vonná složka v kosmetických výrobcích, jako jsou parfémy nebo tělová mléka, v čistících prostředcích pro domácnost a ve voscích. Pouze 1 % se využívá v potravinách a nápojích, zejména v černém, tmavém, oolongovém a zeleném čaji z důvodu jeho charakteristické vůně a chuti. V parfumerii se využívá zejména v květinových typech vůní – odhaduje se, že je přítomen v 90 % všech jemných vonných složek. Kromě čistého linaloolu se v parfumerii využívají také jeho deriváty:

linalylacetát, dihydrolinalool, tetrahydrolinalool, nerol, geraniol, geranylaceton nebo linaloolové oxidy. Linalylacetát, mající květinově-ovocnou vůni připomínající bergamot, vzniká esterifikací linaloolu acethydridem. Dihydrolinalool nebo tetrahydrolinalool vznikají hydrogenací, zatímco nerol a geraniol vznikají izomerací. Geranylaceton vzniká Carrollovou reakcí a slouží také jako důležitý meziproduct při syntéze farnesolu, nerolidolu a izofytolu, který se využívá při výrobě vitamínu E. Linaloolové oxidy vznikají epoxidací a mají sladkou, dřevitou, pronikavou a silně květinovou vůni, které se mimo parfumerie využívá také na přípravu esenciálních olejů. Linalool také patří mezi klíčovou látku chmelově aromatických piv, protože je nejvíce aromatickou složkou chmelových silic. Z tohoto důvodu lze koncentraci linaloolu využít k rozlišení mezi jednotlivými odrůdami chmele [32, 33, 40, 45, 46].

Díky ke své rostlinné všudypřítomnosti, působí linalool také jako přitahovač opylovačů, a to zejména u opylovačů z čeledi mýrovní. Tato látka se svými enantiomery a příbuznými metabolity podílí na interakci mezi rostlinou a opylovačem. Vosovití, smutnice a můry všech velikostí vykazují pozoruhodnou elektrofyziologickou, nervovou a behaviorální (související s chováním) citlivost na různé enantiomery a na různé kvantitativní poměry linaloolu v květinovém buketu. Dvojně vazby a hydroxylová skupina nacházející se na C-3 uhlíku charakterizují skelet linaloolu a znemožňují jeho další úpravu, včetně derivatizace na dobře charakteristické furanoidní a pyranoidní linaloolové oxidy, které jsou běžnou součástí vín, květní vůně nebo papáji. Furanoidní linaloolové oxidy mohou vést ke vzniku šestnácti možných stereoizomerních aldehydů a alkoholů, kolektivně známých jako lilacové sloučeniny. Tyto sloučeniny přitahují specifické skupiny opylovačů, jako jsou noční můry nebo smutnice. Na obrázku 12 je zobrazena přitažlivost a odpudivost některého hmyzu linaloolem nebo lilacovými sloučeninami. Lilacové sloučeniny nefungují pouze jako atraktanty opylovačů, neboť v malých samoopylovacích rostlinách (např. u rostliny huseníček rolní) přispívají k řadě těkavých a netěkavých metabolitů linaloolu. Oba enantiomery, syntetizované v plastidech, jsou oxidovány dvěma enzymy cytochromu P450 (CYP71B31 a CYP76C3 umístěné v endoplazmatickém retikulu) na několik izomerů hydroxy- a epoxylinaloolu, z nichž některé jsou dále přeměněny na netěkavé konjugáty [37].



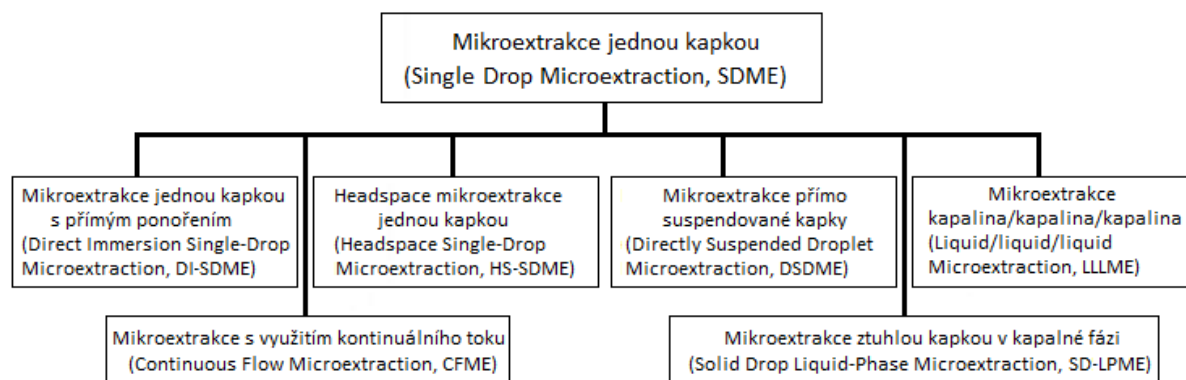
Obrázek 12: Přitažlivost a odpuzivost hmyzu linalolem nebo lilacovými sloučeninami [37]
 Modré šipky značí biosyntetickou transformaci, zelené šipky přitažlivost a červené naopak odpuzování.

1.4 Extrakční techniky

Nejrozšířenější a pravděpodobně jedna z nejstarších extrakčních technik u kapalných vzorků je extrakce z kapaliny do kapaliny. Značnou nevýhodou je ale spotřeba velkého množství vysoce nákladných a někdy též potenciálně nebezpečných organických rozpouštědel, časová náročnost, sklon vytvářet emulze, chyby a ztráty analýz při vícestupňovém uspořádání, neschopnost automatizace, nekompatibilita se stopovou analýzou nebo možné snížení citlivosti následné analytické metody v důsledku získání zředěnějších extraktů. Z tohoto důvodu došlo během posledních desítek let k vývoji nových, efektivnějších a zejména miniaturizovaných technik, jako je například mikroextrakce jednou kapkou (SDME) mající několik modifikací nebo mikroextrakce tuhou fází (SPME). Mikroextrakční techniky mají značné výhody, jako jednoduchost, přesnost, citlivost, účinnost, šetrnost k životnímu prostředí a také kompatibilita s velkým množstvím analytů i analytických přístrojů. Nevýhody jsou pro jednotlivé techniky různé, například technika SPME je zatížena životností, cenou a křehkou povahou vlákna, zatímco technika SDME je zatížena možnou nestabilitou kapky, která může být během extrakce lehce ztracena [47-52].

1.4.1 Mikroextrakce jednou kapkou

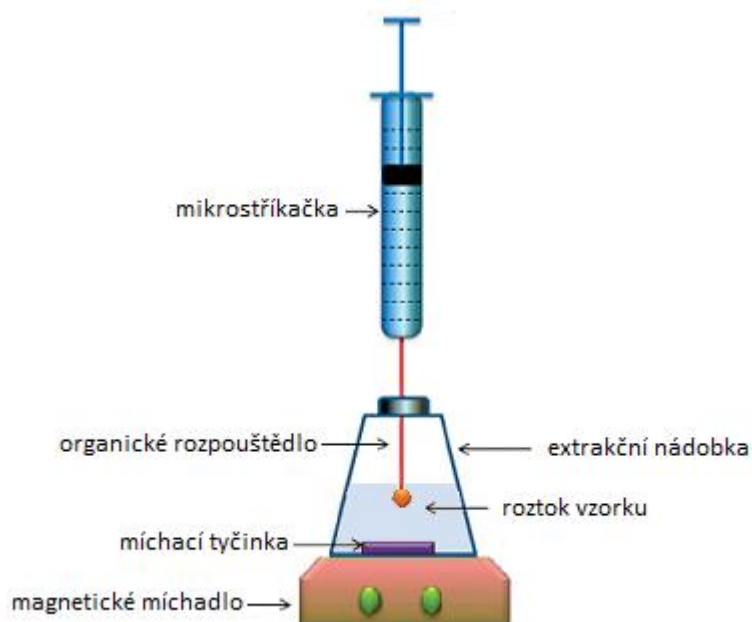
Technika mikroextrakce, označována zkratkou SDME nebo LPME, patří mezi jednorázové mikroextrakce, při které je extrakční médium tvořeno kapkou se vzorkem nemísitelného rozpouštědla nejčastěji o objemu 1 – 10 μl . Po uplynutí doby, nutné k dostatečné sorpci analytu do kapky rozpouštědla, je kapka nejčastěji pomocí mikrostříkačky Hamilton odebrána nebo vtažena zpět do jejího vnitřního prostoru a vyextrahovaný analyt je následně identifikován a kvantifikován nejčastěji pomocí plynové chromatografie. Podle styku extrakční fáze se vzorkem lze metodu rozdělit do šesti podskupin. Rozdělení je zobrazeno na obrázku 13 [51].



Obrázek 13: Rozdělení mikroextrakce jednou kapkou do šesti podskupin [51]

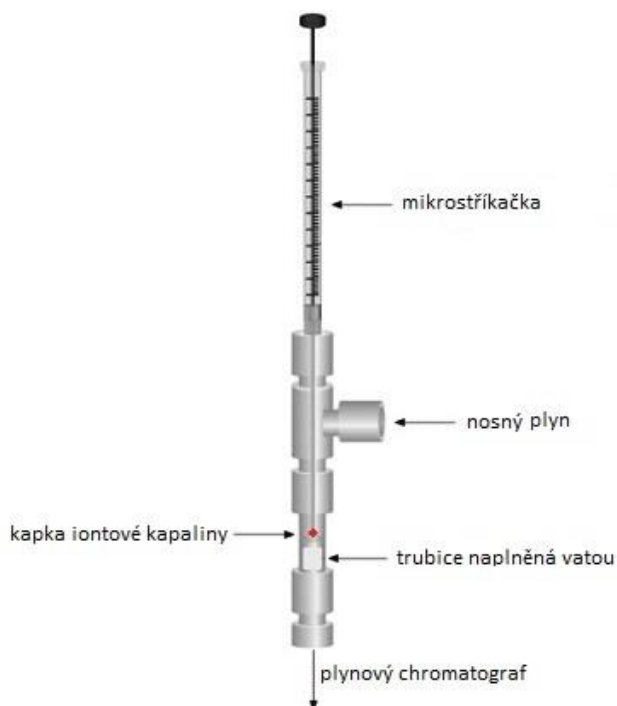
1.4.1.1 Přímá mikroextrakce jednou kapkou

Mikroextrakce, označovaná zkratkou DI-SDME a uvedena na obrázku 14, bývá využívána pro extrakci nepolárních nebo středně polárních sloučenin. Při této extrakci se z důvodu nemísitelnosti vzniklé kapky a roztoku vzorku jako extrakční médium využívají nepolární nebo středně polární rozpouštědla. Princip spočívá v opatrném vytlačení kapky o objemu 0,3 – 3 μl přímo do roztoku vzorku, kde je kapka ponechána po určitou předem stanovenou dobu, po jejímž uplynutí je kapka vtažena zpět do mikrostříkačky a nadávkována do plynového chromatografu. Použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo UV-VIS spektrometrie není z důvodu malého objemu kapky možné, neboť tyto analytické metody vyžadují roztoky o objemu větší než 5 μl , což není pro tuto techniku extrakce z experimentálního hlediska možné (důvodem je nestabilita kapky s rostoucím objemem extrakčního rozpouštědla a také s rostoucí rychlostí míchání). Výhodou je značná jednoduchost, účinnost, nízké náklady, nízká spotřeba organického rozpouštědla, šetrnost k životnímu prostředí a možná automatizace pomocí počítačem řízeného automatického dávkovače vykazující dobrou reprodukovatelnost a účinnost ve srovnání s manuálním uspořádáním. Nevýhodou je již zmíněná vzrůstající nestabilita kapky s rostoucí rychlostí míchání a teplotou vedoucí k odtržení kapky od ústí mikrostříkačky a vyžadující nový experiment, protože přítomnost odtržené kapky organického rozpouštědla výrazně ovlivňuje extrakci, která by tak probíhala do obou kapek, zatímco analyzována by byla pouze kapka visící u špičky mikrostříkačky [47, 51, 53, 54].



Obrázek 14: Uspořádání přímé mikroextrakce jednou kapkou [51]

Extrakci ovlivňuje řada faktorů, jako objem, pH a teplota vzorku, objem organického rozpouštědla, doba extrakce a obsah soli. Velikost a tvar vzniklé kapky závisí na velikosti a tvaru špičky použité mikrostříkačky a na vlastnostech použitého organického rozpouštědla. Při použití klasické mikrostříkačky je objem kapky organického rozpouštědla omezen na 1 – 3 μl s rychlostí míchání okolo 600 ot/min. Vyšších objemů a rychlostí lze dosáhnout využitím iontových kapalin. Jedná se o kapaliny skládající se z organického kationtu a organického nebo anorganického aniontu s bodem tání nižší než 100 °C, nízkou tenzí par, nízkou toxicitou, vysokou termostabilitou a širokým teplotním rozmezím, ve kterém jsou kapalné. Ve srovnání s většinou organických rozpouštědel mají vyšší viskozitu a nižší těkavost. Zmíněná vyšší viskozita zajišťuje tvorbu větších a stabilnějších kapek, které lépe a snadněji přilnou ke špičce mikrostříkačky. Vzhledem k nízké těkavosti lze navíc tyto kapaliny využít pro extrakce probíhající při vyšších teplotách. Použití iontových kapalin tedy vede ke snížení doby vzorkování a ke zvýšení účinnosti extrakce. Značnou nevýhodou je jejich omezená těkavost, vlivem které nejsou tyto kapaliny vhodné pro metodu přímého dávkování do plynového chromatografu. Tento nedostatek lze vyřešit například využitím odnímatelné trubičky naplněné vatou, která umožňuje zavedení vyextrahovaných analytů do systému GC při současném zadržení iontových kapalin v přítomné vatě (obrázek 15). Toto uspořádání zajišťuje přímý kontakt nosného plynu s analyty, a proto není nutná tepelná desorpce analytů z iontové kapaliny [53, 55, 56].



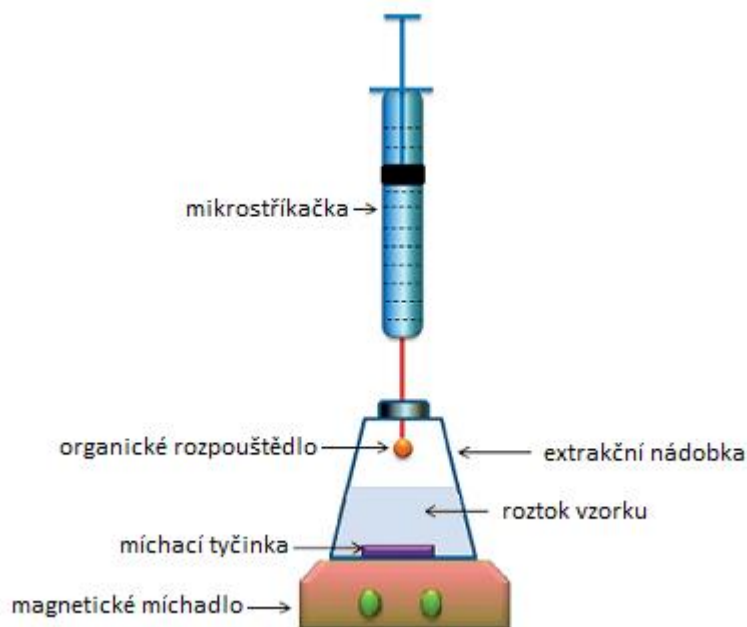
Obrázek 15: Vatou plněný a odnímatelný interface pro iontové kapaliny [56]

Příklady využití této extrakce jsou uvedeny v kapitole 1.4.3.1 Stanovení reziduí pesticidů v bílém víně, růžovém víně a kokosové vodě s využitím metody DI-SDME.

1.4.1.2 Headspace mikroextrakce jednou kapkou

Druhým typem mikroextrakce se zkratkou HS-SDME je headspace mikroextrakce jednou kapkou. Princip i uspořádání je podobné extrakci DI-SDME. Jak je patrné z obrázku 16, rozdíl spočívá v umístění kapky organického rozpouštědla, které se nenachází v roztoku, ale nad roztokem. Technika je tedy vhodná pro látky přirozeně těkavé a pro látky, které lze pomocí derivatizace na látky těkavé převést. Při HS-SDME je vzorek z důvodu zvýšení koncentrace analytů v headspace prostoru obvykle zahříván, čímž vzniká riziko odpaření kapky. V porovnání s extrakcí DI-SDME vykazuje toto uspořádání značnou výhodu, kterou je eliminace ztráty kapky v důsledku míchání, protože kapka není v přímém kontaktu s roztokem vzorku. Další výhody včetně faktorů ovlivňujících extrakci jsou srovnatelné jako u přímé mikroextrakce jednou kapkou [51].

Ukázkovým příkladem derivatizace je převedení fluoridového iontu přítomného ve vzorcích mléka na těkavý fluorovodík, a to pomocí kyseliny sírové. Vzniklý fluorovodík je následně v kapce (o objemu 15 μ l) vodného roztoku uhličitanu sodného převeden zpět na fluoridový iont, který je možné analyzovat pomocí iontové chromatografie [53].



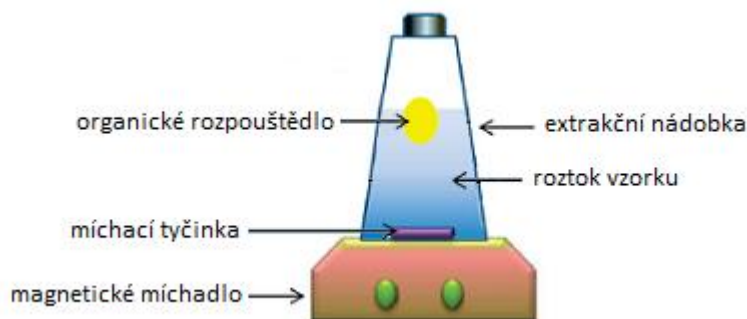
Obrázek 16: Uspořádání headspace mikroextrakce jednou kapkou [51]

Tuto extrakci lze využít například ke stanovení chlorbenzenových sloučenin v pitné a studniční vodě pomocí metody GC-MS. V této studii byly výše uvedené sloučeniny extrahovány z vodného roztoku o objemu 10 ml a obsahujícího 30 % NaCl. Extrakce byla

provedena pomocí toluenové kapky o objemu 2,5 μl , při rychlosti míchání 1000 ot/min a po dobu 5 minut. Kvantifikace byla provedena metodou kalibrační křivky [57]. Jedná se o nejvíce využívaný způsob pro vyhodnocování množství analytu ve vzorku, při kterém se nejprve analyzuje série standardů o různé, ale známé koncentraci analytu (tzv. kalibrační roztoky). Následně je z naměřených hodnot sestaven kalibrační graf a obsah neznámého analytu je určen z rovnice tohoto grafu mající obecný tvar: $y = k \cdot x + q$ [58]. U reálných a komplexních vzorků je často využíván i standardní přídavek eliminující případný matricový efekt. Dalším možným využitím je stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích životního prostředí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s fluorescenční detekcí [59] nebo stanovení jodu ve farmaceutických vzorcích a ve vzorcích potravin v kombinaci s mikroobjemovou UV-VIS spektrofotometrií [60].

1.4.1.3 Mikroextrakce přímo suspendovanou kapkou

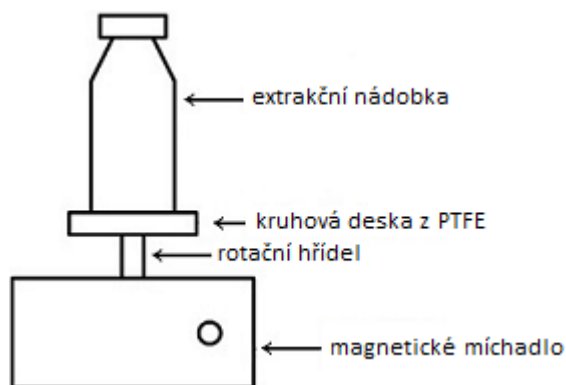
Nová technika mikroextrakce, označována zkratkou DSDME, je založena na extrakci látek ze vzorku pomocí organického rozpouštědla nemísitelného s vodou (např. oktan-1-ol), který se ve formě volné kapky zavádí na povrch vodného roztoku vzorku. Za optimálních podmínek, jak zobrazuje obrázek 17, je částečně ponořená kapka koncentrována v horní středové poloze roztoku [51].



Obrázek 17: Uspořádání mikroextrakce přímo suspendované kapky [51]

Z důvodu dobré selektivity a účinnosti extrakce je nezbytné zvolit správné organické rozpouštědlo, které musí mít nižší hustotu než voda, musí mít velmi nízkou rozpustnost ve vodě a vysoký obohacovací faktor (schopnost extrahovat cílené analyty) mající význam především pro stopovou analýzu. Dále by dané rozpouštědlo mělo mít vysokou viskozitu (z důvodu vzniku dobře oddělitelné extrakční fáze), nízkou těkavost (zamezení jeho ztrátám), mělo by být dostupné v potřebné čistotě a šetrné k životnímu prostředí. Značnou výhodou této techniky je jednoduchost, instrumentální nenáročnost, robustnost, flexibilita výběru provozních parametrů (především při dávkování rozpouštědla a frekvenci míchání), rychlá rovnováha při

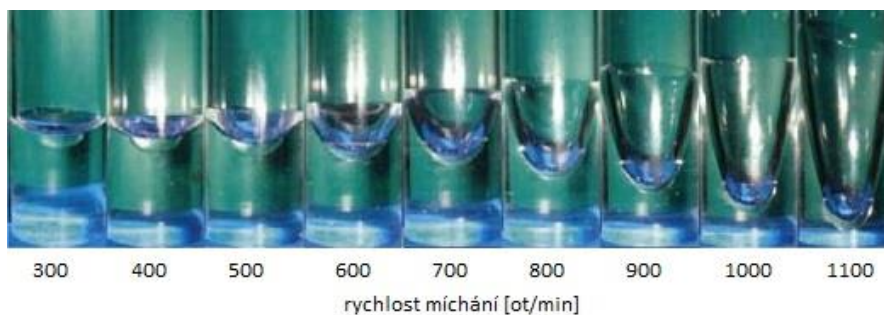
extrakci a možnost kombinace s různými analytickými metodami. Proces extrakce je navíc podporován mícháním pomocí magnetické míchací tyčinky, jejíž tvar a velikost mají významný vliv na tvar kapky. Je tedy nutné správně zvolit parametry míchací tyčinky a z důvodu eliminaci sorpce analytu také její materiál. Nevýhodou jsou odchylky těžiště míchací tyčinky od středu magnetické síly, které se zvyšují s rostoucí rychlostí míchání. Tento nestabilní pohyb míchací tyčinky ovlivňuje spolehlivost a reprodukovatelnost extrakce a také může vytvářet vzduchové bubliny, způsobit emulgaci roztoku nebo vzniklou kapku rozbít. Z tohoto důvodu rychlost míchání obvykle nepřesahuje hodnotu 700 ot/min. Výše uvedené aspekty lze eliminovat použitím extrakční rotační nádoby, pro jejíž rotaci se využívá modifikované obousměrné magnetické míchadlo s kruhovou deskou z PTFE upevněnou pomocí šroubu na rotační hřídeli (obrázek 18) [47-49, 51].



Obrázek 18: Extrakční rotační nádobka [47]

Po uplynutí dostatečné doby je kapka pomocí mikrostříkačky odebrána a analyzována. Výhodou je možnost spojení i s jinými analytickými metodami, jako například vysokoúčinná kapalinová chromatografie s objemem nástříku 5 – 10 μl nebo UV-VIS spektrometrie vyžadující 50 μl . Důvodem je možnost pracovat s větším objemem kapky, což jiné typy mikroextrakce kapkou neumožňují. Omezením je v tomto případě nižší objem kapky (menší než 2 μl), který je z roztoku vzorku obtížné odebíratelný [47, 49, 51].

Hladina roztoku, mající tvar parabolické křivky s nejnižším bodem uprostřed roztoku, se s rostoucími otáčkami míchadla mění. Vlivem této změny se kapka organického rozpouštědla na povrchu kapaliny roztahuje, čímž se účinnost extrakce zvyšuje. Ukázka změny profilu kapalného roztoku (4 ml deionizované vody + 50 μl oktan-1-olu) při různých otáčkách s využitím extrakční rotační nádoby namísto klasické magnetické míchací tyčinky zobrazuje obrázek 19 [47].



Obrázek 19: Změna profilu kapalného roztoku při různých otáčkách [47]

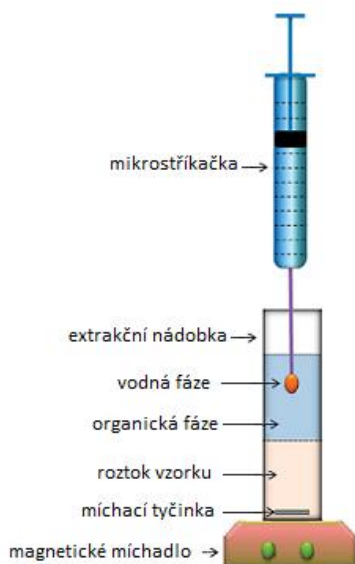
Techniku DSDME lze využít například k izolaci organochlorovaných a pyrethroidních pesticidů z čajů. Autoři článku k extrakci použili 5 ml čajového nálevu, 100 μ l izooktanu a rychlosti míchání 1100 ot/min po dobu 15 minut. Vyextrahované pesticidy byly následně separovány pomocí plynové chromatografie a detekovány detektorem elektronového záchytu. Tímto postupem došlo k detekci 28 pesticidů [61]. Jinou možností využití je separace a stanovení benzenu, toluenu, ethylbenzenu a o-xylenových sloučenin ve vzorcích vod pomocí plynové chromatografie v kombinaci s plamenovým ionizačním detektorem. V této práci byla k extrakci použita kapka oktan-2-onu o objemu 7,5 μ l. Extrakce probíhala při rychlosti míchání 800 ot/min po dobu 25 minut. Kvantifikace byla provedena metodou kalibrační křivky [62]. Další příklad využití je uveden v kapitole 1.4.3.2 Stanovení esterů kyseliny ftalové v kravském mléce s využitím mikroextrakce přímo suspendované kapky.

1.4.1.4 Mikroextrakce v uspořádání kapalina/kapalina/kapalina

Původně zavedená technika mikroextrakce rozpouštědlem se současnou zpětnou extrakcí, která je dnes označována zkratkou LLLME, je vhodná zejména pro slabě kyselé až bazické látky. Tento typ extrakce lze provést v několika modifikacích, například ve spojení s extrakcí SDME poskytující nový typ extrakce označovaný jako mikroextrakce jednou kapkou v uspořádání kapalina/kapalina/kapalina mající několik výhod jako je jednoduchost, časová nenáročnost, snadná manipulace, nízká spotřeba rozpouštědel, vysoká přesnost a také cenová dostupnost. Uspořádání je uvedeno na obrázku 20. Princip této extrakce spočívá v extrakci analytu do organické fáze s následnou zpětnou extrakcí analytu do kapky vodného rozpouštědla visícího u špičky injekční mikrostříkačky v organické fázi. Při tomto uspořádání v roztoku zůstávají látky polární, zatímco nepolární látky se zadržují ve fázi organické a tak lze tímto způsobem značně snížit interference v matrici vzorku. Důležitý je výběr vhodného organického rozpouštědla, které musí mít nižší hustotu než voda (aby se nacházelo nad vodnou fází roztoku) a současně musí být nemísitelné s vodným roztokem vzorku a vodnou fází kapky. Tyto podmínky splňuje např. oktan-1-ol, n-hexan nebo ethylacetát. Extrakce je použitelná zejména

pro analýzu biologických tekutin a vodných roztoků – například k izolaci trojmocného a celkového antimonu ve vodách pomocí toluenu a vodné kapky obsahující 0,2 % povrchově aktivní látky Triton X-114 [51, 53, 63, 64].

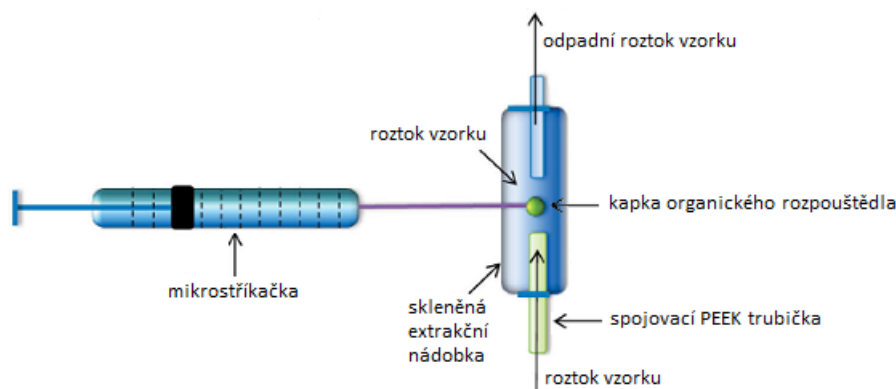
Extrakci lze také využít například ke stanovení patulinu v jablečné šťávě pomocí kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem. V této studii byla extrakce patulinu provedena do ethylacetátu (1,5 ml) a následně do kapky čisté vody (5 μ l). Extrakce probíhala po dobu 20 minut. Vliv teploty a rychlosti míchání na účinnost extrakce nebyl v této studii zkoumán [63]. V jiné studii se autoři článku zaměřili na stanovení adeninu ve vzorcích zeleného čaje pomocí kapilární elektroforézy. Před vlastní extrakcí byly vzorky upraveny následujícím způsobem: 3 g vzorku zeleného čaje byly pomocí ultrazvukové lázně po dobu 20 minut extrahovány 10 ml destilované vody, následovalo odstředování při rychlosti 4500 ot/min po dobu 5 minut, získaný extrakt byl přefiltrován přes membránu z acetátu celulózy a zředěn destilovanou vodou na konečný objem 25 ml. Jako organická fáze byl autory článku zvolen ethylacetát o objemu 200 μ l, zatímco vodnou fází tvořila 0,05 M HCl. Doba extrakce byla 10 minut. Kvantifikace byla provedena metodou vícenásobného standardního přídatku [65]. Principem je změření roztoku vzorku o známém objemu, ale neznámé koncentraci, ke kterému jsou postupně přidávány přídatky standardního roztoku o známém objemu i koncentraci. Neznámá koncentrace se zjistí extrapolací závislosti naměřené plochy (nebo výšky) na změně koncentrace [58].



Obrázek 20: Mikroextrakce jednou kapkou v uspořádání kapalina/kapalina/kapalina [51]

1.4.1.5 Mikroextrakce s využitím kontinuálního toku

Continuous Flow Microextraction (CFME), tedy mikroextrakce s využitím kontinuálního toku, uvedená na obrázku 21, spočívá v zavedení kapky organického rozpouštědla nad výstupní hrdlo spojovací PEEK hadičky ústící do skleněné extrakční nádoby. Touto hadičkou pomocí peristaltického čerpadla průběžně proudí roztok vzorku. Po extrakci je kapka vtažena zpět do mikrostřičky a je analyzována nejčastěji pomocí plynové chromatografie. Značnou nevýhodou je komplikovaná instrumentace spočívající v přítomnosti peristaltických pump, ve ztrátě kapky vlivem kinetické energie toku, v obtížné automatizaci, v nestabilitě kapky definující maximální objem kapky na 5 μl a v možnosti vnesení vody do mikrostřičky a následně i do analytického přístroje, což může vést k problémům (např. při použití spojení GC-FID může docházet ke zhasínání plamene). Výhodou je naopak vyšší obohacovací faktor v mnohem kratším čase, kontakt kapky rozpouštědla s čerstvým roztokem vzorku, nízká spotřeba rozpouštědel, nízké náklady, spolehlivost a přesnost [51, 66-69].



Obrázek 21: Uspořádání mikroextrakce s využitím kontinuálního [52]

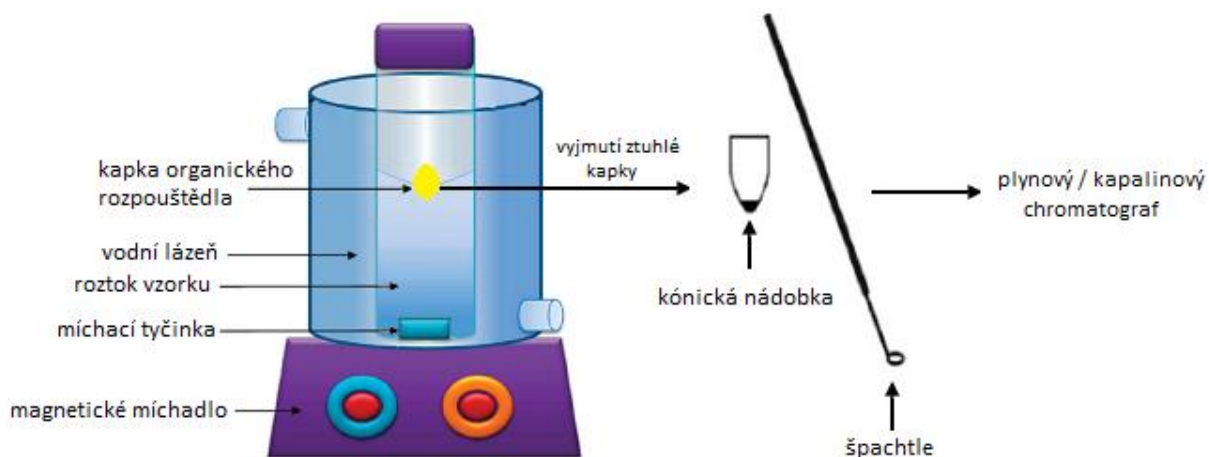
Na extrakci má vliv řada faktorů, mezi které patří typ vybraného organického rozpouštědla, jeho objem, průtok roztoku vzorku, doba extrakce a také povaha analyzovaných látek. Objem organického rozpouštědla má na účinnost extrakce značný vliv. S jeho rostoucím objemem je potřeba delší čas extrakce a také vzrůstá nestabilita kapky, která může být při extrakci snadno uvolněna do roztoku. Výsledkem je špatná citlivost a přesnost. Proto je vhodnější volit objemy do 5 μl . Naopak při malém objemu vzorku bývají analyty neměřitelné. K extrakci se využívají vodou nemísitelná organická rozpouštědla s vysokým obohacovacím faktorem pro daný analyt a s dobrým chromatografickým chováním, například benzen, n-hexan, cyklohexan, chloroform, izooktan, toluen a jiné. Extrakce je řízena distribučním koeficientem analytu mezi vodnou a organickou fází, který je ovlivněn tloušťkou mezifázové vrstvy obklopující kapku a mění se ze změnou průtoku roztoku vzorku. Při nízké průtokové rychlosti dochází vlivem širší mezifázové vrstvy ke snížení účinnosti extrakce. Ke snížení dochází i při velké průtokové

rychlosti, a to vlivem nemožnosti dosažení rovnováhy. Metoda se skládá ze čtyř kroků. Nejprve se vodný roztok vzorku při konstantním průtoku kontinuálně čerpá pomocí peristaltické pumpy přes spojovací hadičky z PTFE do skleněné extrakční nádoby. Po jejím zaplnění následuje opatrné zavedení kapky organického rozpouštědla nad výstup spojovací hadičky. Analyt je extrahován do kapky, která je v roztoku ponechána po určitou předem stanovenou dobu, po jejímž uplynutí je vtažena zpět do mikrostříkačky a analyzována pomocí plynového chromatografu. Během extrakce je roztok vzorku kontinuálně vytlačován ze spojovací trubičky do odpadní komory [67, 69-72].

Mikroextrakci v kontinuálním toku lze v kombinaci s dynamickou mikrovlnně asistovanou extrakcí využít ke stanovení pesticidů v zelenině, které mohou být separovány a detekovány pomocí plynové chromatografie v uspořádání s hmotnostním spektrometrem. Extrakce v této práci byla provedena podle následujících optimalizovaných parametrů: 2,5 μ l toluenu jako organické rozpouštělo, přídavek 3 % NaCl do vodného roztoku vzorku, mikrovlnná energie 250 W, doba extrakci 10 minut a průtok organického rozpouštědla 1 ml/min. Kvantifikace byla provedena opět metodou kalibrační křivky [66].

1.4.1.6 Mikroextrakce ztuhlou kapkou v kapalně fázi

Poslední typ mikroextrakce jednou kapkou, se zkratkou SD-LPME a uveden na obrázku 22, je založen na extrakci látek ze vzorku pomocí organického rozpouštědla, které se ve formě volné kapky, nejčastěji o objemu 7 – 10 μ l, zavádí na povrch vodného roztoku vzorku. Po určité době se nádoba pomocí ledové lázně ochladí, tím organická fáze ztuhne do podoby tuhé kapky, která je z roztoku pomocí špachtle vyjmuta do kónické nádoby. Tuhá kapka při pokojové teplotě opět přechází v kapalinu, která je následně analyzována nejčastěji pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie. Extrakce je podporována mícháním pomocí magnetického míchadla, které zvyšuje účinnost extrakce a zkracuje čas potřebný k dosažení termodynamické rovnováhy. Výhodou této techniky je jednoduchost, rychlost, nízké náklady, vysoký prekoncentrační faktor, přesnost a preciznost. Značným nedostatkem je omezený výběr organického rozpouštědla. Na účinnost extrakce má vliv několik faktorů: druh extrakčního rozpouštědla a jeho objem, pH, objem a teplota roztoku vzorku, rychlost míchání, doba extrakce a přídavek soli. Organické rozpouštědlo by mělo být nemísitelné s vodou, mělo by mít vyšší bod varu, nízký tlak par (z důvodu eliminace jeho vypařování), dobré chromatografické vlastnosti, dobrou extrakční účinnost, teplotu tání v rozmezí 10 – 30 °C a mělo by být kompatibilní s následnou analytickou metodou. Vhodná rozpouštědla společně s jejich teplotou tání jsou uvedena v tabulce 5 [51, 73].



Obrázek 22: Uspořádání mikroextrakce ztuhlou kapkou v kapalné fázi, [51, 73]

Tabulka 5: Rozpouštědla vhodná pro mikroextrakci ztuhlou kapkou v kapalné fázi [73]

Rozpouštědlo	Teplota tání [°C]
Undekan-1-ol	13 – 15
Dodekan-1-ol	17 – 18
Dodekan-2-ol	22 – 24
1-bromhexadekan	17 – 18
Hexadekan	18
1,10-dichlorodekan	14 – 16
1-chloroktadekan	20 – 23

Extrakci lze využít například ke stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích vod pomocí kapky undekan-1-olu o objemu 10 μl . V této studii byla extrakce provedena při teplotě 60 °C po dobu 30 minut a při rychlosti míchání 1250 ot/min. Po uplynutí doby extrakce byla nádobka se vzorkem na 5 minut vložena do kádinky obsahující kusy ledu. Tím došlo ke ztuhnutí undekan-1-olu, který byl následně převeden do kónické nádoby, kde došlo k jeho roztátí. K analýze, která byla provedena pomocí plynového chromatografu, byly použity 2 μl [74].

1.4.2 Mikroextrakce tuhou fází

Technika SPME, znamenající mikroextrakci tuhou fází, byla navržena počátkem devadesátých let. Od té doby byla stále častěji využívána při přípravě vzorku. Principem je extrakce analytu na tuhé vlákno potažené stacionární fází a nacházející se uvnitř kovové jehly. Stacionární fází může být kapalina (polymer) nebo tuhá látka (sorbet). Z tohoto důvodu lze tuto techniku využít k extrakci různých analytů, a to jak těkavých, tak i netěkavých, z kapalných, tuhých nebo plynných vzorků. Je dáno, že tenčí filmy stacionární fáze více sorbují polotěkavé analyty než filmy silnější, které slouží spíše k extrakci těkavých analytů. Dále platí, že s rostoucí tloušťkou filmu stacionární fáze roste citlivost, ale také rovnovážný čas. Za univerzální stacionární fází je považována látka polydimethylsiloxan (PDMS), která patří mezi nepolární stacionární fáze. Je vhodná pro extrakci nepolárních analytů, například těkavých aromatických sloučenin. Příkladem polárního povlaku je polyakrylátové vlákno (PA), které je vhodné například k extrakci fenolů a alkoholů. Existují také smíšená vlákna, která mohou obsahovat kopolymery divinylbenzenu (DVB), syntetické pryskyřice (TRP) nebo Carboxen (CAR, pórovitý sorbet obsahující aktivní uhlí). Tyto látky zvyšují retenci a v důsledku vzájemného účinku podporují adsorpci do stacionární fáze. Adsorpci analytů ovlivňuje polarita a tloušťka stacionární fáze, doba extrakce, rychlost míchání, obsah soli, teplota, pH a objem roztoku vzorku a také vlastnosti a koncentrace jednotlivých analytů. Kvalita vlákna, závisící na výrobci, bývá mezi jednotlivými šaržemi rozdílná. Proto je nutné každé nové vlákno a každé dlouhodobě nepoužívané vlákno kondicionovat. Podmínky kondicionace (teplota a doba) jsou rozdílné dle typu stacionární fáze a jsou stanoveny výrobcem daného vlákna. Výhodou této extrakce je vyextrahování pouze cíleného analytu, případně analytů podobných látek, čímž většina interferencí zůstává v matrici a nemá vliv na konečnou analýzu. Další výhodou je neomezenost při výběru vzorků, která je dána velkým množstvím vláken (přehled vybraných typů vláken je uveden v tabulce 6). Nevýhodou je křehkost vlákna, jeho snadné poškození a nevratná sorpce sloučenin s vysokou molekulovou hmotností [54, 75-77].

Z obrázku 23 je patrné, že extrakci lze provést dvojím uspořádáním. První uspořádání, označované jako DI-SPME, spočívá v přímém ponoření vlákna do roztoku vzorku, který je z důvodu zvýšení rychlosti rovnováhy míchán pomocí magnetické míchací tyčinky. Nevýhodou je značné klesání životnosti vlákna, které je způsobeno objemem, pH a složením roztoku vzorku. Při druhém uspořádání, označovaném zkratkou HS-SPME, se vlákno nachází nad kapalným nebo tuhým vzorkem, analytům je tedy vystaveno v plynné fázi. V případě kapalného roztoku je rychlost rovnováhy opět zvýšena použitím míchací tyčinky. Po extrakci je vlákno v obou případech zasunuto zpět do ochranné kovové jehly, která je následně vložena

do dávkovacího zařízení GC nebo desorpční komory v případě HPLC a vlákno je opět vysunuto. Volba uspořádání závisí na matici vzorku. Obecně platí, že DI-SPME je citlivější pro analyty převážně přítomné ve vodě, pro polotěkavé a netěkavé analyty. Naopak HS-SPME je vhodná pro látky těkavé. Použití DI-SPME nebo HS-SPME u komplexních vzorků obvykle vyžaduje předběžnou úpravu vzorků. Tím je zajištěno zjednodušení matrice a zabránění poškození vlákna. Složitá matrice vzorku může nejenom ovlivňovat extrakci analytů, ale také přesnost a správnost analytické metody. V případě přítomnosti netěkavých sloučenin a sloučenin s vysokou molekulovou hmotností jako jsou bílkoviny, huminové kyseliny, lipidy a další látky ve vzorku, je použití DI-SPME nebo HS-SPME obtížné. Tyto potíže lze eliminovat využitím membránově chráněné SPME, kdy selektivní membrána umožňuje i extrakci analytů z komplexních vzorků. Při tomto uspořádání je vlákno chráněno například porézní polypropylenovou membránou z dutých vláken [77, 78].



Obrázek 23: Uspořádání mikroextrakce tuhou fází [51, 77]

Tato extrakce se velmi často využívá k extrakci těkavých a polotěkavých analytů ze vzorků životního prostředí nebo z biologických a potravinových vzorků. Analyty následně bývají separovány pomocí GC a detekovány vhodně zvoleným detektorem. SPME lze využít i k extrakci slabě těkavých nebo tepelně nestálých analytů (nevhodných pro GC), které bývají separovány pomocí HPLC a detekovány opět vhodným detektorem. V případě GC dochází k desorpci vlivem vysoké teploty. Na účinnou desorpci má vliv několik faktorů, a to těkavost analytů, tloušťka filmu stacionární fáze, doba desorpce, průtok nosného plynu a teplota dávkovacího prostoru GC, která bývá obvykle totožná s teplotou varu nejméně těkavého analytu. Z důvodu odstranění kontaminujících látek způsobujících v GC vysoké pozadí je třeba vlákno před každou analýzou vyčistit pomocí speciálního čističe stříkaček nebo vložením vlákna do dávkovacího prostoru jiného pomocného GC. U HPLC dochází při desorpci nejprve k rozpouštění vyextrahovaných analytů a až poté k dávkování s elučním rozpouštědlem. Desorpci lze provést dynamicky (analyty jsou kontinuálně desorbovány proudem mobilní fáze)

nebo staticky (desorpce probíhá mobilní fází po přesně stanovenou dobu před dávkováním na HPLC kolonu). Kombinace SPME s HPLC je možná také jako *in-tube SPME* a spočívá v sorpci analytů uvnitř křemenné kapilární kolony, které nahrazují původní vlákna. Toto uspořádání, v kombinaci s GC ještě nedostatečně prozkoumané je vhodné pro automatizaci, která poskytuje lepší přesnost a správnost v porovnání v manuálním uspořádáním [54, 77].

Technika SPME má širokou oblast použití. Lze ji využít například k izolaci aromatických těkavých složek z ovocných šťáv, k izolaci aromatických látek z mleté kávy, k izolaci kofeinu a dalších aromatických látek z různých nápojů, jako džus, kola, čaj, brandy nebo pivo, které obsahuje více než 800 sloučenin, z nichž mnoho přispívá k charakteru piva [77]. Například Jelen a kol. [79] provedli stanovení 12 alkoholů a esterů v pivu pomocí techniky SPME za použití polyakrylátového vlákna. Extrakce byla provedena v uspořádání headspace v kombinaci s GC-FID.

Tabulka 6: Přehled vybraných typů vláken [80]

Stacionární fáze	Polarita	Retence
7-μm PDMS	Nepolární	Slabá
100-μm PDMS	nepolární	Střední
30-μm PDMS	Nepolární	Vysoká
85-μm polyakrylát (PA)	Polární	Střední
65-μm PDMS-divinylbenzen (DVB)	Bipolární	Vysoká
65-μm CW(Carbowax[®])-DVB StableFlex	Polární	Vysoká
85-μm CarboxenTM-PDMS StableFlex	Bipolární	Vysoká
50-μm/30-μm DVB-CarboxenTM-PDMS StableFlex	Bipolární	Vysoká

1.4.3 Příklady využití mikroextrakčních metod pro stanovení těkavých složek potravin

1.4.3.1 Stanovení reziduí pesticidů v bílém víně, růžovém víně a v kokosové vodě s využitím metody přímé mikroextrakce jednou kapkou

Používání pesticidů (např. azoxystrobin, cymoxanil, fluazinan a dalších) k ochraně vinné révy před chorobami způsobenými hmyzem, houbami a jinými látkami bylo rozšířené po celém světě. Mnoho výrobců využívalo tyto látky z důvodu nižších pořizovacích nákladů, času a také snadnému použití. Neodborné používání pesticidů vyvolalo velké obavy ohledně zdraví a bezpečnosti spotřebitelů, neboť rezidua pesticidů přecházejí během procesu výroby i do výsledného vína. Ačkoliv výroba vína zahrnuje různé kroky, při kterých dochází ke změně a snižování koncentrací pesticidů, nedochází k jejich úplnému odstranění, pouze jsou hladiny těchto látek ve výsledném víně výrazně nižší než v původních hroznech. Při výběru extrakční metody a následné separační techniky je potřeba zohlednit rozdílné vlastnosti těchto látek, jako jsou rozdílná polarita, rozpustnost, těkavost, rozdílný rozdělovací koeficient n-oktanol/voda a také rozdílné složení vín. Z hlediska značných výhod, jako jsou ekonomická nenáročnost, miniaturizace, šetrnost k životnímu prostředí, jednoduchost, rychlost a nízká spotřeba organických rozpouštědel, byla autory článku vybrána extrakční technika SDME, která pro zajištění nejlepších extrakčních podmínek byla optimalizována. Autoři uvádí, že extrakce je neúčinnější při rychlosti míchání 200 ot/min, po dobu 30 minut, z okyseleného (pomocí HCl zajišťující vyšší stabilitu analytů) vzorku vín o objemu 10 ml, pomocí kapky o velikosti 1 μ l a při použití toluenu jako organického rozpouštědla. Takto optimalizovaná metoda je účinná pro extrakci pesticidů jak z vodných roztoků, tak i z roztoků obsahující až 15 % ethanolu. Z hlediska selektivity a citlivosti bylo zvoleno spojení plynové chromatografie a hmotnostního spektrometru s elektronovou ionizací. K separaci byla využita kapilární kolona Restek Rtx®-1MS o rozměrech 30 m x 0,25 mm a s tloušťkou filmu 0,25 μ m. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium s průtokem 1 ml/min. Teplotní program kolony byl: 60 °C po dobu 1 minuty, zvýšení na 200 °C rychlostí 25 °C/min, poté na 280 °C rychlostí 10 °C/min a nakonec na teplotu 300 °C rychlostí 5 °C/min, která byla udržována po dobu 1,4 minuty. Celkový čas analýzy byl 20 minut. Kvantifikace pesticidů byla provedena v režimu SIM (Selected Ion Monitoring, kdy se snímají pouze vybrané ionty), který je citlivější než režim TIC (Total Ion Current, při kterém dochází ke snímání celého hmotnostního spektra

požadovaného rozsahu m/z). Pro každý analyt byly vybrány dva ionty: první pro kvantifikaci, druhý pro potvrzení [81].

Spojení techniky SDME s metodou GC-MS lze využít také ke stanovení reziduí pesticidů v kokosové vodě. Kokosová voda, představující bohatý zdroj cukrů, solí, vitamínů, minerálů a aminokyselin, je čirý, bezbarvý, sladký nápoj s mírně nakyslou chutí a s pH v intervalu 4,2 – 6,0. Tato voda je na trh uváděna v přírodní formě nebo po různých sterilizačních krocích a po přidání konzervačních látek ve formě zpracované. Zdrojem této vody jsou kokosy, jejichž růst je často vlivem škůdců a hmyzu inhibován. Z důvodu zvýšení produkce kokosu jsou palmové stromy ošetřovány pesticidy. Přítomnost reziduí těchto látek může z důvodu jejich možné toxicity představovat značné riziko na zdraví spotřebitelů. Pesticidy, zahrnující širokou škálu látek z různých chemických tříd, se často liší svou těkavostí, polaritou, rozpustností a svými rozdělovacími koeficienty n-oktanol-voda. K ochraně palmových stromů se nejčastěji využívají karbamáty (karbofuran), pyrethroidy (bifentrin) a organofosfáty (dimethoát, malathion a jiné). Autoři článku uvádí jako nejlepší podmínky pro extrakci stejné extrakční podmínky jako v případě stanovení reziduí ve výše uvedených vínech. Ovšem z důvodu výskytu částic kokosového oleje ve vzorcích kokosových vod, a tím i možné nestability kapky, byly vzorky před extrakcí po dobu 5 minut odstředovány. K separaci a následné detekci bylo využito totožné spojení plynové chromatografie s hmotnostním detektorem jako při analýze výše uvedených vín (stejná kolona, stejný průtok, stejný teplotní program i stejný režim hmotnostního spektrometru) [82].

1.4.3.2 Stanovení esterů kyseliny ftalové v kravském mléce s využitím metody mikroextrakce přímo suspendované kapky

Ftaláty, neboli estery kyseliny ftalové, nacházejí v průmyslu uplatnění především jako plastifikátory, které zvyšují průhlednost, pružnost, trvanlivost a dlouhověkost plastů. Tyto látky mohou být z plastických materiálů uvolňovány do okolního prostředí a také do potravin. Tím dochází k vystavení spotřebitelů těmto látkám, jejichž vysoké hladiny a zřejmá toxicita ovlivňuje lidské zdraví (primárně dochází k zasažení ledvin, jater a varlat) a životní prostředí. Z důvodu snadné absorpce ftalátů přes kůži představuje největší riziko expozice u dětí a batolat, u kterých může docházet k feminizaci samčích kojenců s následným narušeným vývojem pohlavních orgánů a zrání varlat. Do mléka se ftaláty nejčastěji dostávají z materiálů využívaných během mechanického dojení nebo z obalového materiálu. K izolaci ftalátů autoři využili techniku DSDME. Před vlastní extrakcí byly vzorky mlék upraveny. Úprava spočívala v odstranění bílkovin jejich sražením pomocí kyseliny trichloroctové. K 10 ml každého vzorku

bylo přidáno 10 ml kyseliny trichloroctové o koncentraci 10 g/l, vzniklá směs byla pomocí vortexu po dobu 1 minuty důkladně promíchána, následně byla směs při 4000 ot/min a 10 minutách odstředěna a 5 ml čirého roztoku supernatanzu bylo převedeno do skleněné extrakční nádoby o objemu 12 ml. K takto připravenému roztoku bylo přidáno 100 μ l cyklohexanu. Extrakce byla provedena při rychlosti míchání 1100 ot/min po dobu 10 minut a bez přídavku NaCl. Separace a následná detekce byla provedena pomocí plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem (systém Shimadzu QP2010 plus). K separaci byla použita kapilární kolona VF-5 o rozměrech 30 mm x 0,25 mm a s tloušťkou filmu 0,25 μ m. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium s průtokem 1 ml/min. Teplotní program kolony byl: 60 °C po dobu 2 minut, zvýšení na 220 °C rychlostí 20 °C/min a držení této teploty po dobu 2 minut, zvýšení na 250 °C rychlostí 3 °C/min a držení po dobu 1 minuty a konečné zvýšení na teplotu 300 °C rychlostí 5 °C/min a udržení po dobu 5 minut. Hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací pracoval při energii 70 eV, teplotě zdroje 230 °C, teplotě rozhraní 280 °C a při teplotě kvadrupólu 150 °C. Kvantifikace byla provedena pomocí ploch píků získaných měřeními v režimu SIM a množství jednotlivých ftalátů bylo vyhodnoceno metodou vnitřního standardu [83]. Tato metoda spočívá v přidání roztoku standardu o známém objemu a koncentraci do roztoku vzorku. Celá analýza se tak realizuje v jediném nástřiku. Metodu lze provést přímým porovnáním naměřených hodnot nebo způsobem kalibrační křivky. Jako vnitřní standard se využívá látka, která je svými vlastnostmi podobná analytu, která se dobře separuje a která se bude eluovat v blízkosti analytu [58].

1.4.3.3 Stanovení polotěkavých aditiv ve víně s využitím metody mikroextrakce tuhou fází v uspořádání headspace

Falšování vín je rozšířené po celém světě. Přidávání dalších chemických látek do vína je přijatelné pouze v povolených koncentracích. Zvýšené koncentrace přírodních nebo syntetických látek může změnit sensorické vlastnosti vína. Pozornost je věnována zejména třem přídatným látkám, a to propylenglykolu, kyselině sorbové a kyselině benzoové. Podle Nařízení Komise (EU) č. 1130/2011 [84] a také dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 130/2010 Sb. [85] je nejvyšší povolené množství propylenglykolu 1000 mg/kg a kyseliny sorbové 200 mg/kg. Přípustné množství kyseliny benzoové není v nařízení ani ve vyhlášce definováno, ale dle Nařízení Celní unie Ruska, Kazachstánu a Běloruska o bezpečnosti alkoholických nápojů [86] je maximální povolená koncentrace kyseliny benzoové 300 mg/kg. Ke stanovení těchto látek lze využít kapalinovou chromatografii s ultrafialovým detektorem nebo s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Stanovení propylenglykolu je ale touto metodou časově náročné,

protože z důvodu vysoké polariry, a tedy vysoké afinity k vodě, a špatné retenci je potřeba provádět derivatizaci pomocí fenylyzokyanátu nebo pomocí p-toluensulfonylizokyanátu. Zatímco stanovení těchto látek pomocí plynové chromatografie je méně náročné. Z důvodu vysoké koncentrace vody a netěkavých látek v matrici je přímé vstřikování vzorků vín do systému GC nevhodné. Proto se k izolaci výše uvedených polotěkavých přídatných látek volí vhodná extrakční technika, např. technika SPME. Stanovení je ale komplikováno silnou retencí analytů ethanolem a vodou, maticovým efektem a soutěžením o sorpční místa na vláknech s těkavějšími a hydrofóbními složkami vína (např. alkoholy a estery). Z důvodu odstranění vody, ethanolu a dalších těkavých sloučenin lze vzorky před vlastní extrakcí odpařit. Teplota odpařování se volí s cílem urychlit proces a zkrátit dobu přípravy vzorku. Tato teplota musí být pod bodem varu vody a pod teplotou transformace a karamelizace cukrů přítomných ve víně. Vhodnou je teplota pod 90 °C, pod kterou nebyly zjištěny žádné uvedené změny ve vzorcích. Doba odpařování, závisající na obsahu cukru, se nejčastěji pohybuje v intervalu 45 – 60 minut a je tím rychlejší, čím více cukrů vzorek obsahuje [86].

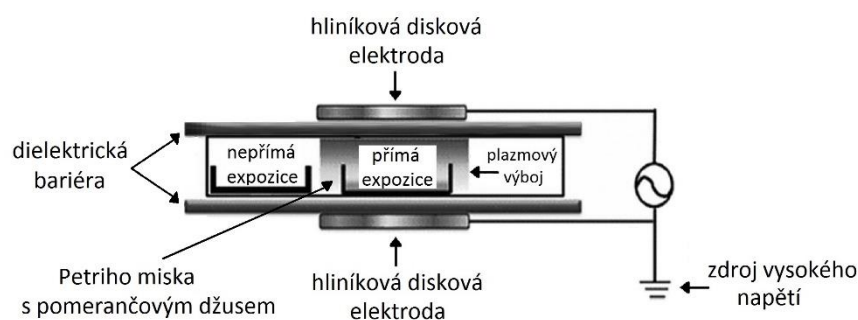
Autoři článku k extrakci využili techniku SPME v uspořádání headspace a za použití vlákna CAR/PDMS o tloušťce filmu 85 µm. Autoři dále uvádí, že nejlepší účinnosti extrakce všech analytů bylo dosaženo při teplotě 85 °C po dobu 2 minuty pro bílá vína a 3 minuty pro červená vína (tím byla eliminována konkurence mezi analyty a maticovými složkami). Separace vyextrahovaných látek byla provedena pomocí plynového chromatografu při průtoku hélia jako nosného plynu 1,0 ml/min a při použití kolony DB-WAXetr o rozměrech 60 m x 250 µm s tloušťkou filmu 0,50 µm. Teplota kolony byla programově měněna ze 40 °C na 240 °C rychlostí 10 °C/min. Rozseparované látky byly následně detekovány hmotnostním spektrometrem ve skenovacím režimu [86].

Kvantifikace u techniky SPME lze provést trojím způsobem: metodou externí kalibrace, metodou vnitřního standardu nebo metodou standardního přídávku využívající se zejména při složitější matrici vzorku. Výhodou standardního přídávku je eliminace výběru vnitřních standardů, které by měly mít podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako analyty, a také kontrola maticového efektu [86].

1.4.3.4 Stanovení těkavých sloučenin v pomerančovém džusu s využitím metody mikroextrakce tuhou fází v uspořádání headspace

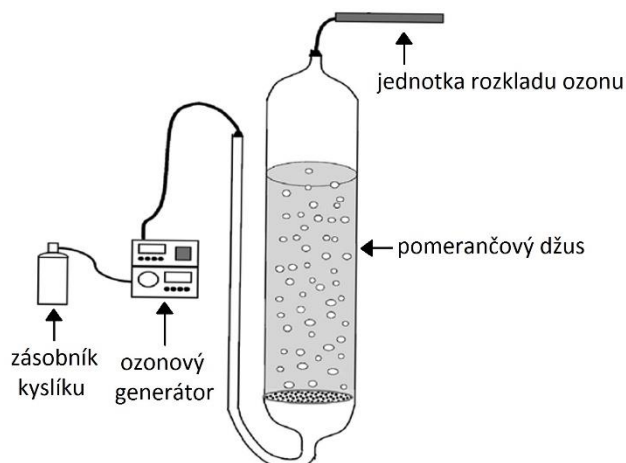
Ovocné výrobky, mezi které patří také džusy, bývají vystaveny konzervačním procesům zabraňující růstu mikroorganismů. Tím je zajištěna delší trvanlivost, stabilita a bezpečnost výrobků. Konzervaci lze provést několika způsoby, např. působením ozonu nebo plazmy představuje dvě technologie úspěšně inhibující růst mikroorganismů. Účinek ozonu způsobuje inhibici bakterií *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Salmonella enterica* a dalších, zatímco plazma inhibuje růst bakterií *Bacillus subtilis*, *Bacillus atropheus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* a dalších [87].

Konzervace pomocí plazmy se provádí za použití plazmového generátoru (např. Phenix Technologies DBD-ACP, model 6CP120/60-7,5). Pomerančový džus se dává do polypropylenové Petriho misky nacházející se v polypropylenové nádobce, která je utěsněna polymerním filmem o tloušťce 50 μm sloužícím jako dodatečná vrstva dielektrické bariéry. Nádobka je umístěna mezi dvě hliníkové diskové elektrody o průměru 15 cm a vzdálené od sebe 22 cm. Napětí je řízeno pomocí osciloskopu. V této studii byly vzorky vystaveny po dobu 60 s přímé a nepřímé expozici plazmy. Z důvodu odstranění stop ozonu a plynných sloučenin vzniklých z plazmy bývají vzorky po ošetření po dobu 24 hodin uchovány při pokojové teplotě. Experimentální uspořádání je uvedeno na obrázku 24 [87].



Obrázek 24: Uspořádání konzervační metody využívající plazmu [87]

Konzervace ozonem se provádí pomocí ozonového generátoru (např. Ozone service model OL80F). Čistý kyslík, nezbytný pro výrobu ozonu, je dodáván ze zásobníku kyslíku. Vzniklý ozon prochází kolonou obsahující pomerančový džus rychlostí 12 ml/min. Průtok čistého kyslíku a vzniklého ozonu je řízen pomocí regulátoru průtoku plynu. Přebytek ozonu je odstraněn v jednotce rozkladu ozonu. Z důvodu eliminace tvorby pěny v koloně se do vzorku přidává sterilní protipěnové činidlo (emulze Antifoam B). Experimentální uspořádání je uvedeno na obrázku 25 [87].



Obrázek 25: Uspořádání konzervační metody využívající ozon [87]

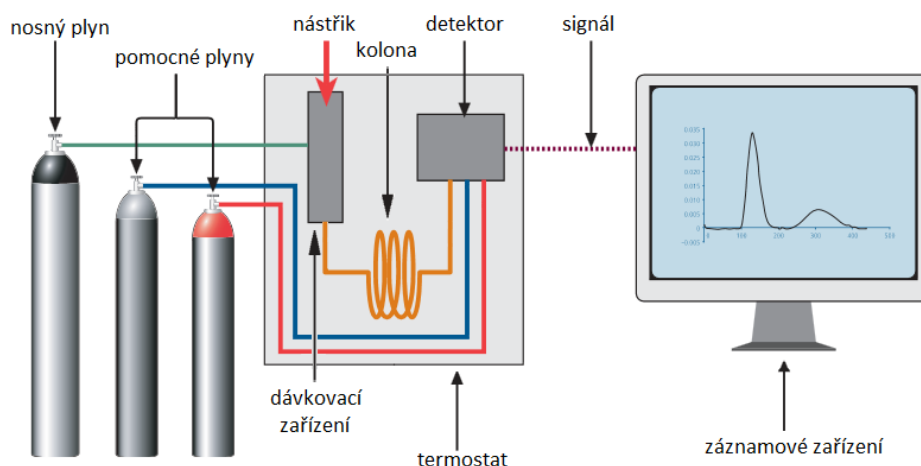
K extrakci těkavých látek autoři článku využili techniku SPME s CAR/PDMS vláknem o tloušťce filmu 85 μm v uspořádání headspace. Extrakce byla provedena při rychlosti míchání 500 otáček za minutu po dobu 30 minut. Po extrakci bylo vlákno zavedeno do plynového chromatografu Agilent 5977A vybaveného kapilární kolonou HP-5MS o rozměrech 30 m x 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm . Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1 ml/min. Vlákno bylo v chromatografu ponecháno při teplotě 240 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minut. Teplota dávkovacího zařízení byla 240 $^{\circ}\text{C}$, zatímco teplota převodníku byla 280 $^{\circ}\text{C}$. Teplota kolony programově rostla dle uvedených podmínek: 40 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 4 minut, zvýšení na teplotu 80 $^{\circ}\text{C}$ rychlostí 2,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, zvýšení na 110 $^{\circ}\text{C}$ rychlostí 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a následně zvýšení na konečnou teplotu 220 $^{\circ}\text{C}$ rychlostí 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, která byla udržována po dobu 23 minut. Rozseparované látky byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru s elektronovou ionizací pracujícího při 70 eV v hmotnostním rozsahu skenování 50-600 m/z. Získaná hmotnostní spektra byla porovnávána s literaturou a jednotlivé složky byly identifikovány porovnáním jejich retenčních indexů s hodnotami získanými pro řadu C8 – C30 n-alkanů [87].

1.5 Plynová chromatografie

Separální chromatografická technika, často označována zkratkou GC z anglického *gas chromatography*, nachází uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích a to jak v chemickém, tak i v petrochemickém nebo farmaceutickém průmyslu. Tato metoda, využívající se především k analýze organických látek, je založena na separaci jednotlivých složek vzorku, které lze následně kvalitativně a kvantitativně vyhodnotit. Jedná se tedy o metodu kvalitativní a kvantitativní analýzy. Podmínkou dobré separace je teplotní stálost a současná těkavost vzorku, jehož složky jsou rozdělovány mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, a to mezi pohyblivou mobilní fází a nepohyblivou stacionární fází. Principem dělení vzorku je rozdílná afinita jednotlivých složek vzorku ke stacionární fázi, čímž dochází k jejich zachycování a následnému zadržování stacionární fází. Tímto způsobem jsou složky vzorku od sebe odseparovány a na konci stacionární fáze se nacházejí složky nejméně zadržované. V případě plynové chromatografie je mobilní fází nosný plyn pohybující se přes stacionární fází, která je umístěna v chromatografické náplňové nebo kapilární koloně [88-90].

Plynový chromatograf, jehož schéma je zobrazeno na obrázku 26, se skládá ze zdroje nosného plynu, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a záznamového zařízení. Dávkovací zařízení, kolona a detektor jsou vyhřívány na teplotu zajišťující plynné skupenství vzorku po celou dobu analýzy. Běžně používaným nosným plynem, který nesmí reagovat se stacionární fází (měl by být inertní), je helium nebo dusík, lze však použít i vodík nebo argon. Volba nosného plynu závisí zejména na typu použité kolony a detektoru, ale také na jeho bezpečnosti a na jeho čistotě (nečistoty vyvolávají šum nulové linie, zhoršují citlivost metody a mohou rozkládat stacionární fází). Nosný plyn je dodáván z tlakové láhve a obvykle prochází přes čistící zařízení (záchyt vlhkosti a nečistot, zejména odstranění stopového množství reaktivního kyslíku nevratně poškozujícího stacionární fází), dále přes redukční systém (zajištění souvislého nebo programově se měnícího průtoku nosného plynu) do dávkovacího zařízení a následně do kolony. Vzorek je po nadávkování odpařen a v podobě par je unášen proudem nosného plynu do chromatografické kolony, kde dochází k vlastní separaci. K dávkování vzorků slouží zpravidla injekční stříkačky. V závislosti na uspořádání přístroje existuje několik technik dávkování. Vzorek může být vstříkovan buď přímo do kolony (*on column*) nebo lze nástřik provést pomocí děliče toku (*split injection*), bez děliče toku (*splitless injection*) nebo využít koncentrátor na počátku kolony. Důležité je rychlé odpaření vzorku. V koloně, které mohou být náplňové nebo kapilární, dochází k separaci složek vzorku na základě jejich rozdílné afinity ke stacionární fázi [89-91].

Rozdělené složky vzorku vystupující z kolony procházejí detektorem reagující na přítomné složky v nosném plynu. Typ použitého detektoru závisí na povaze analyzovaných sloučenin. Z důvodu možné kondenzace složek jsou detektory zahřívány na maximální provozní teplotu kolony. Výstup detektoru je zaznamenán ve formě chromatogramu jako závislost signálu na čase. Výsledný chromatogram se skládá ze série elučních křivek (píků), přičemž každá křivka představuje určitou složku vzorku, která je charakterizována svým elučním časem (kvalitativní analýza) a plochou nebo výškou píku vypovídající o přítomném množství (kvantitativní analýza) [91, 92].

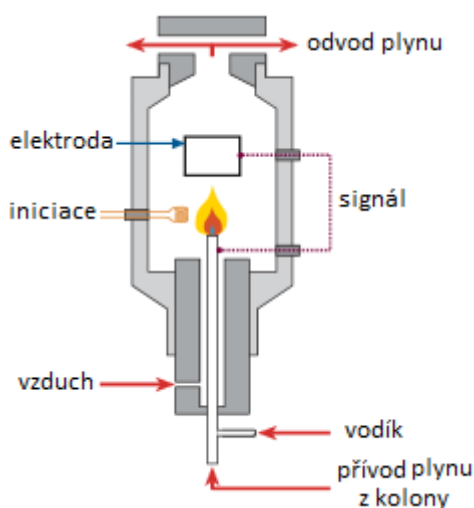


Obrázek 26: Schéma plynového chromatografu [89]

Separace složek vzorku probíhá v chromatografických kolonách naplněných stacionární fází. Náplňové kolony jsou ocelové nebo skleněné trubice s průměrem 2 – 3 mm a délkou 1 – 3 m. Tyto kolony, mající v porovnání s kapilárními kolonami vyšší kapacitu, jsou plněné sorbenty (např. aktivní uhlí, oxid hlinitý, silikagel apod.) nebo tuhými a inertními nosiči pokrytými kapalnou fází. Oproti tomu kapilární kolony, nejčastěji vyrobené z taveného oxidu křemičitého, mají obvykle průměr 0,2 – 0,53 mm, délku 5 – 30 m a tloušťku filmu stacionární fáze 0,25 – 5 μm . Stacionární fáze je v tomto případě ve formě tenké vrstvy upevněna přímo na vnitřní stěně kapiláry. Z důvodu pružnosti kolony, její ochrany před zlomením a ochrany do teploty 350 $^{\circ}\text{C}$ je kapilára pokryta polyimidovou vrstvou. Podle způsobu umístění stacionární fáze se kapilární kolony dělí na tři typy, a to na kolony WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) mající vnitřní stěny kapiláry pokryté tenkým filmem kapalné stacionární fáze, na kolony SCOT (*Support Coated Open Tubular*) mající vnitřní stěny pokryté vrstvou nosiče se zakotvenou kapalinou a na kolony PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) mající vnitřní stěny pokryté tenkou vrstvou adsorbentu (např. aluminu) [90, 92].

K indikaci rozseparovaných složek vzorku slouží detektor, převádějící fyzikálně chemickou vlastnost analytů na měřitelný signál, který je zaznamenán jako závislost signálu daného detektoru na čase (tzv. chromatogram). V plynové chromatografii se nejčastěji využívá tepelně-vodivostní detektor (TCD), detektor elektronového záchytu (ECD), plamenový ionizační detektor (FID) nebo hmotnostní spektrometr (MS) [89, 90].

Plamenový ionizační detektor, označován zkratkou FID z anglického *Flame Ionization Detector* a zobrazen na obrázku 27, je detektor poměrně citlivý, téměř univerzální, ale destruktivní. Princip tohoto detektoru spočívá ve spálení vzorku v plameni, který vzniká hořením směsi vodíku a vzduchu. Spálením dochází k ionizaci vzorku a tím ke vzniku fragmentů iontového nebo radikálového typu, které jsou pomocí jedné elektrody nabity na konkrétní potenciál a následně jsou přitahovány druhou elektrodou, na které získaný potenciál odevzdávají. Tím dochází mezi elektrodami k tvorbě ionizačního proudu, který se měří a který je přímo úměrný počtu iontů [90, 93, 94].



Obrázek 27: Plamenový ionizační detektor [93]


2 Experimentální část

2.1 Vzorky, chemikálie, přístroje a ostatní zařízení

2.1.1 Vzorky

Reálné vzorky pív vyrobených jak klasickým způsobem (viz obrázek 3), tak způsobem studeného chmelení, byly zakoupeny v obchodní síti hypermarketů Albert Hypermarket, Kaufland a Globus. Pouze vzorek Raven – Gunslinger byl dodán Ing. Karolínou Adámkovou. Zakoupeny byly vždy dva vzorky od jedné značky – s výjimkou značky Bakalář, u kterého byly zakoupeny vzorky tři a značky Raven, od které byl dodán pouze jeden vzorek. Z důvodu vzájemného porovnávání za studena chmelených a klasicky chmelených pív byly vždy zakoupeny vzorky s blízkým obsahem alkoholu. Veškeré vzorky jsou společně s jejich základními údaji uvedeny v tabulkách 7 a 8.

Tabulka 7: Reálné vzorky pív vyrobených klasickým způsobem

Balení	Značka	Druh	Výrobce	Obsah alkoholu
	Bakalář	Světlý ležák	Tradiční pivovar v Rakovníku a.s. (Rakovník, ČR)	4,9 % obj.
	Krušovice	Dvanáctka	Heineken Česká republika a.s. (Krušovice, ČR)	5,0 % obj.
	Lobkowicz	Premium ležák	Pivovary Lobkowicz Group a.s. (Praha, ČR)	4,7 % obj.

Tabulka 7: Reálné vzorky pív vyrobených klasickým způsobem – pokračování

Balení	Značka	Druh	Výrobce	Obsah alkoholu
	Postřižinské	Francinův ležák	Pivovar Nymburk spol. s r.o. (Nymburk, ČR)	5,1 % obj.
	Primátor	Premium	Primátor a.s. (Náchod, ČR)	5 % obj.
	Svijany	Svijanský Máz	Pivovar Svijany a.s. (Svijany, ČR)	4,8 % obj.

Tabulka 8: Reálné vzorky pív vyrobených způsobem studeného chmelení

Balení	Značka	Druh	Výrobce	Obsah alkoholu
	Bakalář	Světlý ležák za studena chmelený	Tradiční pivovar v Rakovníku a.s. (Rakovník, ČR)	5,2 % obj.
	Bakalář	Nealkoholický za studena chmelený	Tradiční pivovar v Rakovníku a.s. (Rakovník, ČR)	Max. 0,5 % obj.
	Krušovice	Ležák za studena chmelený	Heineken Česká republika a.s (Krušovice, ČR)	4,8 % obj.
	Lobkowicz	Premium Ale	Pivovary Lobkowicz Group a.s. (Praha, ČR)	4,4 % obj.
	Postřižinské	Jubilejní Hrabalův ležák	Pivovar Nymburk spol. s r.o. (Nymburk, ČR)	5,8 % obj.

Tabulka 8: Reálné vzorky pív vyrobených způsobem studeného chmelení – pokračování

Balení	Značka	Druh	Výrobce	Obsah alkoholu
	Primátor	India Pale Ale	Primátor a.s. (Náchod, ČR)	6,5 % obj.
	Svijany	Svijanský Rytíř	Pivovar Svijany a.s. (Svijany, ČR)	5,0 % obj.
	Raven	Gunslinger	Pivovar Raven (Plzeň, ČR)	6,4 % obj.

2.1.2 Chemikálie

- 97% Linalool (Sigma-Aldrich spol. s r.o., Praha, ČR),
- 35% HCl p.a. (Penta spol. s r.o., Praha, ČR),
- NaOH p.a. (Penta spol. s r.o., Praha, ČR),
- rozpouštědla
 - 99% p-xylen (Merck KGaA, Darmstadt, Německo),
 - 97% ethanol (Lach-Ner spol. s r.o., Neratovice, ČR),
- plyny
 - vodík 3.0 (stupeň čistoty 99,9 %, Linde Gas a.s., Praha, ČR),
 - centrální rozvod dusíku (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR),
 - centrální rozvod tlakového vzduchu (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR),
- ostatní
 - centrální rozvod destilované vody (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR),

2.1.3 Přístroje

Analýzy byly prováděny pomocí plynového chromatografu Hewlett Packard 5890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) zobrazeného na obrázku 28, který je vybaven plamenovým ionizačním detektorem. Veškeré naměřené hodnoty byly vyhodnocovány pomocí programu CSW32 – Chromatography Station for Windows (DataApex, Praha, ČR).



Obrázek 28: Plynový chromatograf Hewlett Packard 5890

2.1.4 Ostatní zařízení

- Magnetické míchadlo s nastavitelným intervalem otáček 0 – 2500 ot/min (IKA® Color Squid, Staufen, Německo)
- Magnetická, válcová, hladká míchací tyčinka s délkou 20 mm a průměrem 6 mm (IKA®, Staufen, Německo)
- Mikrostříkačka se sešikmeným hrotem Hamilton o objemu 10 µl (Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko)
- Vlákno se stacionární fází 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, Stableflex (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA)
- SPME držák pro ruční vzorkování (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA)
- Třepačka Vibramax 100 s nástavcem (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Německo)
- čistič stříkaček Hamilton – v. č. 76615, 220 V (Reno, NV, USA)
- pH metr – CG 842 (Schott AG, Mainz, Německo)
- automatické mikropipety (Biohit Oyj, Helsinky, Finsko)

- Špičky:
 - Standard 0,5 – 20 μ l, kat. č. 732024 (Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Německo)
 - Standard 2 – 200 μ l, kat. č. 0030000870 (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
 - Standard 50 – 1000 μ l, kat. č. 0030000919 (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
 - Standard 0,1 – 5 ml, kat. č. 0030000978 (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

2.2 Pracovní postupy

2.2.1 Podmínky separace

K separaci byla použita kolona HP 5-ms o délce 30 m, s vnitřním průměrem 0,32 mm a se stacionární fází 5 % fenyl-methylsiloxanu o tloušťce filmu 1 μ m. Teplota kolony programovaně rostla dle uvedených podmínek: 55 °C po dobu 3 minut a následně zvýšení rychlostí 6 °C/min na teplotu 250 °C, která byla udržována po dobu 10 minut. Celková doba analýzy byla 55 minut. Jako nosný plyn byl použit dusík z centrálního rozvodu s přtlakem na hlavě kolony 30 KPa. Jako palivo byl pro plamenový ionizační detektor použit vodík z tlakové láhve s průměrným průtokem 30 ml/min a jako oxidovadlo byl použit tlakový vzduch z centrálního rozvodu s průměrným průtokem 400 ml/min. Teplota dávkovacího zařízení i detektoru byla 250 °C.

2.2.2 Optimalizace přímé mikroextrakce jednou kapkou

Do skleněné extrakční nádoby o objemu 15 ml (Sulpeco, Bellefonte, PA, USA), opatřené uzavíratelným víčkem obsahující perforované polytetrafluoretylen/silikonové septum, byl odměřen určitý objem roztoku linaloolu o koncentraci $1,44 \cdot 10^{-3}$ mg/ml linaloolu v 5% ethanolu. Experimentální uspořádání bylo realizováno dle obrázku 14. Jehla mikrostřikačky Hamilton byla skrze septum umístěna do poloviny výšky hladiny roztoku. Po zavedení byla z jehly opatrně vytlačena kapka p-xylenu o objemu 1 μ l, která byla po celou dobu extrakce udržována u hrotu jehly. Extrakce byla podporována mícháním pomocí míchací tyčinky. Po extrakci byla kapka vtažena zpět do mikrostřikačky a následně byla nadávkována do plynového chromatografu. Optimalizovanými parametry byly objem a pH roztoku linaloolu, doba extrakce a rychlost míchání. Finální podmínky byly: 10 ml roztoku vzorku bez úpravy pH, rychlost míchání 350 ot/min, doba extrakce 40 minut a laboratorní teplota (neoptimalizováno).

2.2.3 Kalibrace pro přímou mikroextrakci jednou kapkou

Do odměrných baněk o objemu 50 ml byly z roztoku linaloolu o koncentraci $7,308 \cdot 10^{-2}$ mg/l linaloolu v 5% ethanolu připraveny kalibrační roztoky (viz tabulka 9). Poté bylo do stejné extrakční nádoby, jako v případě optimalizace mikroextrakce jednou kapkou, postupně

odměřeno 10 ml jednotlivých kalibračních roztoků. Extrakce probíhaly do kapky p-xylenu o objemu 1 μ l při rychlosti míchání 350 ot/min po dobu 40 minut.

Tabulka 9: Kalibrační řada pro přímou mikroextrakci jednou kapkou

Koncentrace [mg/ml]	Odměřený objem roztoku o $c = 7,308 \cdot 10^{-2}$ mg/l [ml]
$6,25 \cdot 10^{-5}$	0,043
$1,25 \cdot 10^{-4}$	0,086
$2,50 \cdot 10^{-4}$	0,171
$5,00 \cdot 10^{-4}$	0,342
$7,50 \cdot 10^{-4}$	0,513
$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,684
$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,855
$1,50 \cdot 10^{-3}$	1,026
$1,75 \cdot 10^{-3}$	1,197
$2,00 \cdot 10^{-3}$	1,368

2.2.4 Optimalizace přímé mikroextrakce tuhou fází

Při této optimalizaci byla použita stejná nádobka jako v případě optimalizace mikroextrakce jednou kapkou. V tomto případě byla optimalizace provedena s roztokem linaloolu o koncentraci $3,48 \cdot 10^{-4}$ mg/l linaloolu v 5% ethanolu. Před první extrakcí bylo vlákno při teplotě 270 °C po dobu jedné hodiny kondicionováno. Experimentální uspořádání bylo realizováno dle obrázku 23. Do skleněné nádobky byl odměřen určitý objem roztoku linaloolu a kovová jehla byla skrze septum umístěna do poloviny výšky hladiny roztoku. Po zavedení došlo k vysunutí vlákna. Extrakce byla podporována mícháním pomocí míchací tyčinky. Po extrakci bylo vlákno zpět zasunuto do ochranné kovové jehly. Ta byla po vyjmutí z roztoku umístěna do plynového chromatografu, ve kterém došlo k opětovnému vysunutí vlákna. Desorpce analytů probíhala při teplotě 250 °C po dobu jedné minuty. Po uplynulé době bylo vlákno zasunuto do kovové jehly, která byla vyjmuta z chromatografu a vložena do čistícího zařízení. V tomto zařízení, sloužícímu k odstranění více zadržovaných látek, došlo opět k vysunutí vlákna a desorpce látek probíhala při teplotě 230 °C po dobu 5 minut. Optimalizovanými parametry této extrakce byly objem roztoku linaloolu, doba extrakce a rychlost míchání. Finální podmínky byly: 15 ml roztoku vzorku bez úpravy pH, rychlost míchání 600 ot/min, doba extrakce 30 minut a laboratorní teplota (neoptimalizováno).

2.2.5 Kalibrace pro přímou mikroextrakci tuhou fází

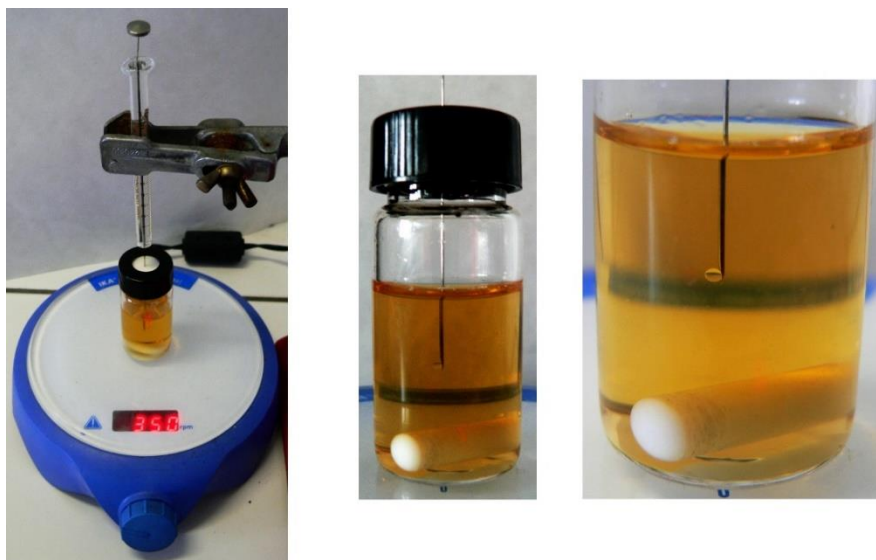
Do odměrných baněk o objemu 50 ml byly z roztoku linaloolu o koncentraci $3,48 \cdot 10^{-2}$ mg/l linaloolu v 5% ethanolu připraveny kalibrační roztoky (viz tabulka 10). Následně bylo do skleněné nádoby postupně odměřeno 15 ml jednotlivých kalibračních roztoků. Extrakce probíhaly při rychlosti míchání 600 ot/min po dobu 30 minut.

Tabulka 10: Kalibrační řada pro přímou mikroextrakci tuhou fází

Koncentrace [mg/ml]	Odměřený objem roztoku o $c = 3,48 \cdot 10^{-2}$ mg/l [μ l]
$1,60 \cdot 10^{-5}$	23
$3,13 \cdot 10^{-5}$	45
$6,25 \cdot 10^{-5}$	90
$1,25 \cdot 10^{-4}$	180
$1,88 \cdot 10^{-4}$	270
$2,50 \cdot 10^{-4}$	359
$3,13 \cdot 10^{-4}$	450
$3,75 \cdot 10^{-4}$	539
$4,38 \cdot 10^{-4}$	629
$5,00 \cdot 10^{-4}$	718

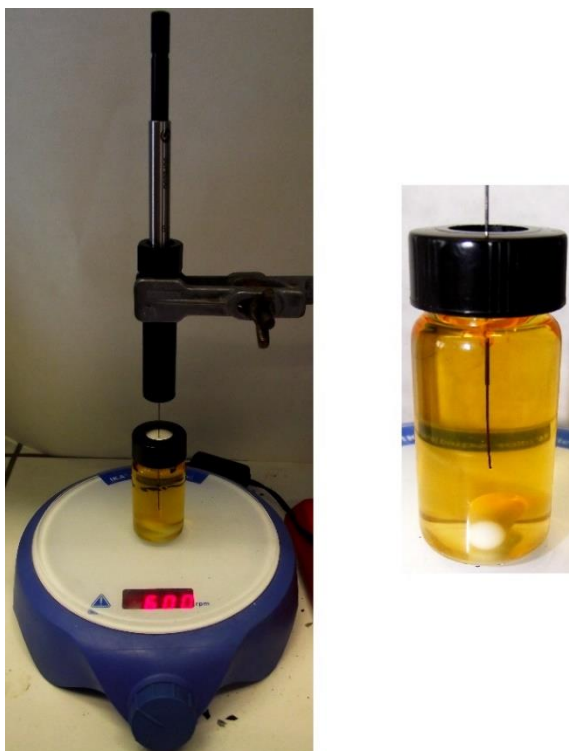
2.2.6 Analýza reálných vzorků

Veškeré vzorky piv byly před extrakcí pomocí třepačky Vibramax 100 zbaveny CO_2 . Třepání bylo prováděno při rychlosti 1000 ot/min po dobu 40 minut. Z takto upravených vzorků bylo postupně odměřeno 10 ml do jednotlivých extrakčních nádobek o objemu 15 ml (Sulpeco, Bellefonte, PA, USA). Následovaly přímé mikroextrakce jednou kapkou, které probíhaly do kapky p-xylynu o objemu 1 μ l při rychlosti míchání 350 ot/min po dobu 40 minut. Po extrakci vždy následovala analýza pomocí plynového chromatografu. Experimentální uspořádání je zobrazeno na obrázku 29.



Obrázek 29: Experimentální uspořádání přímé mikroextrakce jednou kapkou s detailním zobrazením kapky

Pro přímou mikroextrakci tuhou fází bylo do stejných extrakčních nádobek jako při mikroextrakci jednou kapkou odměřeno 15 ml upravených vzorků piv. Extrakce probíhaly při rychlosti míchání 600 ot/min po dobu 30 minut. Poté opět následovala analýza pomocí plynového chromatografu. Experimentální uspořádání je zobrazeno na obrázku 30.



Obrázek 30: Experimentální uspořádání přímé mikroextrakce tuhou fází s detailním zobrazením vlákna

2.2.7 Zjištění limitu detekce a limitu kvantifikace

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) plynového chromatografu byly stanoveny metodou kalibrační křivky. LOD byl hodnocen dle kritéria $S/N = 3$, zatímco LOQ dle kritéria $S/N = 10$, kdy S vyjadřuje odezvu a N hodnotu šumu. Kalibrační roztoky, připravené do odměrných baněk o objemu 5 ml dle tabulky 11, byly připraveny z roztoku o koncentraci 1 mg/ml linaloolu v 97% ethanolu a do plynového chromatografu byly dávkovány pomocí mikrostřikačky Hamilton. Dávkovaný objem byl 1 μ l. Limit detekce a limit kvantifikace byly stanoveny i pro obě mikroextrakční metody. Experimentální podmínky a získané výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny u jednotlivých mikroextrakcí.

Tabulka 11: Kalibrační řada pro zjištění limitu detekce a limitu kvantifikace

Koncentrace [mg/ml]	Odměřený objem roztoku o $c = 1$ mg/ml [ml]
0,01	0,05
0,05	0,25
0,10	0,50
0,15	0,75
0,20	1,00
0,25	1,25
0,30	1,50

3 Výsledky a diskuze

3.1.1 Zjištění limitu detekce a limitu kvantifikace

Z naměřených hodnot jednotlivých kalibračních roztoků byly sestrojeny závislosti průměrné výšky a plochy na koncentraci linaloolu (obrázky 31 a 32). Dávkovaný objem byl 1 μ l. Limit detekce a limit kvantifikace plynového chromatografu pro obě kalibrační závislosti vyjádřené v miligramech linaloolu v 1 ml kalibračního roztoku prezentuje tabulka 12. LOD byl vyhodnocen pomocí vzorce (1) a LOQ pomocí vzorce (2), kdy s_a je směrodatná odchylka úseku, q je úsek a k je směrnice příslušné kalibrační závislosti.

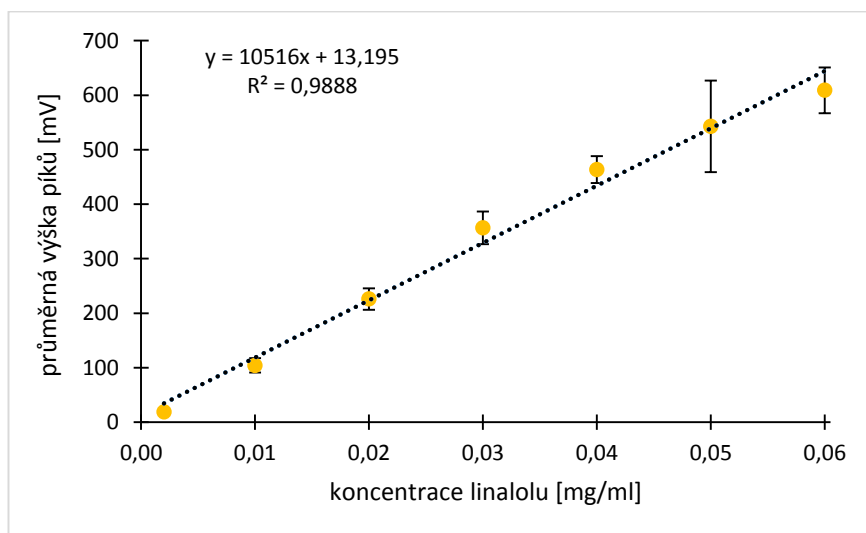
$$\text{LOD} = \frac{(3 \cdot s_a) - q}{k} \quad (1)$$

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

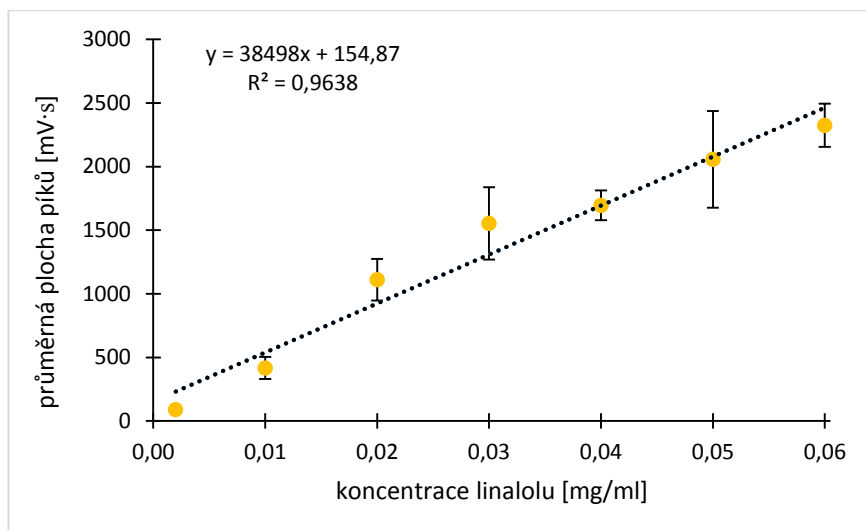
Tabulka 12: Limit detekce a limit kvantifikace pro metodu plynové chromatografie

Kalibrační závislost	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
$h = f(c)$	0,004	0,016
$A = f(c)$	0,005	0,027

A ... plocha píku [mV·s], c ... koncentrace linaloolu [mg/ml], h ... výška píku [mV]



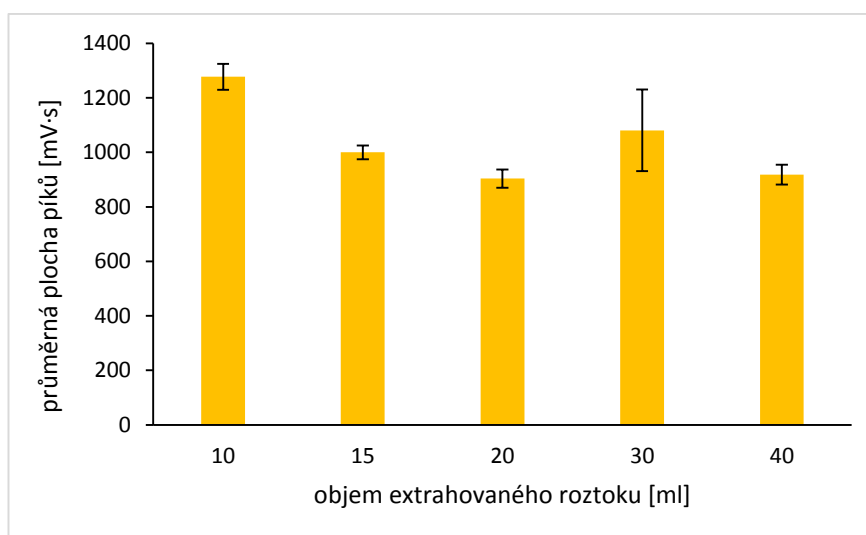
Obrázek 31: Závislost průměrné výšky píků na koncentraci linaloolu ($n = 3$)



Obrázek 32: Závislost průměrné plochy píků na koncentraci linaloolu ($n = 3$)

3.1.2 Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce jednou kapkou

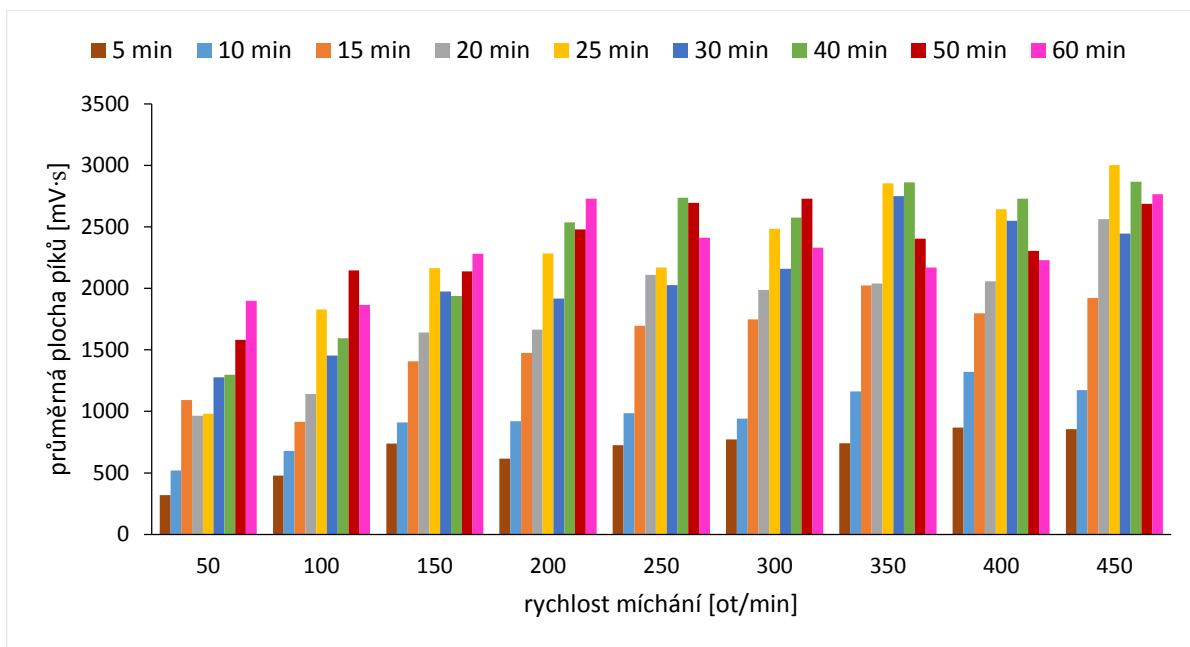
V prvním kroku byl zjišťován vliv objemu extrahovaného roztoku na vyextrahované množství linaloolu. Extrakce byly provedeny z roztoků o objemech 10; 15; 20; 30 a 40 ml při rychlosti míchání 50 ot/min po dobu 30 minut. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí sloupcového grafu (obrázek 33). Porovnáním hodnot, a také z důvodu nižší spotřeby chemikálií, byl zvolen objem 10 ml, při kterém byla extrakce nejúčinnější.



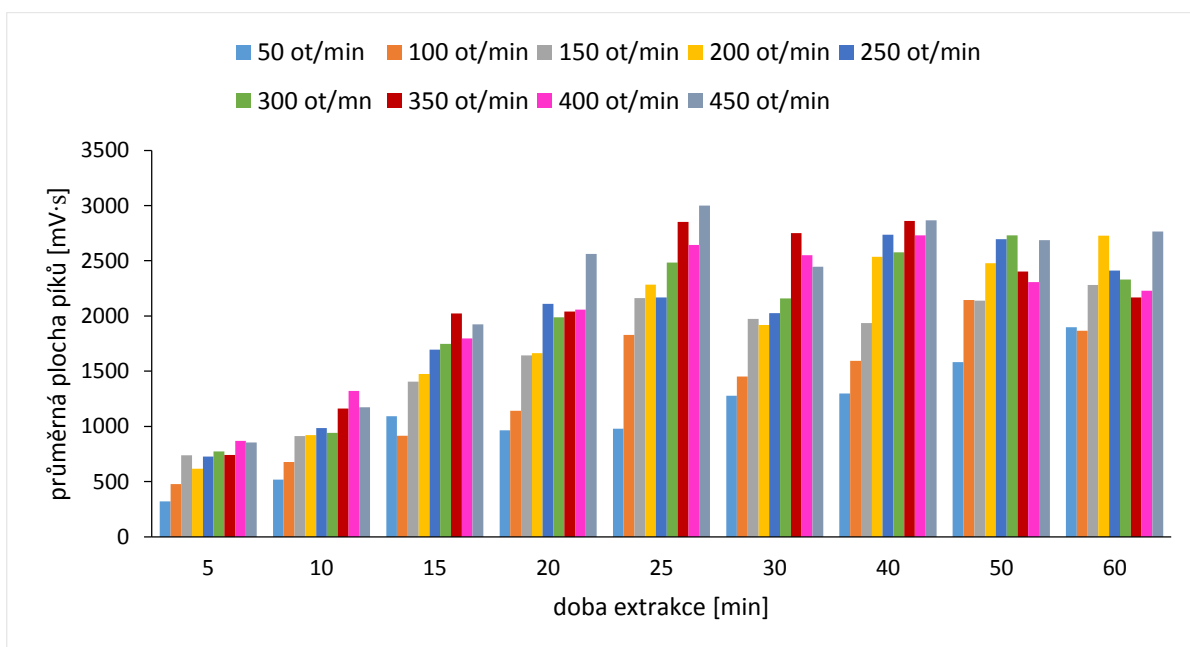
Obrázek 33: Závislost průměrné plochy píků na objemu extrahovaného roztoku ($n = 3$)

V druhém kroku byla zjišťována změna vyextrahovaného množství linaloolu v závislosti na různých otáčkách míchadla a různé době extrakce. Doba extrakce byla měněna v intervalu 5 – 30 minut po 5 minutách a v intervalu 30 – 60 minut po 10 minutách. Rychlost míchání byla měněna v intervalu 50 – 450 ot/min po 50 ot/min. Z důvodu vzrůstající nestability kapky

s rostoucí rychlostí míchání byla rychlost 450 ot/min limitní. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí sloupcových grafů (viz příloha I). Také byly sestrojeny souhrnné grafy (obrázky 34 a 35) zahrnující veškeré otáčky a doby extrakce. Porovnáním hodnot bylo zjištěno, že nejúčinnější byla extrakce při rychlosti míchání 350 ot/min po dobu 40 minut a proto tyto podmínky byly zvoleny jako optimální.

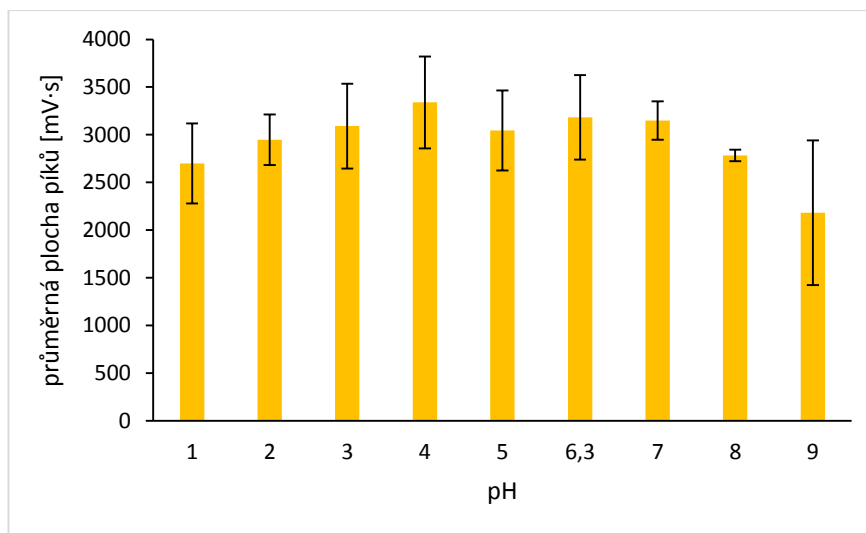


Obrázek 34: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro veškeré časy (n = 3)



Obrázek 35: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech pro veškeré otáčky (n = 3)

Následně byl zjišťován vliv pH na extrakci linaloolu, která byla provedena při zjištěných optimálních podmínkách, tedy při rychlosti míchání 350 ot/min a době 40 minut. Změna pH byla provedena v intervalu 1 – 9 pomocí 35% HCl, 1% HCl, 0,5 M NaOH a 0,25 M NaOH. Porovnáním hodnot, uvedených v příslušném sloupcovém grafu (obrázek 36), nebyl zjištěn žádný významný vliv pH. Hodnota 6,3 v tomto grafu odpovídá hodnotě pH roztoku linaloolu o koncentraci $1,44 \cdot 10^{-3}$ mg/ml linaloolu v 5% ethanolu. Vliv teploty na extrakci nebyl optimalizován. Veškeré extrakce probíhaly při laboratorní teplotě.



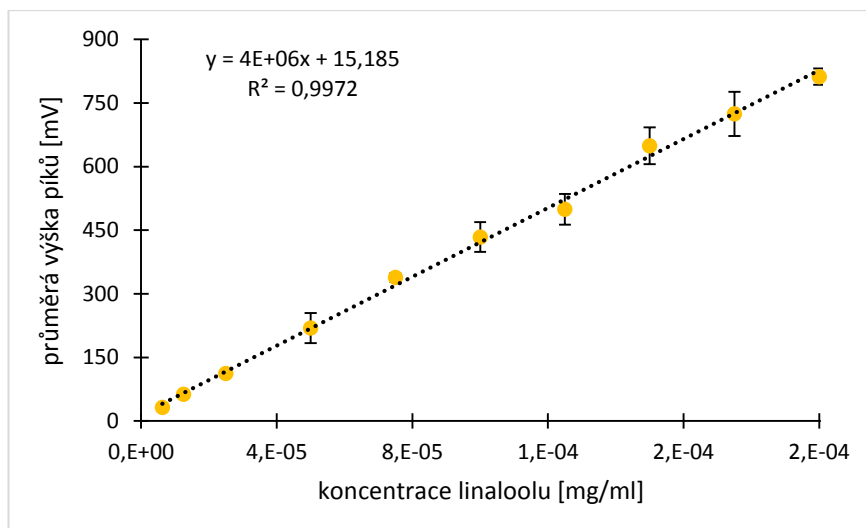
Obrázek 36: Závislost průměrné plochy píků na pH (n = 3)

Po optimalizaci následovala aplikace dané extrakční metody na roztoky kalibrační řady, která byla připravena v intervalu koncentrací $6,25 \cdot 10^{-5}$ – $0,02 \cdot 10^{-3}$ mg/ml linaloolu v 5% ethanolu (tabulka 9). Extrakce probíhaly při zjištěných optimálních podmínkách, tedy z objemu 10 ml vzorku bez úpravy pH, při rychlosti míchání 350 ot/min po dobu 40 minut a při laboratorní teplotě. Z naměřených hodnot byly sestrojeny kalibrační závislosti ploch a výšek píků na koncentraci jednotlivých kalibračních roztoků (obrázky 37 a 38). Limit detekce a limit kvantifikace, vyjádřené v miligramech linaloolu v 1 ml kalibračního roztoku, pro obě kalibrační závislosti prezentuje tabulka 13. LOD byl vyhodnocen pomocí vzorce (1) a LOQ pomocí vzorce (2).

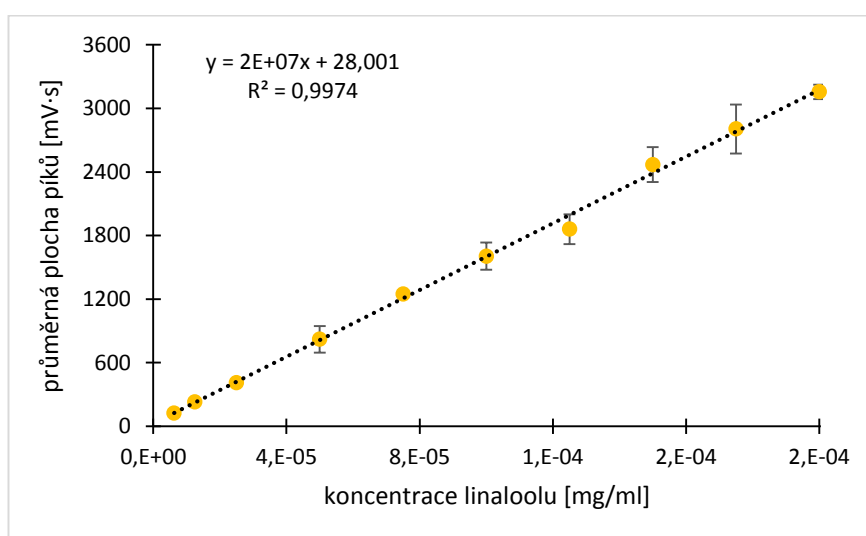
Tabulka 13: Limit detekce a limit kvantifikace pro přímou mikroextrakci jednou kapkou

Kalibrační závislost	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
$h = f(c)$	$2,63 \cdot 10^{-6}$	$1,75 \cdot 10^{-5}$
$A = f(c)$	$4,32 \cdot 10^{-6}$	$1,86 \cdot 10^{-5}$

A ... plocha píků [mV·s], c ... koncentrace linaloolu [mg/ml], h ... výška píků [mV]



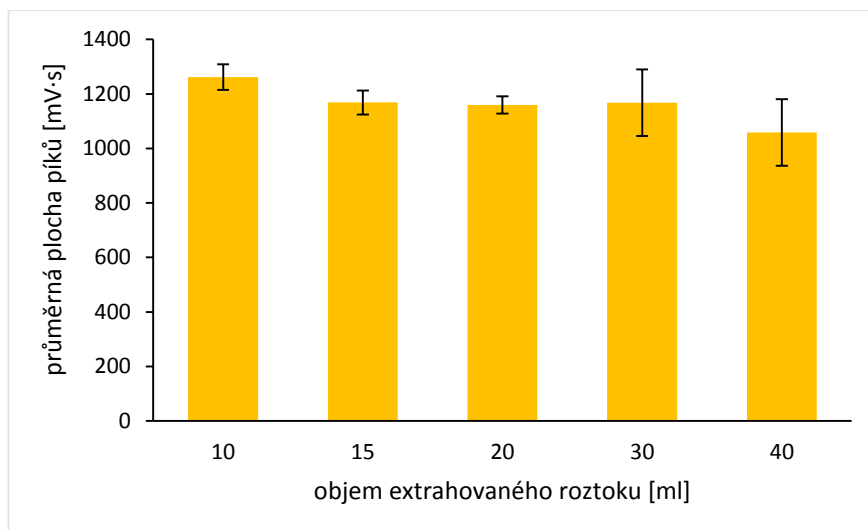
Obrázek 37: Závislost průměrné výšky píkú na koncentraci linaloolu ($n = 3$)



Obrázek 38: Závislost průměrné plochy píkú na koncentraci linaloolu ($n = 3$)

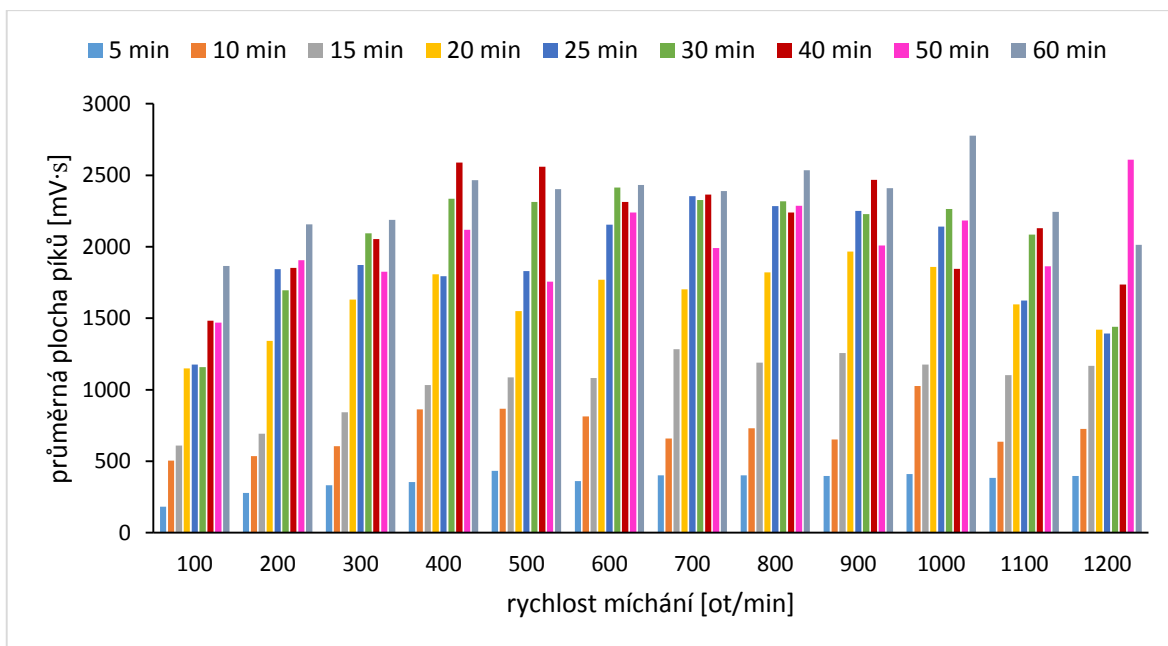
3.1.3 Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce tuhou fází

Prvním krokem bylo opět zjišťování vlivu objemu extrahovaného roztoku na vyextrahované množství linaloolu. Byly proměřovány roztoky o stejných objemech jako při optimalizaci přímé mikroextrakce jednou kapkou. Naměřená data byla zpracována formou sloupcového grafu (obrázek 39). Porovnáním hodnot se objem 10 ml roztoku vzorku jevil jako nejúčinnější, ale z hlediska experimentálního uspořádání (eliminace možnosti kontaktu míchací tyčinky s vláknem) byl vhodnější objem 15 ml, který byl také pro optimalizaci této techniky vybrán. Nevýhodou vyšších objemů byla vyšší spotřeba chemikálií, horší uspořádání a v některých případech i menší účinnost extrakci.

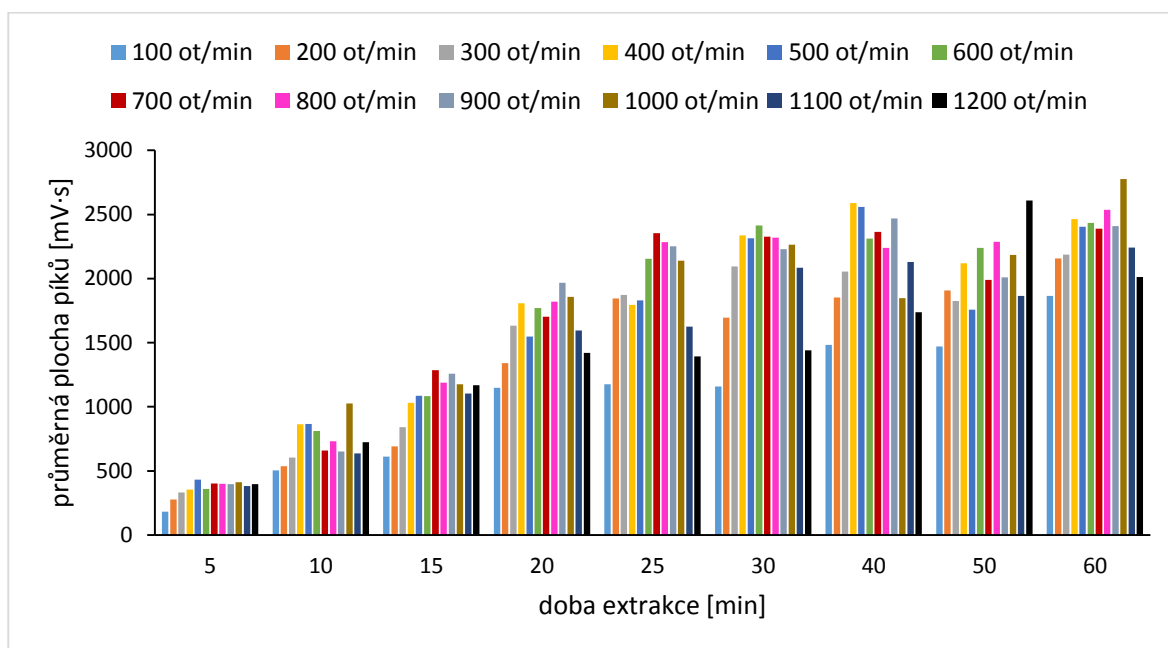


Obrázek 39: Závislost průměrné plochy píků na objemu extrahovaného roztoku ($n = 3$)

V druhém kroku byla zjišťována změna vyextrahovaného množství linaloolu v závislosti na různých otáčkách míchadla a různé době extrakce. Doba extrakce byla měněna stejným způsobem jako u optimalizace přímé mikroextrakce jednou kapkou. Rychlost míchání byla měněna v intervalu 100 – 1200 ot/min po 100 ot/min. Vyšší rychlost míchání nebyla z důvodu vodního víru v okolí vlákna možná. Tento vodní vír zabraňoval přímému kontaktu roztoku s vláknem, čímž docházelo ke snížení účinnosti extrakce. Z naměřených dat byly kromě sloupcových grafů (viz příloha II) sestrojeny také souhrnné grafy (obrázky 40 a 41) obsahující veškeré otáčky a čas extrakce. Porovnáním hodnot pomocí souhrnných grafů (obrázky 40 a 41) se jako nejúčinnější jeví podmínky 1000 ot/min po dobu 60 minut. Z grafů uvedených v příloze II je však patrné, že změna účinnosti extrakce od doby 30 minut není významná. Z tohoto důvodu a také z důvodu časové úspory byla doba 30 minut vybrána jako nejvhodnější. Optimální rychlost míchání byla vyhodnocena z obrázku II. 6, ze kterého je patrné, že nejúčinnější byla rychlost míchání 600 ot/min.



Obrázek 40: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro veškeré časy ($n = 3$)



Obrázek 41: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech pro veškeré otáčky ($n = 3$)

Vliv pH na extrakci linaloolu nebyl při této optimalizaci zkoumán. Důvodem je statisticky nevýznamný vliv pH na disociaci linaloolu (zjištěno při optimalizaci přímé mikroextrakce jednou kapkou, obrázek 36). Vliv teploty na extrakci také nebyl optimalizován. Veškeré extrakce probíhaly při laboratorní teplotě.

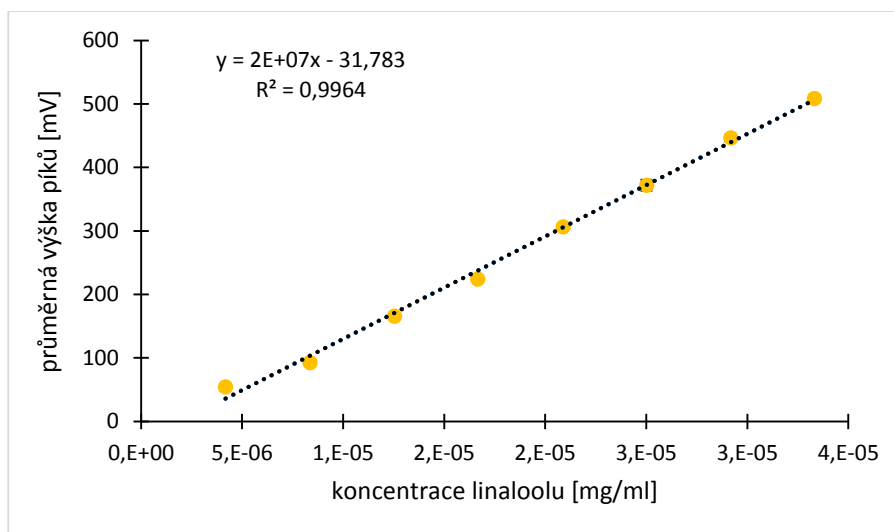
Kalibrační řada, připravená po optimalizaci, byla připravena v intervalu koncentrací $1,6 \cdot 10^{-5} - 0,5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml linaloolu v 5% ethanolu. Extrakce probíhala při zjištěných optimálních podmínkách, tedy z objemu 15 ml vzorku bez úpravy pH, při rychlosti míchání 600 ot/min

po dobu 30 minut a při laboratorní teplotě. Z naměřených hodnot byly sestrojeny kalibrační závislosti ploch a výšek pík na koncentraci jednotlivých kalibračních roztoků (obrázky 42 a 43). Limit detekce (vypočítán ze vzorce (1)) a limit kvantifikace (vypočítán ze vzorce (2)) vyjádřené jako miligramy linaloolu v 1 ml kalibračního roztoku pro obě kalibrační závislosti prezentuje tabulka 14.

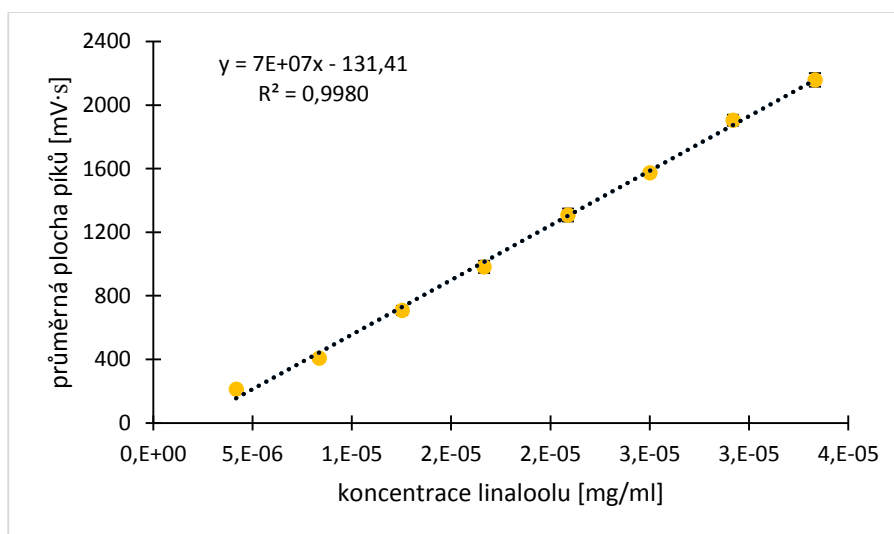
Tabulka 14: Limit detekce a limit kvantifikace pro přímou mikroextrakci tuhou fází

Kalibrační závislost	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
$h = f(c)$	$2,46 \cdot 10^{-6}$	$5,91 \cdot 10^{-6}$
$A = f(c)$	$2,26 \cdot 10^{-6}$	$5,33 \cdot 10^{-6}$

A ... plocha píku [mV·s], c ... koncentrace linaloolu [mg/ml], h ... výška píku [mV]



Obrázek 42: Závislost průměrné výšky píků na koncentraci linaloolu ($n = 3$)



Obrázek 43: Závislost průměrné plochy píků na koncentraci linaloolu ($n = 3$)

3.1.4 Porovnání extrakcí

K porovnání mikroextrakčních metod byly použity parametry: LOD, LOQ a koeficient determinace. Mikroextrakce byly porovnány také z hlediska praktického provedení. U metody SDME byl zjištěn limit detekce $4,32 \cdot 10^{-6}$ mg/ml, limit kvantifikace $1,86 \cdot 10^{-5}$ mg/ml a koeficient determinace 0,9974. Zatímco u metody SPME byl limit detekce $2,26 \cdot 10^{-6}$ mg/ml, limit kvantifikace $5,33 \cdot 10^{-6}$ mg/ml a koeficient determinace 0,9980. Porovnáním hodnot je zřejmé, že metodou SPME lze dosáhnout nižších limitů s vyšší hodnotou spolehlivosti.

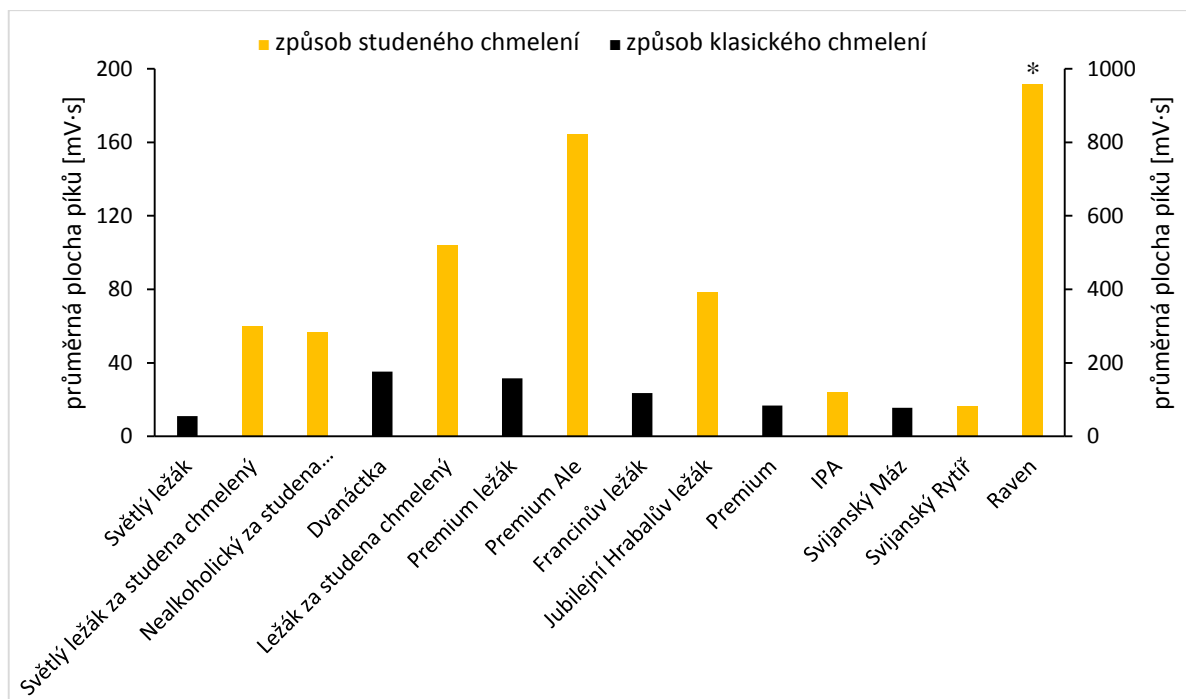
Z hlediska praktického provedení byla snadnější metoda SPME. Metoda SDME vyžadovala opatrné vytlačení a zpětné vtažení kapky, jejíž stabilita závisela na objemu organického rozpouštědla, rychlosti míchání a matici vzorku. Na rozdíl od SPME nebyla u SDME prováděna kondicionace a čištění pomocí čističe stříkaček. U SDME také nehrozil paměťový efekt a extrakce se vždy prováděly do čistého podílu organického rozpouštědla. I přes značnou jednoduchost, účinnost a nízkou spotřebu organického rozpouštědla je nestabilita vzniklé kapky limitující faktor povolující rychlost míchání pouze do 450 ot/min (při použití klasické skleněné nádoby o objemu 15 ml od firmy Sulpeco).

Nevýhodou SPME bylo snadné poškození vlákna, jeho křehkost a nevratná sorpce sloučenin o vysoké molekulové hmotnost. V uspořádání přímého ponoření je limitujícím faktorem životnost vlákna, která závisí především na matici jednotlivých vzorků. Porovnáním veškerých faktorů se metoda SPME v uspořádání přímého ponoření jevila vhodnější.

3.1.5 Analýza reálných vzorků

Z reálných vzorků pív byl linalool extrahován jak metodou přímé mikroextrakce jednou kapkou, tak i metodou přímé mikroextrakce tuhou fází. Při použití metody DI-SDME byla zjištěna značná nestabilita kapky – její rozpouštění a odtrhávání od ústí mikrostříkačky. Tato nestabilita byla způsobena složitou maticí vzorků. Z tohoto důvodu byla k extrakci linaloolu použita pouze metoda DI-SPME. Složitá matrice vzorků měla značný vliv nejenom na stabilitu kapky, ale také na životnost vlákna. Významné klesání životnosti vlákna v uspořádání přímého ponoření bylo způsobeno především komplexním charakterem analyzovaných vzorků pív.

Porovnání jednotlivých druhů pív od stejné značky dle jejich průměrných ploch prezentují dílčí obrázky uvedené v příloze III. Také bylo provedeno souhrnné porovnání veškerých reálných vzorků (obrázek 44).



Obrázek 44: Porovnání průměrných ploch veškerých reálných vzorků ($n = 3$)
 *...datová řada na vedlejší svislé ose

Množství linaloolu bylo vyhodnoceno metodou kalibrační křivky a metodou standardního přídávku, při které bylo ke každému vzorku piva v extrakční nádobce přidáno 30 μl roztoku linaloolu o koncentraci $3,48 \cdot 10^{-2}$ mg/ml linaloolu v 5% ethanolu. K vyhodnocení byly použity plochy píků.

Průměrný obsah linaloolu v jednotlivých vzorcích piv vyjádřený v nanogramech linaloolu a přepočítaný na 1 ml vzorku piva prezentují tabulky 15 a 16. Porovnáním hodnot je patrné, že metodu kalibrační křivky není možné využít pro kvantifikaci. Důvodem jsou nízké hodnoty obsahu linaloolu nacházejících se pod limitem kvantifikace kalibrační řady metody SPME. Nízké hodnoty byly pravděpodobně způsobeny vlivem matrice jednotlivých vzorků. K vyhodnocování skutečného obsahu linaloolu v reálných vzorcích je tedy vhodnější metoda standardního přídávku eliminující matricový efekt a lépe charakterizující aktuální složení daného piva. Chromatogramy jednotlivých reálných vzorků jsou uvedeny v příloze III.

Tabulka 15: Obsah linaloolu vyjádřený jako nanogramy v 1 ml reálného vzorku klasicky chmelených piv

Druh piva	Obsah linaloolu [ng/ml]	
	Kalibrace	Standardní přídavek
Bakalář – Světlý ležák	< LOQ	0,69 ± 0,01
Krušovice – Dvanáctka	< LOQ	1,39 ± 0,11
Lobkowicz – Premium ležák	< LOQ	1,33 ± 0,20
Postřižinské – Francinův ležák	< LOQ	3,28 ± 0,24
Primátor – Premium	< LOQ	1,92 ± 0,18
Svijany – Svijanský Máz	< LOQ	3,42 ± 0,02

< LOQ...koncentrace linaloolu se nachází pod limitem kvantifikace kalibrace přímé mikroextrakce tuhou fází

Průměrné hodnoty (n = 3) ± směrodatná odchylka

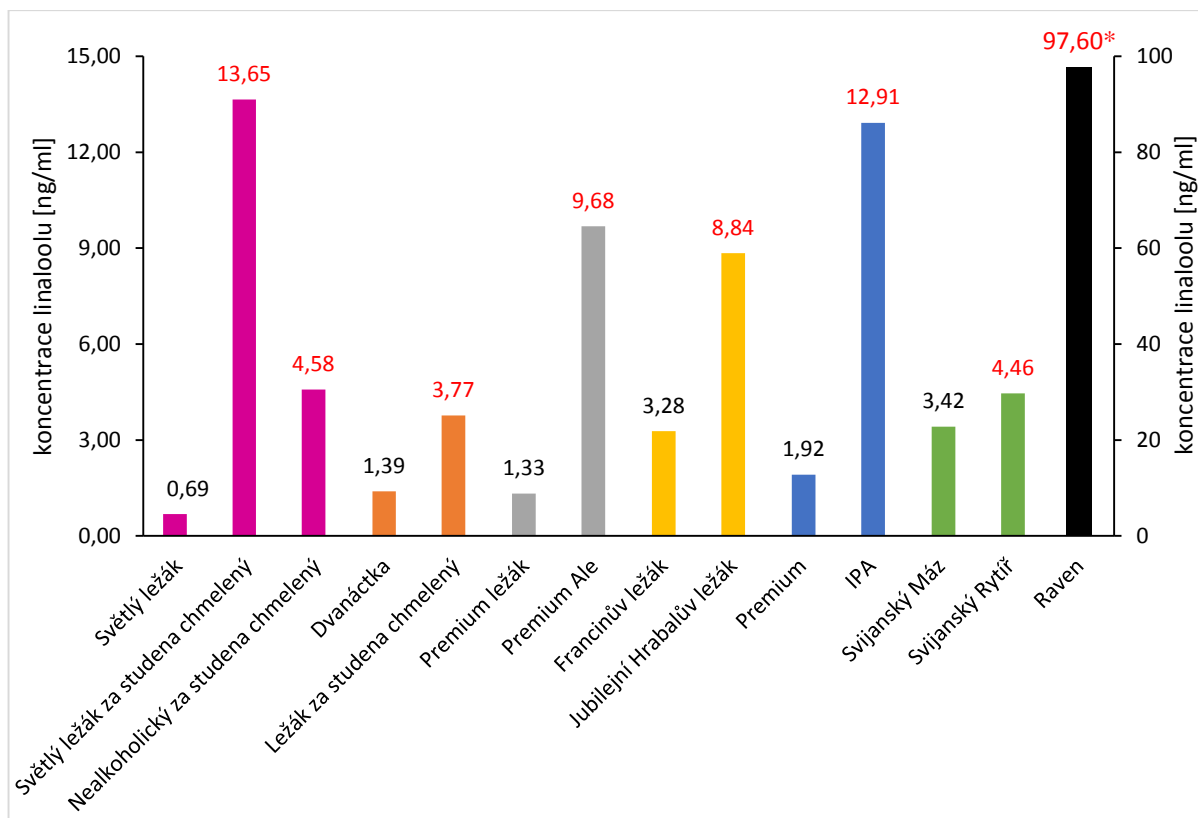
Tabulka 16: Obsah linaloolu vyjádřený jako nanogramy v 1 ml reálného vzorku za studena chmelených piv

Druh piva	Obsah linaloolu [ng/ml]	
	Kalibrace	Standardní přídavek
Bakalář – Světlý ležák za studena chmelený	< LOQ	13,65 ± 4,09
Bakalář – Nealkoholický za studena chmelený	< LOQ	4,58 ± 0,32
Krušovice – Ležák za studena chmelený	< LOQ	3,77 ± 0,21
Lobkowicz – Premium Ale	< LOQ	9,68 ± 3,92
Postřižinské – Jubilejní Hrabalův ležák	< LOQ	8,84 ± 1,41
Primátor – India Pale Ale	< LOQ	12,91 ± 1,66
Svijany – Svijanský Rytíř	< LOQ	4,46 ± 0,31
Raven – Gunslinger	15,55 ± 0,07	97,60 ± 3,69

< LOQ...koncentrace linaloolu se nachází pod limitem kvantifikace kalibrace přímé mikroextrakce tuhou fází

Průměrné hodnoty (n = 3) ± směrodatná odchylka

Z teoretické části vyplývá, že za studena chmelená piva dosahují specifického chmelového aroma, které je ovlivňováno odrůdou chmele a dobou jeho setrvání v pivu. Jádrem chmelového aroma je zmíněný linalool, jehož extrakce má při studeném chmelení klíčový význam. Z tohoto důvodu lze koncentraci linaloolu využít k rozlišení mezi jednotlivými odrůdami chmele, tedy i mezi jednotlivými druhy piv. Z obrázku 45 je patrné, že jednotlivé značky i druhy piv se obsahem linaloolu liší. U veškerých reálných vzorků obsahují vzorky za studena chmelených piv více linaloolu – lze ho tedy využít k rozlišení mezi jednotlivými druhy piv. Množství linaloolu se u klasických piv pohybovalo v rozmezí 0,69 – 3,42 ng/ml, zatímco u piv za studena chmelených v rozmezí 3,77 – 97,60 ng/ml.



Obrázek 45: Porovnání koncentrací linaloolu vyhodnocených z plochy piků metodou standardního přidavku v jednotlivých vzorcích pív ($n = 3$)
 klasické chmelení – černé hodnoty
 studené chmelení – červené hodnoty
 *...datová řada na vedlejší svislé ose

Závěr

Cílem diplomové práce bylo stanovení linaloolu s využitím mikroextrakčních technik SDME a SPME ve spojení s metodou plynové chromatografie. Teoretická část je věnována pivu (vstupním surovinám, technologii a zdravotním aspektům jeho konzumace), linaloolu (jeho vlastnostem, produkci a využití), mikroextrakčním technikám, zejména mikroextrakci jednou kapkou, rozdělující se podle styku extrakční fáze se vzorkem do šesti skupin, a mikroextrakci tuhou fází. Dále je v teoretické části uvedeno několik příkladů možného využití výše uvedených mikroextrakcí a konec této části je okrajově věnován plynové chromatografii.

V experimentální části byla provedena optimalizace přímé mikroextrakce jednou kapkou a přímé mikroextrakce tuhou fází. Následně byly obě optimalizované extrakční metody využity při analýze reálných vzorků. Optimalizovanými parametry byl objem a pH roztoku, doba extrakce a rychlost míchání. Pro přímou mikroextrakci jednou kapkou byly zjištěny následující optimální podmínky: 10 ml extrahovaného roztoku bez úpravy pH, doba extrakce 40 minut a rychlost míchání 350 ot/min. Pro mikroextrakci tuhou fází byly optimální podmínky následující: 15 ml extrahovaného roztoku bez úpravy pH, doba extrakce 30 minut a rychlost míchání 600 ot/min. Obě mikroextrakce byly provedeny při laboratorní teplotě.

Po optimalizaci mikroextrakcí následovala analýza reálných vzorků piv. Zakoupeny byly vždy dva vzorky od jedné značky – s výjimkou značky Bakalář, u kterého byly zakoupeny vzorky tři a značky Raven, od které byl dodán pouze jeden vzorek. Z důvodu vzájemného porovnávání za studena chmelených a klasicky chmelených piv byly vždy zakoupeny vzorky s blízkým obsahem alkoholu. Jako vzorky klasicky chmelených piv byly zakoupeny: Bakalář – Světlý ležák, Krušovice – Dvanáctka, Lobkowicz – Premium ležák, Postřižinské – Francinův ležák, Primátor – Premium a Svijany – Svijanský Máz. Vzorky za studena chmelených piv byly: Bakalář – Světlý ležák za studena chmelený, Bakalář – Nealkoholický za studena chmelený, Krušovice – Ležák za studena chmelený, Lobkowicz – Ale, Postřižinské – Jubilejní Hrabalův ležák, Primátor – IPA, Svijany – Svijanský Rytíř a Raven – Gunslinger. K extrakci linaloolu byly použity obě optimalizované mikroextrakční metody. Během aplikace metody SDME byla pozorována výrazná nestabilita kapky (její rozpouštění a odtržení). Proto bylo možné použít pouze mikroextrakci tuhou fází. Z klasicky chmelených vzorků piv nejvíce linaloolu obsahoval vzorek Svijanský Máz s obsahem 3,42 ng/ml linaloolu. Naopak u piv chmelených za studena nejvíce linaloolu obsahoval vzorek Raven s hodnotou 97,60 ng/ml linaloolu. Vyhodnocením naměřených dat bylo prokázáno, že piva za studena chmelená obsahují více linaloolu než piva klasicky chmelená. Množství linaloolu lze tedy využít k rozlišení mezi jednotlivými druhy piv, čímž byl splněn cíl této práce.

Seznam použité literatury

- [1] PREEDY, Victor R. *Beer in health and disease prevention*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 978-012-3738-912.
- [2] 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.
- [3] Zápis z 34. zasedání Koordinační skupiny bezpečnosti potravin (KSBP), *eAGRI Potraviny* [online]. [cit. 2018-05-08].
Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/580150/zapis_34KSBP.pdf
- [4] Fakta a zajímavosti. *Český svaz pivovarů a sladoven, z.s.* [online]. [cit. 2017-11-15].
Dostupné z: <http://ceske-pivo.cz/fakta-a-zajimavosti>
- [5] PIGGOTT, J., ed. *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research*. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2012. ISBN 978-0-85709-051-5.
- [6] BASAŘOVÁ, G., J. ŠAVEL, P. BESARŇ a T. LEJSEK. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [7] RYCHTERA, M. Fermentační technologie, v knize: KADLEC, P. a kol. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, s. 139-159. ISBN 80-7080-510-2.
- [8] KOSAŘ, K. a S. PROCHÁZKA, ed. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 80-902-6586-3.
- [9] Voda. *Ústav počítačové a řídicí techniky VŠCHT Praha* [online]. [cit. 2018-05-05].
Dostupné z: <http://uprt.vscht.cz/ucebnice/mb/MB43-v3.HTM>
- [10] Dechlorace a odstranění organických látek. *Culligan* [online]. [cit. 2018-05-05].
Dostupné z: <http://www.culligan.cz/index.php/technologie/dechlorace-a-odstraneni-organickych-latek>
- [11] CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [12] NOVOTNÝ, P. *Pivařka: tajemství domácího pivovarství*. Brno: Jota, 2017. ISBN 978-80-7565-108-2.

- [13] KOVAŘÍK, M. *Český chmel: Czech hops = Der tschechische Hopfen*. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky ve spolupráci se Svazem pěstitelů chmele České republiky, 2003. ISBN 978-80-7084-933-0.
- [14] CIBULKA, T. *Charakteristika květů/rostlin jednodomých, dvoudomých a oboupohlavných* [online]. [cit. 2018-02-06].
Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/ptacek/AFH-vypracovane-otazky/02CharaktKvetuRosJednodDvoudOboupCibulka.htm>
- [15] JEŽEK, J., ed. *CHMEL 2015: Příručka pro pěstitelé chmele*. 1. Žatec: Chmelařský institut, 2015. ISBN 978-80-86836-98-0.
- [16] MOŠTEK, J. a J. ČEPIČKA. Chemie éterických olejů (silic) chmele a jejich pivovarský význam. *Kvasný Průmysl*. 1969, **15**(12), 259-265. ISSN 0023-5830.
- [17] GALLONE, B., S. MERTENS, J. L. GORDON, S. MAERE, K. J. VERSTREPEN a J. STEENSELS. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018, **49**, 148-155. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.08.005. ISSN 09581669.
- [18] GONÇALVES, M., A. PONTES, P. ALMEIDA, R. BARBOSA, M. SERRA, D. LIBKIND, M. HUTZLER, P. GONÇALVES a J. P. SAMPAIO. Distinct Domestication Trajectories in Top-Fermenting Beer Yeasts and Wine Yeasts. *Current Biology*. 2016, **26**(20), 2750-2761. DOI: 10.1016/j.cub.2016.08.040. ISSN 09609822.
- [19] JACKSON, M., *Encyklopedie piva*. Praha: Volvox Globator, 1988. ISBN 8085769-37-9.
- [20] GOLDAMMER T., *The Brewer's Handbook: The Complete Book to Brewing Beer*. Vyd. 2. USA: Apex Publishers, 2008. ISBN 978-0-9675212-3-3.
- [21] Jak vaříme naše pivo. *Budějovický Budvar: Národní podnik* [online]. [cit. 2018-03-27].
Dostupné z: <http://www.budejovickybudvar.cz/produkty/jak-varime-pivo.html>
- [22] Dry Hopping Techniques. *Brew your own: The how - to homebrew beer magazine* [online]. [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <https://byo.com/article/dry-hopping-techniques/>
- [23] HVÍZDALOVÁ, I. Nový pohled na suché chmelení. *Agronavigátor* [online]. [cit. 2018-04-08].
Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=118675>
- [24] KROFTA, K., ed. Uplatnění českých odrůd chmele v pivovarnictví: Sborník přednášek a výsledky degustací ze semináře konaného dne 30. 5. 2013. Žatec: Chmelařský institut, 2013. ISBN 978-80-86836-97-3.

- [25] Extraktor chmele – zařízení pro chmelení piva za studena. *Czech brewery system s.r.o.* [online]. [cit. 2018-04-08].
Dostupné z: <http://www.ceskeminipivovary.cz/nabidka/vyroba/komponenty-pivovaru/studeny-blok/studene-suche-chmeleni-piva>
- [26] MARCOS, A., ed. *Beer and Health: Moderate consumption as part of a healthy lifestyle*. 5rd. Amsterdam: Kennisinstituut Bier, 2017.
- [27] BAMFORTH, C. W., ed. *Beer: A quality perspective*. Burlington (USA): Elsevier, 2009. ISBN 978-012-6692-013.
- [28] Isopentenyl pyrophosphate. *PubChem* [online]. [cit. 2018-03-21].
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1195>
- [29] SPEIGHT, J. *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes*. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 978-0-7506-8632-7.
- [30] KULKARNI, V. S., ed. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*. Amsterdam: Elsevier, 2010. ISBN 978-0-8155-2025-2.
- [31] HILL, A. E., ed. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Amsterdam: Elsevier, 2015. ISBN 978-1-78242-331-7.
- [32] KIRK-OTHMER. *Chemical technology of cosmetics*. Hoboken: Wiley, 2013. ISBN 978-1-118-40692-2.
- [33] CHRISTENSSON, J. B., M. MATURA, B. GRUVBERGER, M. BRUZE, a A. T. KARLBERG. Linalool - a significant contact sensitizer after air exposure. *Contact Dermatitis*. 2010, **62**(1), 32-41. DOI: 10.1111/j.1600-0536.2009.01657.x. ISSN 01051873.
- [34] RADULOVIĆ, N., P. BLAGOJEVIĆ a A. MILTOJEVIĆ. α -Linalool - a marker compound of forged/synthetic sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, **93**(13), 3292-3303. DOI: 10.1002/jsfa.6175. ISSN 00225142.
- [35] PRASSE, A., H.-U. SIEHL, K.-P. ZELLER, S. BERGER a D. SICKER. Wie unsere Nase die enantiomeren Linaloole unterscheidet. *Chemie in unserer Zeit*. 2014, **48**(5), 342-353. DOI: 10.1002/ciuz.201400679. ISSN 00092851.
- [36] Linalool. *PubChem* [online]. [cit. 2018-02-14].
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool#section=Top>

- [37] RAGUSO, R. A. More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. *Current Opinion in Plant Biology*. 2016, **32**, 31-36. DOI: 10.1016/j.pbi.2016.05.007. ISSN 13695266.
- [38] Linalool. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2018-02-14].
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/l2602?lang=en@ion=CZ>
- [39] Showing Compound Linalool (FDB014940). *Food Component Database* [online]. [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: <http://foodb.ca/compounds/FDB014940>
- [40] SOUSA, S., M. SILVA, F. O. GOMES, V. M. F. DOMINGUES a C. D. MATOS. Cork - a natural material for linalool controlled release. *Flavour and Fragrance Journal*. 2017, **32**(6), 427-432. DOI: 10.1002/ffj.3396. ISSN 08825734.
- [41] BRUYLANTS, A., L. GHOSEZ a H. G. VIEHE, ed. *Organic synthesis: First International Conference on Organic Synthesis*. London: Butterworth, 1975. ISBN 9781483156170.
- [42] WANG, Z. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. Hoboken: Wiley, 2010. ISBN 9780471704508.
- [43] LEINER, L., A. STOLLE, B. ONDRUSCHKA, T. NETSCHER a W. BONRATH. Thermal behavior of pinan-2-ol and linalool. *Molecules*. 2013, **18**(7), 8358-8375. DOI: 10.3390/molecules18078358. ISSN 1420-3049.
- [44] 3-Isopropenyl-1,2-dimethylcyclopentan-1-ol. *PubChem* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/20046>
- [45] HOSSEINZADEH, H., M. IMENSHAHIDI, M. HOSSEINI a B. M. RAZAVI. Effect of Linalool on Morphine Tolerance and Dependence in Mice. *Phytotherapy Research*. 2012, **26**(9), 1399-1404. DOI: 10.1002/ptr.3736. ISSN 0951418X.
- [46] ŠTĚRBA, K., P. ČEJKA, J. ČULÍK a M. JURKOVÁ. Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Detection. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2015, **73**(2), 151-158. DOI: 10.1094/ASBCJ-2015-0406-01. ISSN 0361-0470.
- [47] MINGYUAN, G., L. YANGCHENG a L. GUANGSHENG. Directly suspended droplet microextraction in a rotating vial. *Analytica Chimica Acta*. 2009, **648**(1), 123-127. DOI: 10.1016/j.aca.2009.06.040. ISSN 0003-2670.

- [48] GAO, W., G. CHEN, T. CHEN, X. ZHANG, Y. CHEN a Y. HU. Directly suspended droplet microextraction combined with single drop back-extraction as a new approach for sample preparation compatible with capillary electrophoresis. *Talanta*. 2011, **83**(5), 1673-1679. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.11.066. ISSN 0039-9140.
- [49] YANGCHENG, L., L. QUAN, L. GUANGSHENG a D. YOUYUAN. Directly suspended droplet microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2006, **566**(2), 259-264. DOI: 10.1016/j.aca.2006.02.072. ISSN 0003-2670.
- [50] FARAJZADEH, M. A. a M. ABBASPOUR. Development of a new sample preparation method based on liquid–liquid–liquid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction and its application on unfiltered samples containing high content of solids. *Talanta*. 2017, **174**(1), 111-121. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.05.084. ISSN 0039-9140.
- [51] ANDERSON, A., A. BERTHOD, V. PINO a A. M. STALCUP. *Analytical Separation Science*. Vol. 5. Hoboken: Wiley, 2016. ISBN 978-3-527-33374-5.
- [52] SHALASH, M., A. MAKAHLEH, S. M. SALHIMI a B. SAAD. Vortex-assisted liquid-liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of fourteen phenolic acids in honey, iced tea and canned coffee drinks. *Talanta*. 2017, **174**(1), 428-435. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.06.039. ISSN 0039-9140.
- [53] KOKOSA, J. M. Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. *TrAC: Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **71**, 194-204. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.019. ISSN 0165-9936.
- [54] KUZMINA, O. a J. P. HALLETT, ed. *Application, Purification, and Recovery of Ionic Liquids*. 1. Amsterdam: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-444-63713-0.
- [55] HANUSEK, J. Iontové kapaliny – nové směry v „zelené“ chemii. *Bulletin: Asociace českých chemických společností*. 2005, **36**(2), 263 – 267.
- [56] MARCINKOWSKI, L., F. P. PEREIRA, A. KLOSKOWSKI a J. NAMIEŚNIK. Opportunities and shortcomings of ionic liquids in single-drop microextraction. *TrAC: Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **72**, 153-168. DOI: 10.1016/j.trac.2015.03.024. ISSN 0165-9936.
- [57] VIDAL, L., A. CANALS, N. KALOGERAKIS a E. PSILLAKIS. Headspace single-drop microextraction for the analysis of chlorobenzenes in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1089**(1-2), 25-30. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.06.058. ISSN 0021-9673.
- [58] DOUŠA, M. Vyhodnocování výsledků v HPLC. *HPLC* [online]. [cit. 2018-03-15]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/teorie/evaluation_hplc.html

- [59] WU, Y., L. XIA, R. CHEN a B. HU. Headspace single drop microextraction combined with HPLC for the determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *Talanta*. 2008, **74**(4), 470-477. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.05.057. ISSN 0039-9140.
- [60] PENA-PEREIRA, F., I. LAVILLA a C. BENDICHO. Headspace single-drop microextraction coupled to microvolume UV-vis spectrophotometry for iodine determination. *Analytica Chimica Acta*. 2009, **631**(2). DOI: 10.1016/j.aca.2008.10.048. ISSN 0003-2670.
- [61] LIU, D. a S. MIN. Rapid analysis of organochlorine and pyrethroid pesticides in tea samples by directly suspended droplet microextraction using a gas chromatography-electron capture detector. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1235**(27), 166-173. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.02.070. ISSN 0021-9673.
- [62] SARAFRAZ-YAZDI, A., A. H. AMIRI a Z. ES'HAGHI. Separation and determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene compounds in water using directly suspended droplet microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector. *Talanta*. 2009, **78**(3), 936-941. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.12.069. ISSN 0039-9140.
- [63] LI, X., H. LI, W. MA, Z. GUO, X. LI, X. LI a Q. ZHANG. Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction couple with liquid chromatography-mass spektrometry. *Food Chemistry*. 2018, **257**(15), 1 – 6. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.02.077. ISSN 0308-8146.
- [64] PICÓ, Y., ed. *Chemical Analysis of Food - Techniques and Applications*. Cambridge: Academic Press, 2012. ISBN 9780123848628.
- [65] ZHU, Z., X. ZHOU, N. YAN, L. ZHOU a X. CHEN. On-line combination of single-drop liquid-liquid-liquid microextraction with capillary electrophoresis for sample cleanup and preconcentration: A simple and efficient approach to determining trace analyte in real matrices. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(11), 1856-1861. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.01.013. ISSN 0021-9673.
- [66] WU, L., M. HU, Z. LI, Y. SONG, C. YU, H. ZHANG, A. YU, Q. MA, Z. WANG. Dynamic microwave-assisted extraction combined with continuous-flow microextraction for determination of pesticides in vegetables. *Food Chemistry*. 2016, **192**(1), 596-602. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.055. ISSN 0308-8146.
- [67] HE, Y. a H. K. LEE. Continuous flow microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of pesticides in natural waters. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1122**(1-2), 7-12. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.04.078. ISSN 0021-9673.

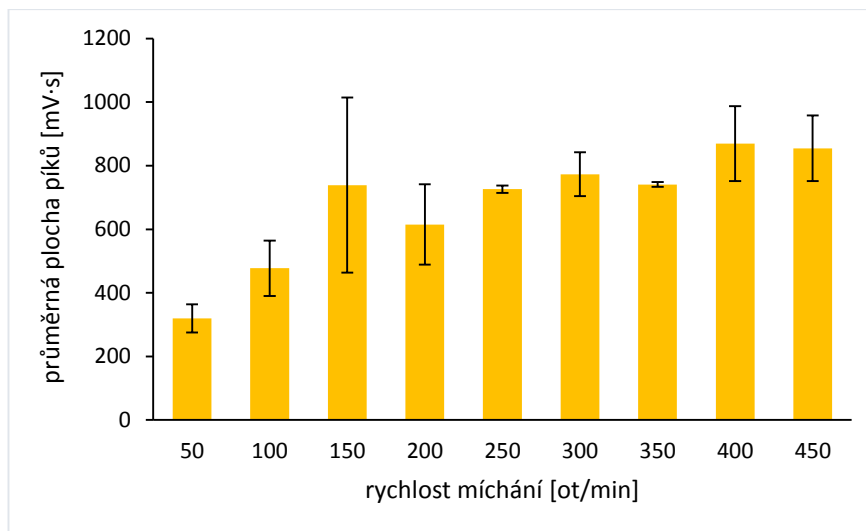
- [68] MOINFAR, S., G. KHAYATIAN a M. R. M. HOSSEINI. Continuous sample drop flow-based microextraction method as a microextraction technique for determination of organic compounds in water sample. *Talanta*. 2014, **129**(1), 309-314. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.05.058. ISSN 0039-9140.
- [69] CAO, J., P. LIANG a R. LIU. Determination of trace lead in water samples by continuous flow microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*. 2008, **152**(3), 910-914. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.07.064. ISSN 0304-3894.
- [70] LIANG, P., Q. LI a J. XU. LC Determination of Phthalate Esters in Water Samples Using Continuous-Flow Microextraction. *Chromatographia*. 2008, **68**(5-6), 393–397. DOI: 10.1365/s10337-008-0744-x. ISSN 0009-5893.
- [71] LI, Y., T. ZHANG a P. LIANG. Application of continuous-flow liquid-phase microextraction to the analysis of volatile halohydrocarbons in water. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **536**(1-2), 245-249. DOI: 10.1016/j.aca.2004.12.033. ISSN 0003-2670.
- [72] LIU, Y., Y. HASHI a J. M. LIN. Continuous-flow microextraction and gas chromatographic–mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in water. *Analytica Chimica Acta*. 2007, **585**(2), 294-299. DOI: 10.1016/j.aca.2007.01.005. ISSN 0003-2670.
- [73] GANJALI, M. R., H. R. SOBHI, H. FARAHANI, P. NOROUZI, R. DINARVAND a A. KASHTIARAY. Solid drop based liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(16), 2337-2341. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.026. ISSN 0021-9673.
- [74] ZANJANI, M. R. K., Y. YAMINI, S. SHARIATI a J. Å. JÖNSSON. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Analytica Chimica Acta*. 2007, **585**(2), 286-293. DOI: 10.1016/j.aca.2006.12.049. ISSN 0003-2670.
- [75] SELF, R. *Extraction of Organic Analytes from Foods - A Manual of Methods*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005. ISBN 978-0-85404-592-1.
- [76] FÁTIMA ALPENDURADA, M. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, **889**(1-2), 3-14. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00453-2. ISSN 0021-9673.

- [77] KATAOKA, H., H. L. LORD a J. PAWLISZYN. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, **880**(1-2), 35-62. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00309-5. ISSN 0021-9673.
- [78] BASHEER, Ch. a H. K. LEE. Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine herbicides in bovine milk and sewage sludge samples. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1047**(2), 189-194. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.06.130. ISSN 0021-9673.
- [79] JELEŃ, H. H., K. WLAZŁY, E. WAŚOWICZ a E. KAMIŃSKI. Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, **46**(4), 1469–1473. DOI: 10.1021/jf9707290. ISSN 0021-8561.
- [80] FEILDEN, A. *Update on Undertaking Extractable and Leachable Testing*. Shrewsbury: Smithers Rapra, 2010. ISBN 978-1-84735-455-6.
- [81] DOS ANJOS, J. P. a J. B. DE ANDRADE. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC-MS. *Microchemical Journal*. 2015, **120**, 69-76. DOI: 10.1016/j.microc.2015.01.009. ISSN 0026-265X.
- [82] DOS ANJOS, J. P. a J. B. DE ANDRADE. Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC-MS. *Microchemical Journal*. 2014, **112**, 119-126. DOI: 10.1016/j.microc.2013.10.001. ISSN 0026-265X.
- [83] LIU, D., S. MIN, H. PING a X. SONG. The application of directly suspended droplet microextraction for the evaluation of phthalic acid esters in cow's milk by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2016, **1443**, 66-74. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.062. ISSN 0021-9673.
- [84] Evropská komise, Nařízení Komise (EU) č. 1130/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách zavedením seznamu potravinářských přídatných látek Unie schválných pro použití v potravinářských přídatných látkách, potravinářských enzymech, potravinářských aromatech a živinách. Brusel: Úřední věstník Evropské unie, 2011, L 295.

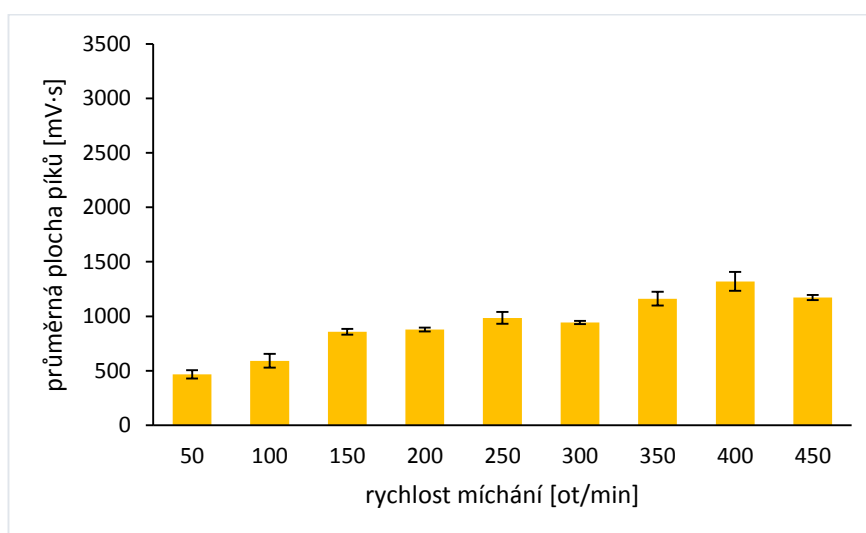
- [85] Ministerstvo zemědělství, Vyhláška č. 130/2010 Sb. ze dne 23. dubna 2010, kterou se mění vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Praha: Sbírka zákonů České republiky, 2010, částka 46.
- [86] SAGANDYKOVA, G. N., M. B. ALIMZHANOVA, Y. T. NURZHANOVA a B. KENESSOV. Determination of semi-volatile additives in wines using SPME and GC-MS. *Food Chemistry*. 2017, **220**, 162-167. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.164. ISSN 0308-8146.
- [87] ALVES FILHO, E. G., T. H. S. RODRIGUES, F. A. N. FERNANDES, E. S. de BRITO, P. J. CULLEN, J. M. FRÍAS, P. BOURKE, R. S. CAVALCANTE, F. D. L. ALMEIDA a S. RODRIGUES. An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2017. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.10.001. ISSN 1466-8564. V tisku.
- [88] INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE, M. *Dictionary of Food Science and Technology*. 2nd. Hoboken: Wiley, 2009. ISBN 978-1-4051-8740-4.
- [89] Plynová chromatografie: Plynová chromatografie s HiQ® speciálními plyny. *Technické plyny Česká republika* [online]. [cit. 2018-03-09].
Dostupné z: http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlynovaChromatogr_4_6_200979_15729.pdf?v=2.0
- [90] BOSÁKOVÁ, Z., P. COUFAL, I. JELÍNEK, V. PACÁKOVÁ, J. ŠEVČÍK, K. ŠTULÍK, Analytické separační metody. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2004. ISBN 80-245-0852-9.
- [91] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *Food Chemicals Codex*. Vyd. 10. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2016. ISBN 978-1-936424-51-1.
- [92] KROFTA, J. a kol. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II*. Vyd. 6. Praha: VŠCHT Praha, 2001. ISBN 80-7080-451-3.
- [93] Plamenový ionizační detektor: HiQ® speciální plyny v plynové chromatografii. *Technické plyny Česká republika* [online]. [cit. 2018-03-09].
Dostupné z: http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlamenoizolacniDetektor_INNA_22_4_200979_15731.pdf?v=2.0
- [94] Detektory v plynové chromatografii. *Mendelova univerzita v Brně* [online]. [cit. 2018-03-09].
Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52965

Přílohy

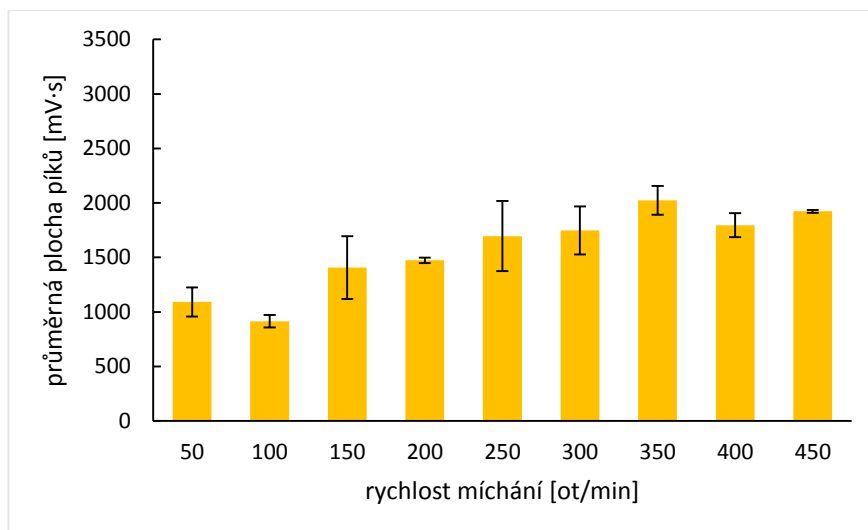
Příloha I. Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce jednou kapkou



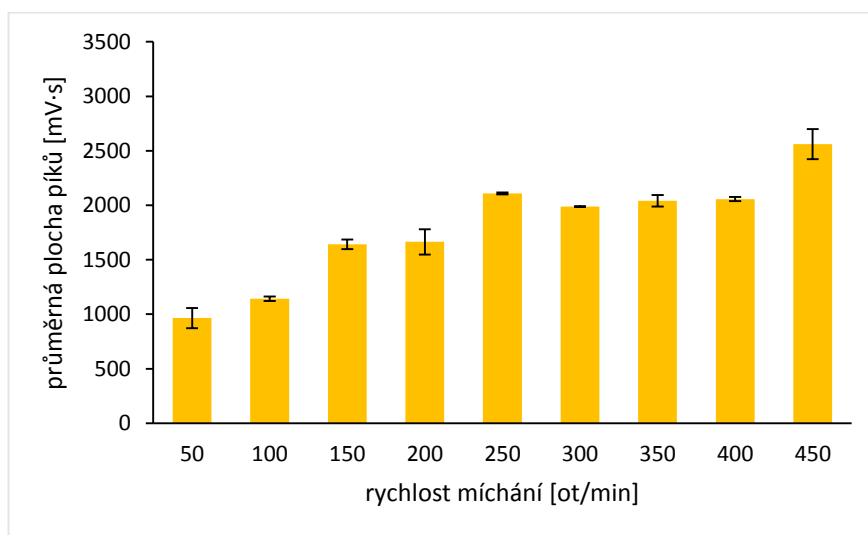
Obrázek I. 1: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro čas 5 minut ($n = 3$)



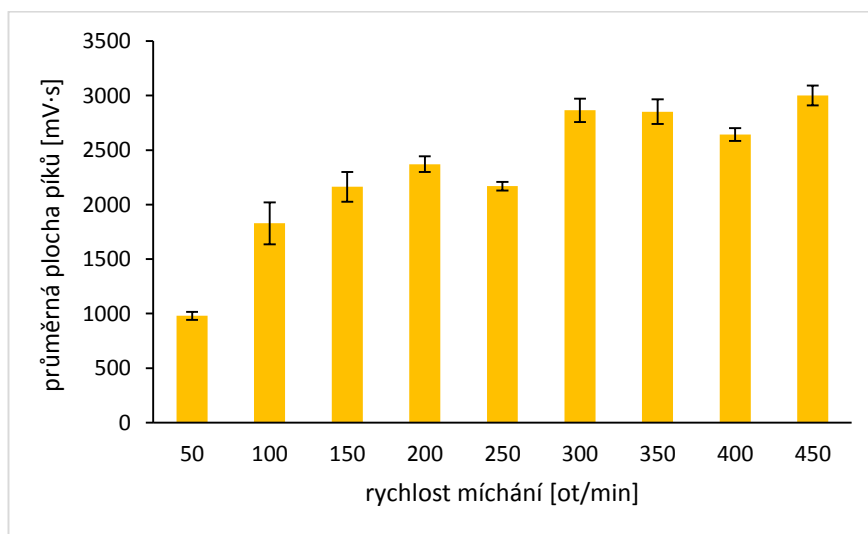
Obrázek I. 2: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro čas 10 minut ($n = 3$)



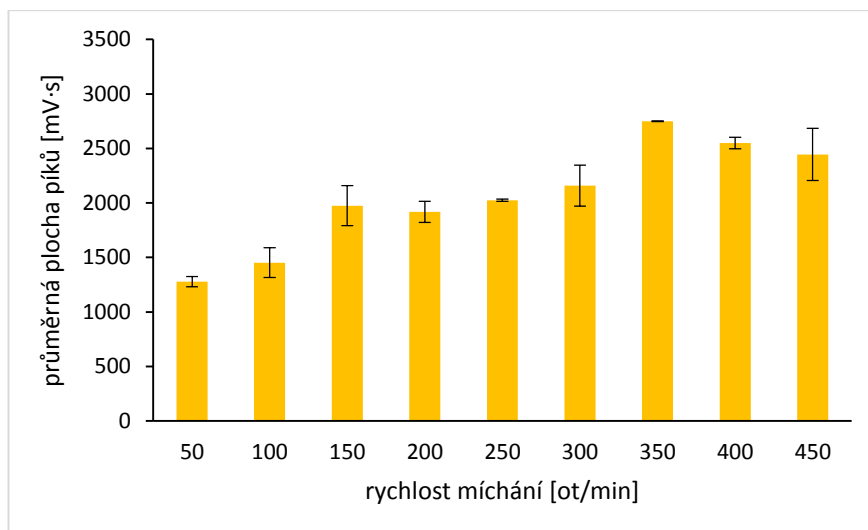
Obrázek I. 3: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro čas 15 minut ($n = 3$)



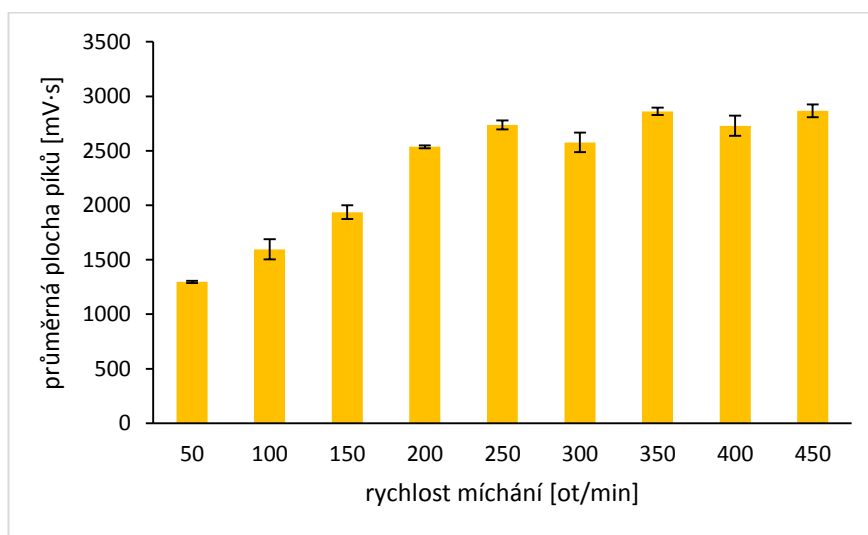
Obrázek I. 4: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro čas 20 minut ($n = 3$)



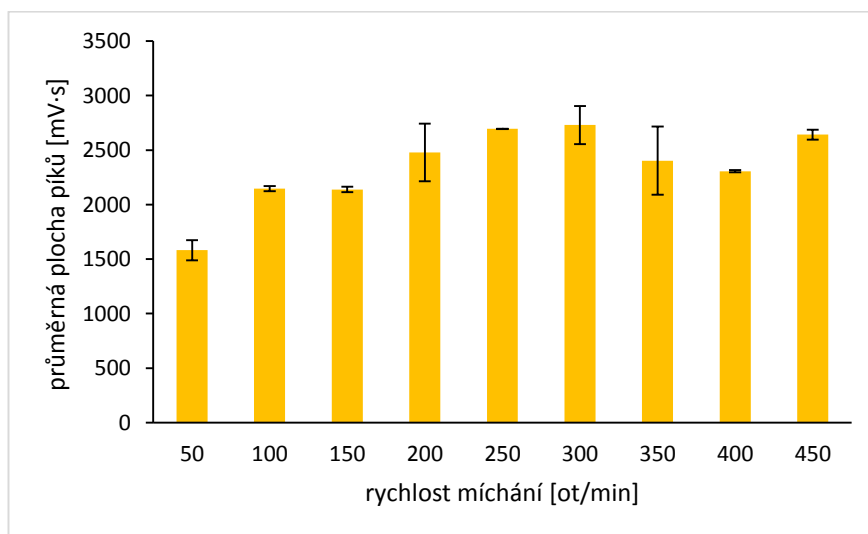
Obrázek I. 5: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro čas 25 minut ($n = 3$)



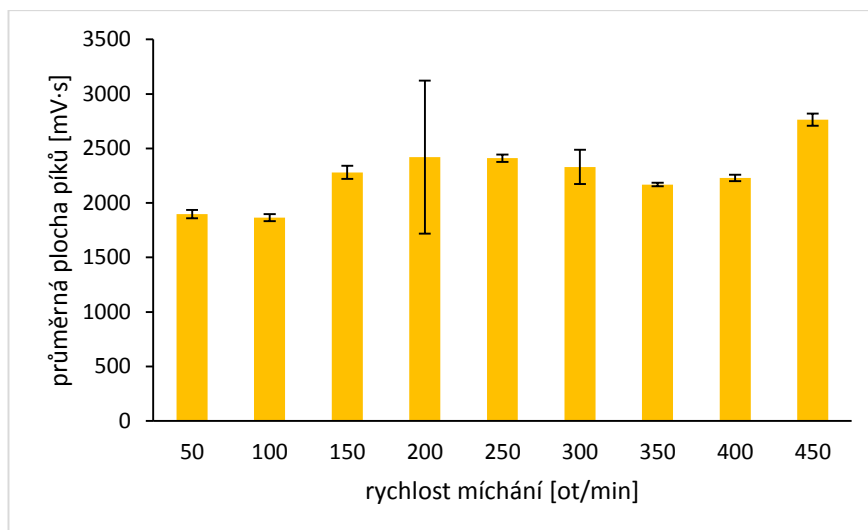
Obrázek I. 6: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých otáčkách pro čas 30 minut ($n = 3$)



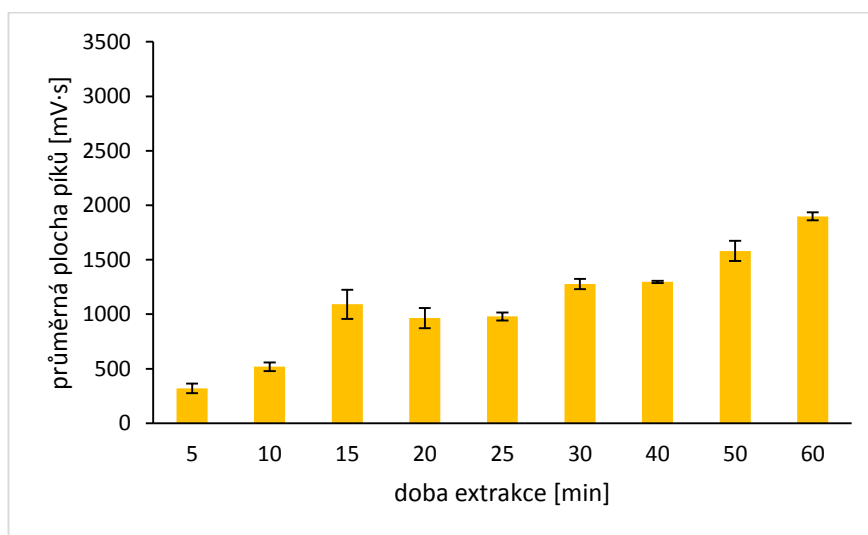
Obrázek I. 7: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých otáčkách pro čas 40 minut ($n = 3$)



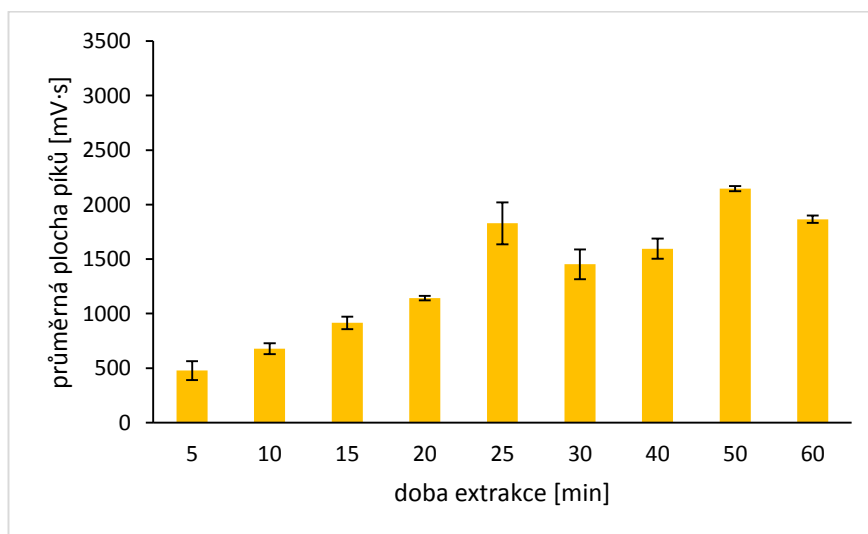
Obrázek I. 8: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých otáčkách pro čas 50 minut ($n = 3$)



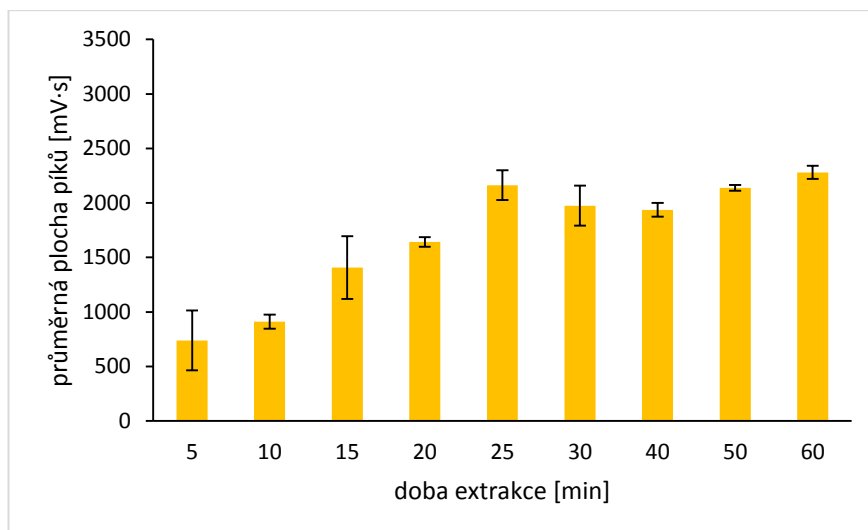
Obrázek I. 9: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých otáčkách pro čas 60 minut ($n = 3$)



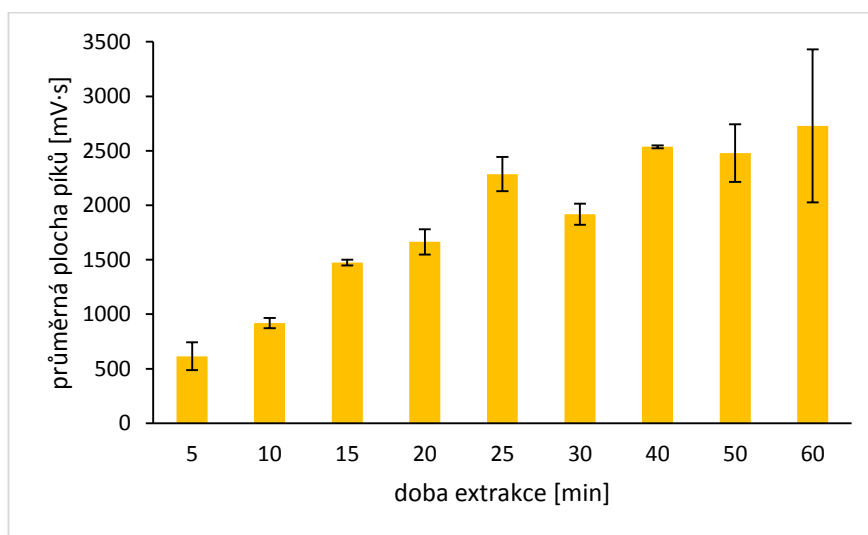
Obrázek I. 10: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 50 ot/min ($n = 3$)



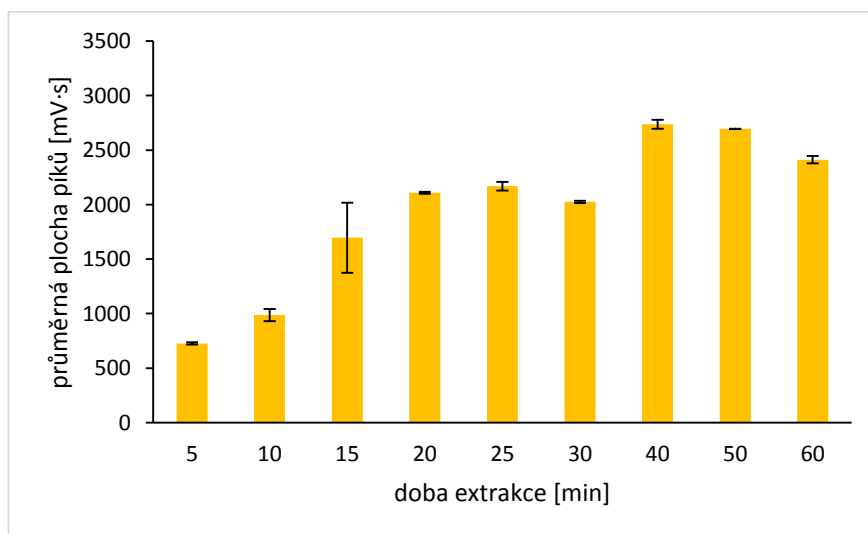
Obrázek I. 11: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 100 ot/min ($n = 3$)



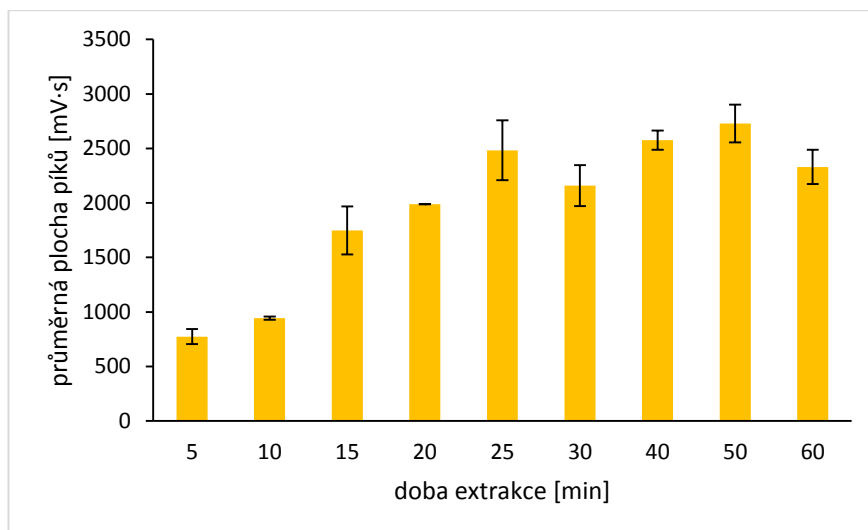
Obrázek I. 12: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 150 ot/min ($n = 3$)



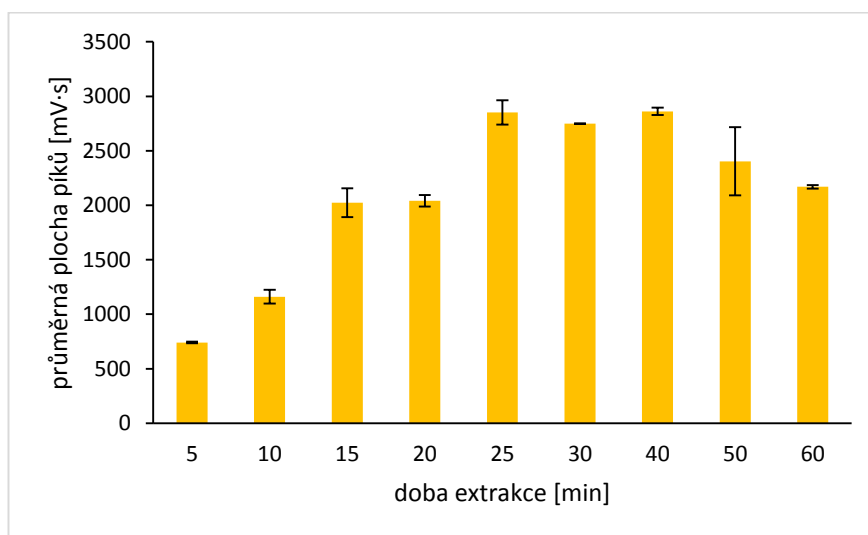
Obrázek I. 13: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 200 ot/min ($n = 3$)



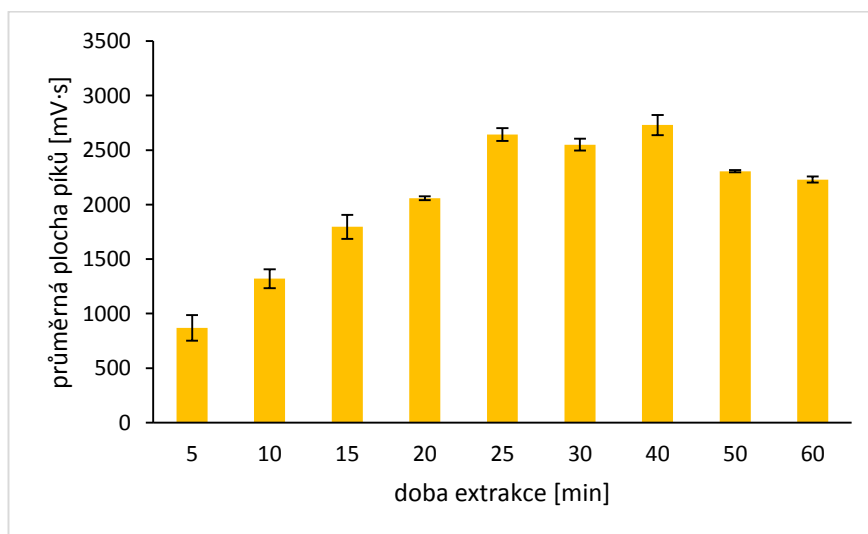
Obrázek I. 14: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 250 ot/min ($n = 3$)



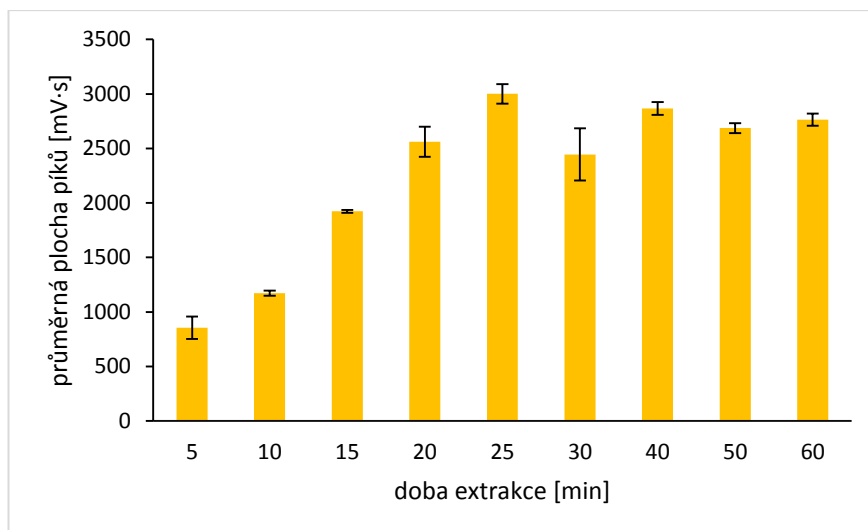
Obrázek I. 15: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 300 ot/min ($n = 3$)



Obrázek I. 16: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 350 ot/min ($n = 3$)

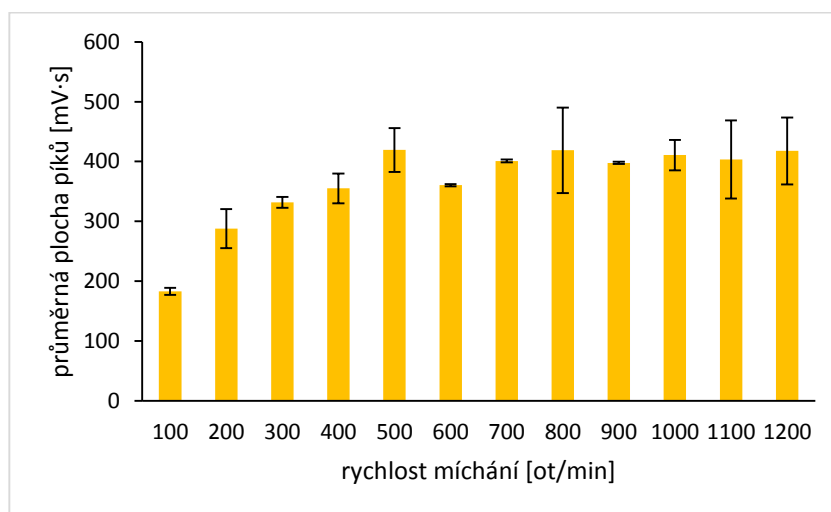


Obrázek I. 17: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 400 ot/min ($n = 3$)

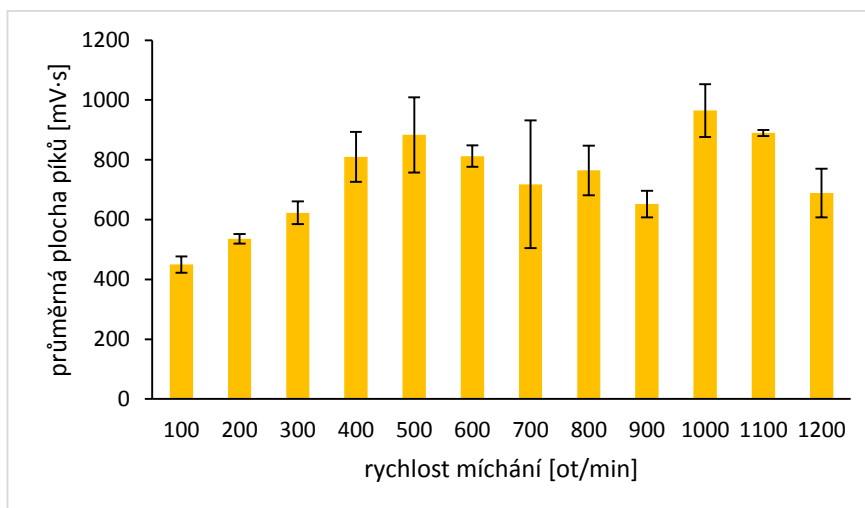


Obrázek I. 18: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 450 ot/min ($n = 3$)

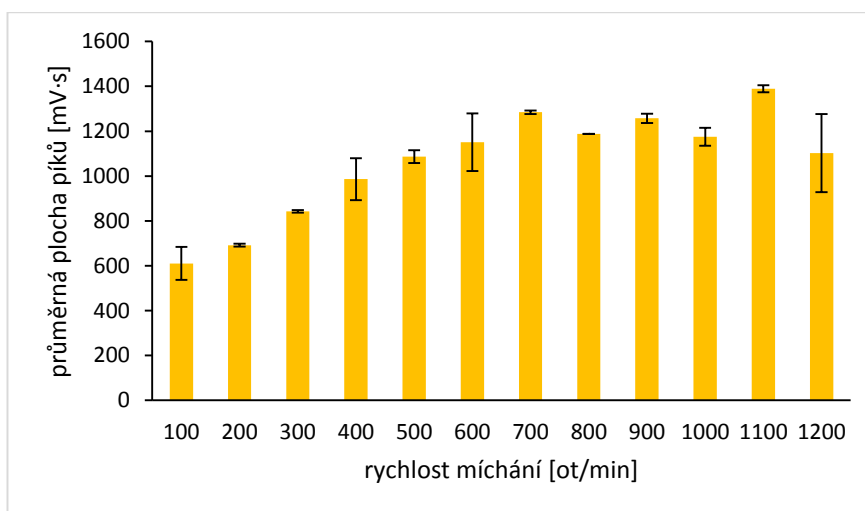
Příloha II. Optimalizace a kalibrace přímé mikroextrakce tuhou fází



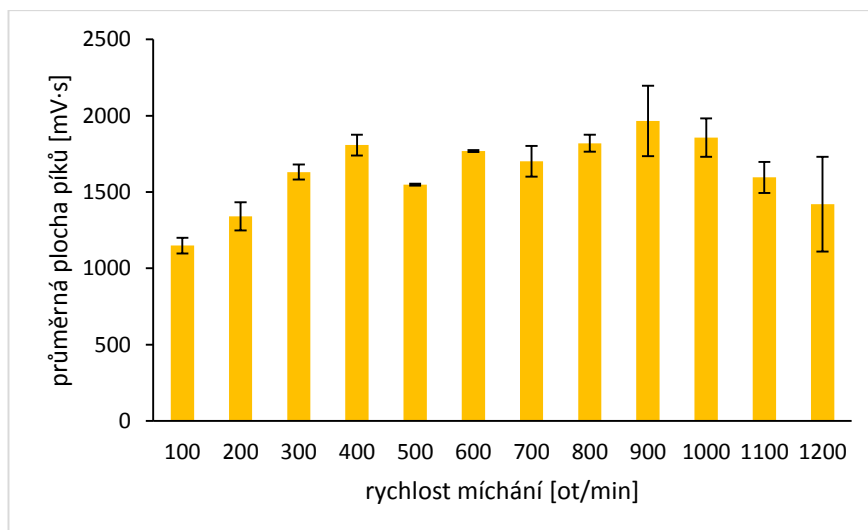
Obrázek II. 1: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 5 minut ($n = 3$)



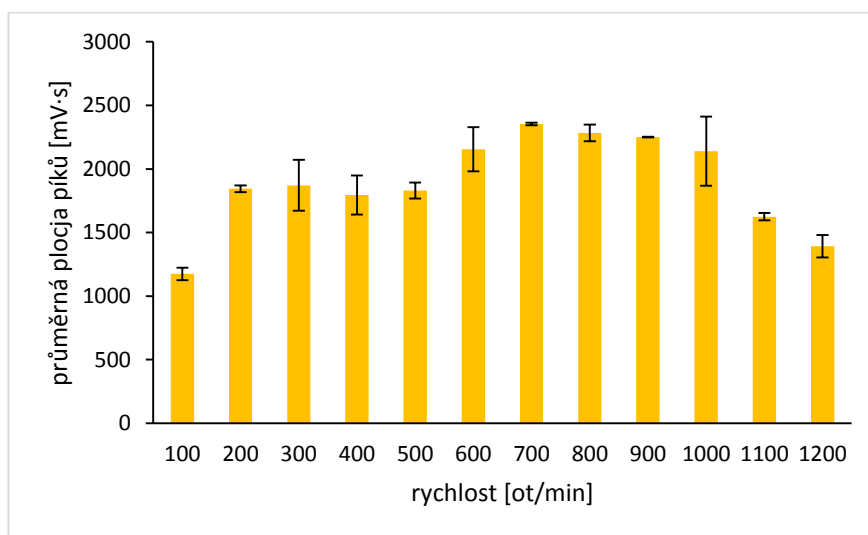
Obrázek II. 2: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 10 minut ($n = 3$)



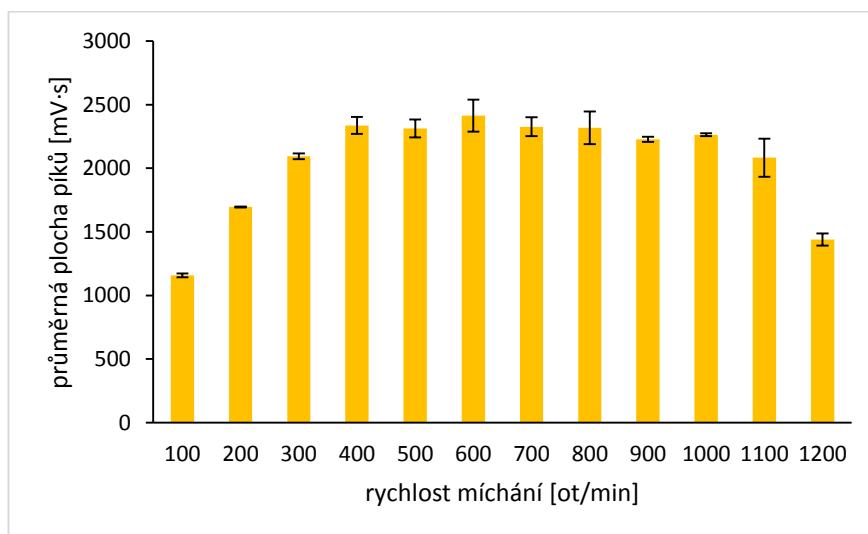
Obrázek II. 3: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 15 minut ($n = 3$)



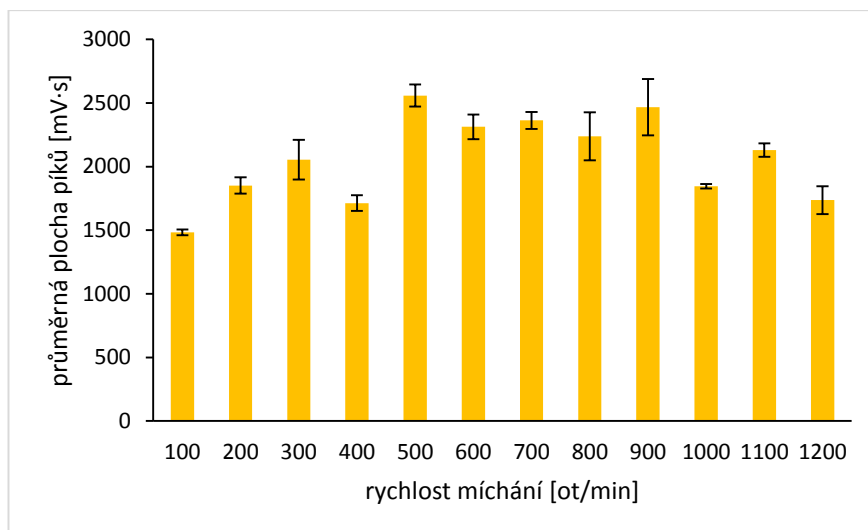
Obrázek II. 4: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 20 minut ($n = 3$)



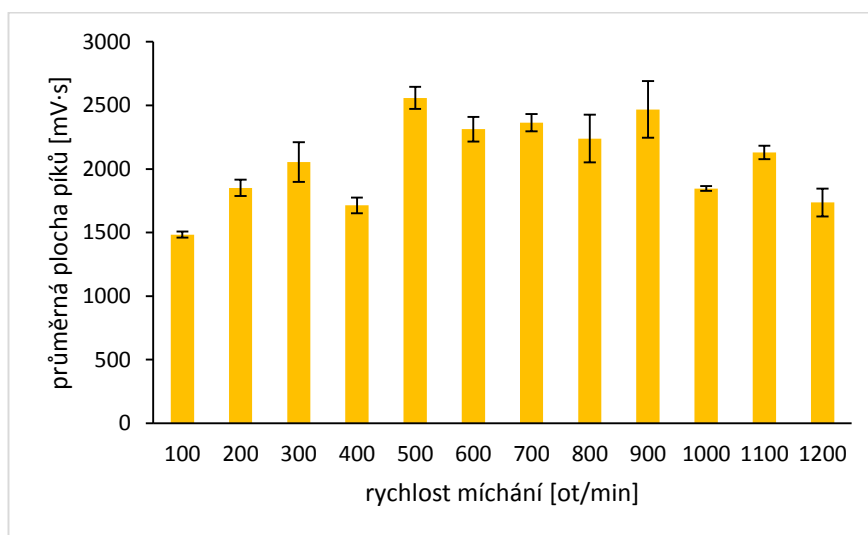
Obrázek II. 5: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 25 minut ($n = 3$)



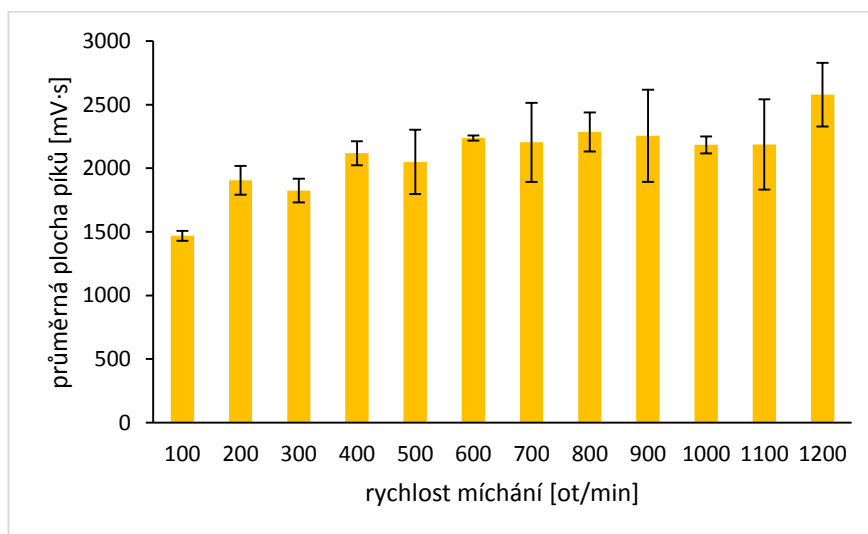
Obrázek II. 6: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 30 minut ($n = 3$)



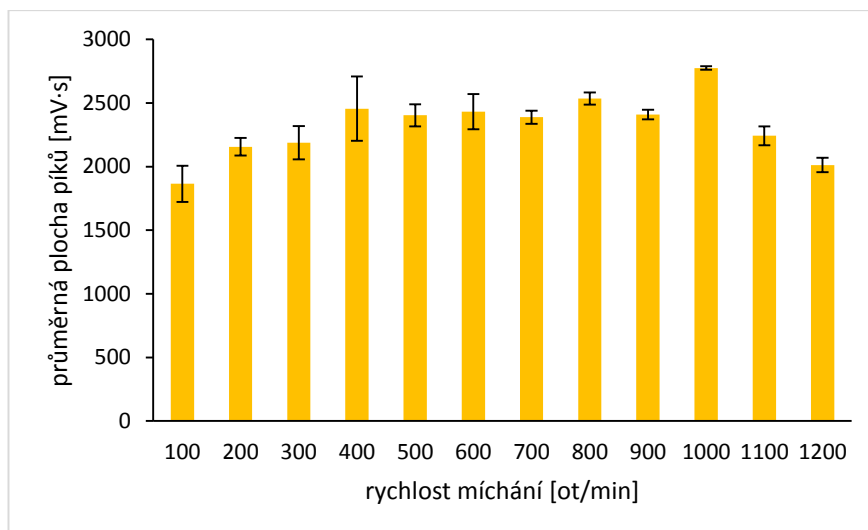
Obrázek II. 7: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 40 minut ($n = 3$)



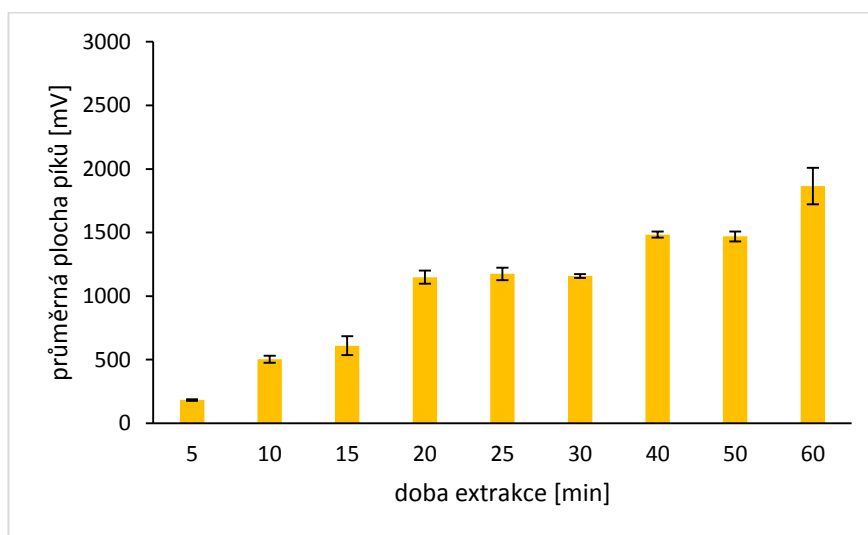
Obrázek II. 8: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 40 minut ($n = 3$)



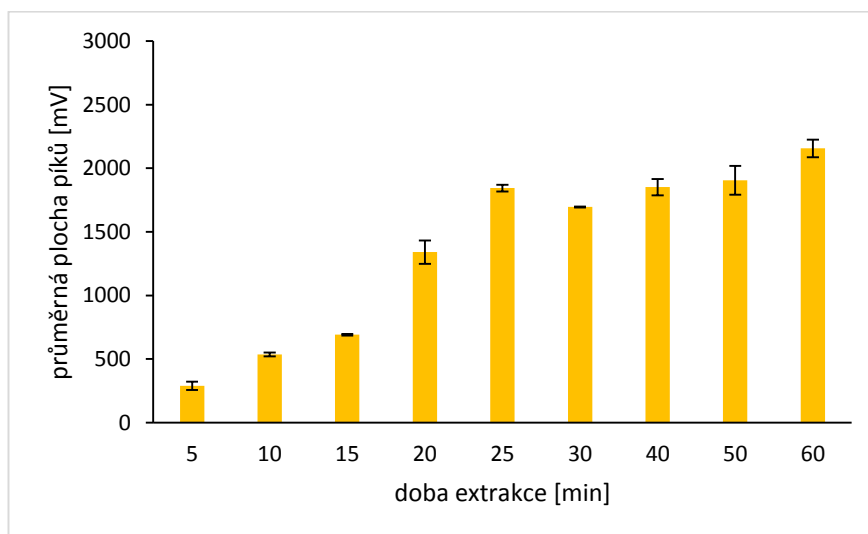
Obrázek II. 9: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 50 minut ($n = 3$)



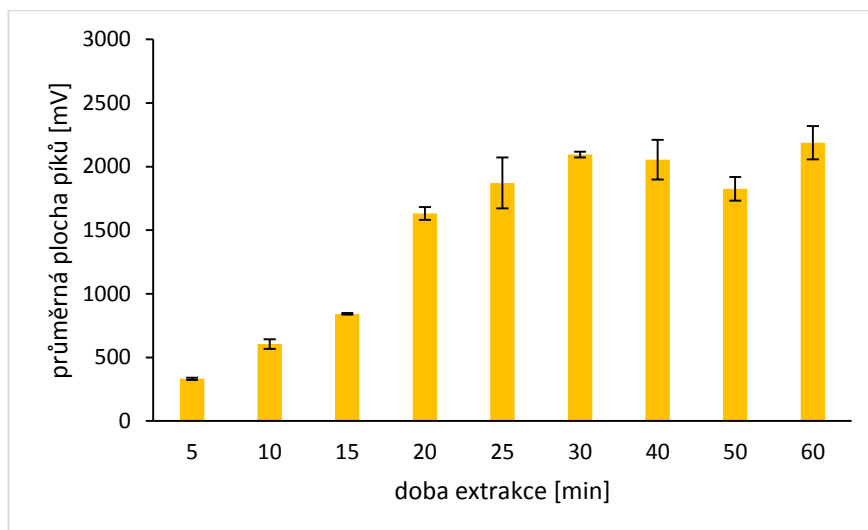
Obrázek II. 10: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých otáčkách pro 60 minut ($n = 3$)



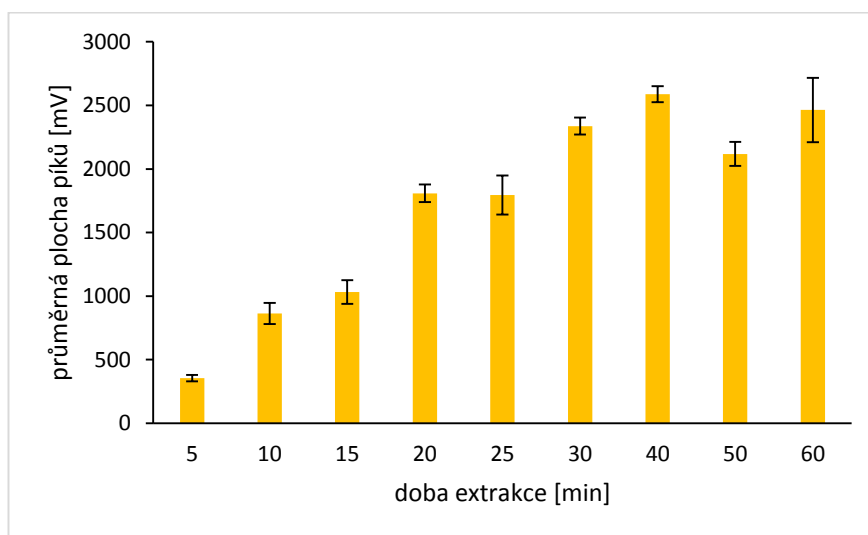
Obrázek II. 11: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 100 ot/min ($n = 3$)



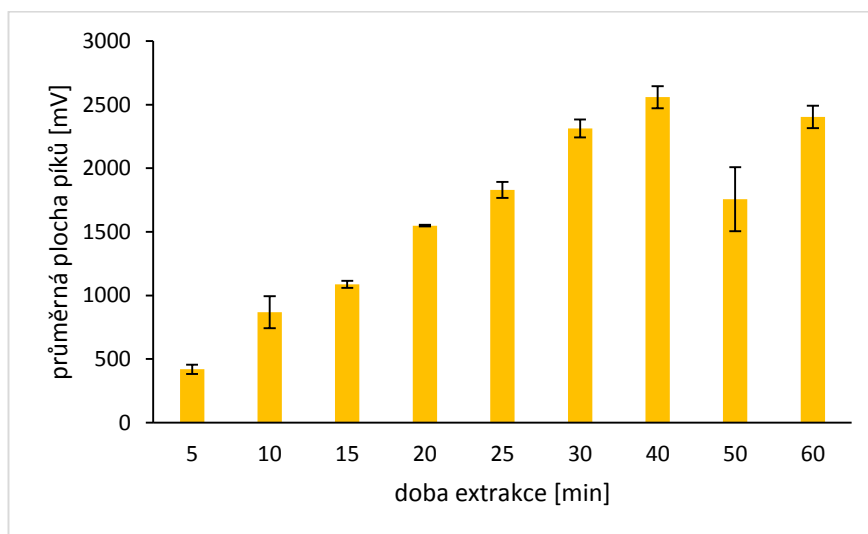
Obrázek II. 12: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 200 ot/min ($n = 3$)



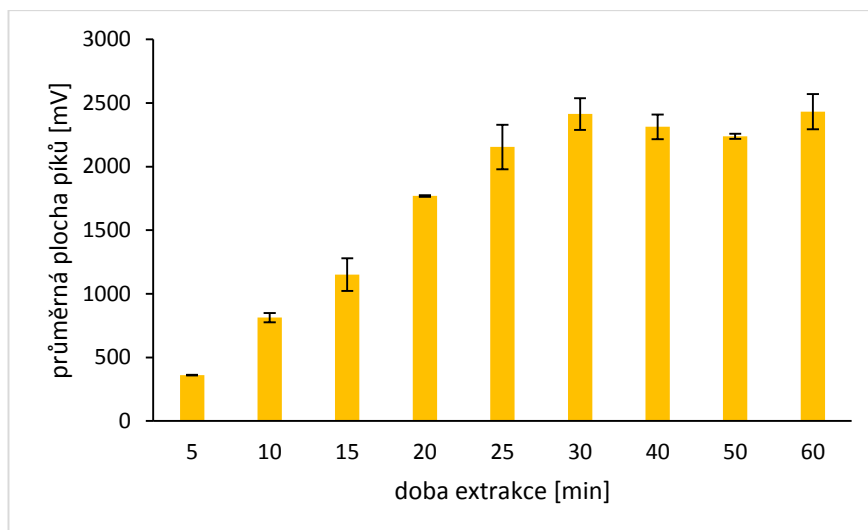
Obrázek II. 13: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 300 ot/min ($n = 3$)



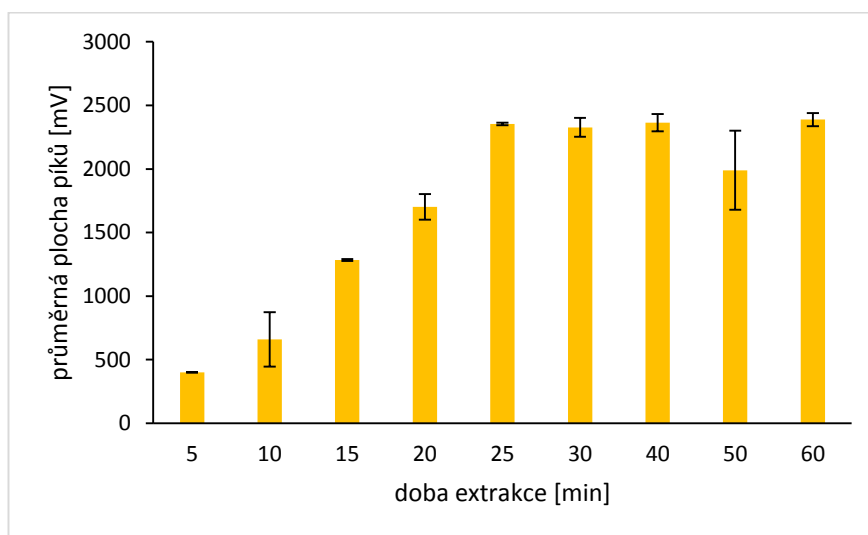
Obrázek II. 14: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 400 ot/min ($n = 3$)



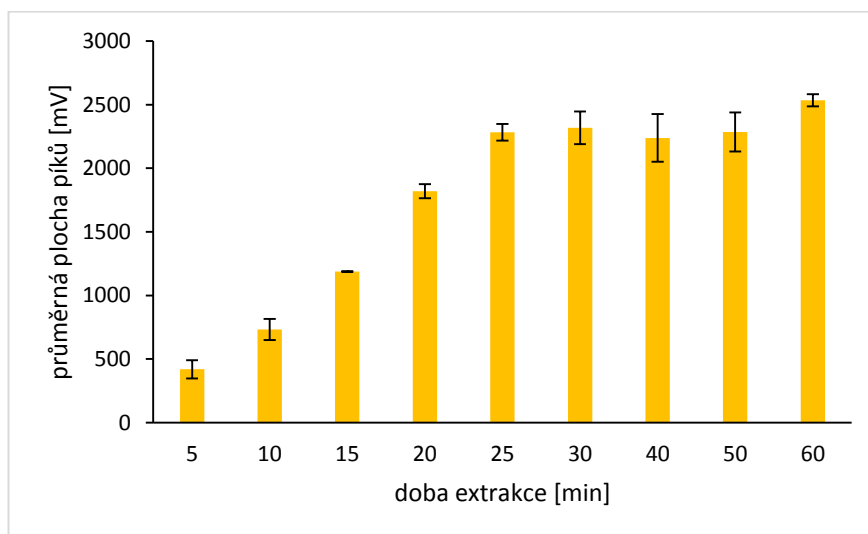
Obrázek II. 15: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 500 ot/min ($n = 3$)



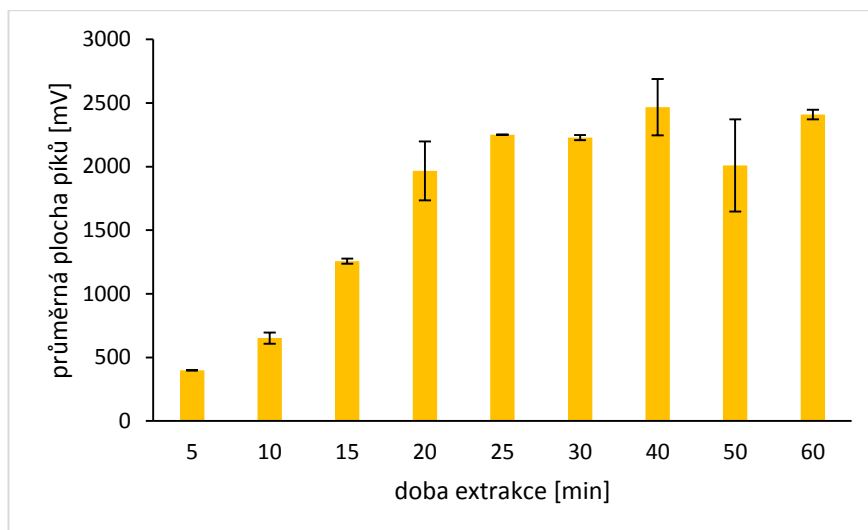
Obrázek II. 16: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 600 ot/min ($n = 3$)



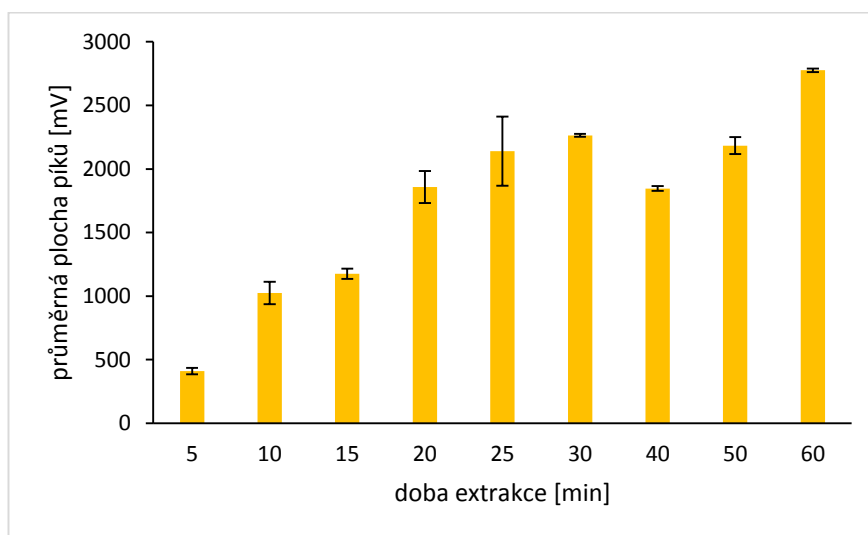
Obrázek II. 17: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 700 ot/min ($n = 3$)



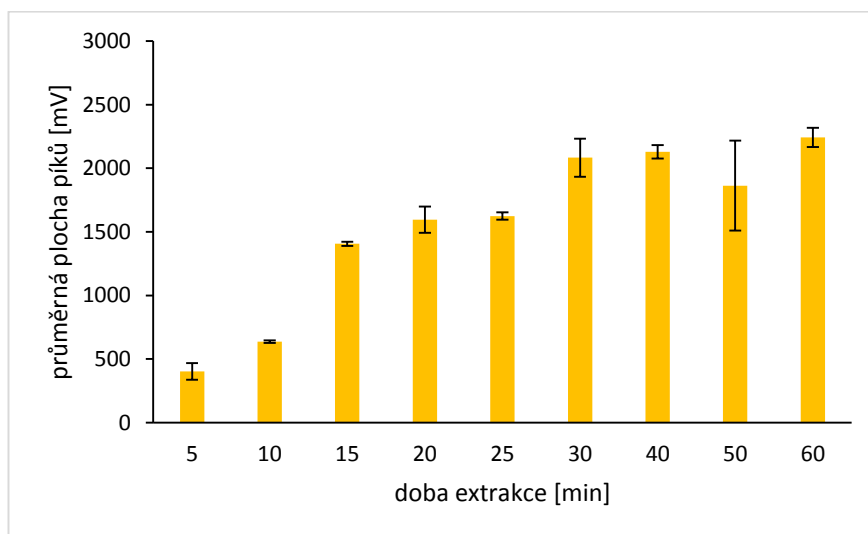
Obrázek II. 18: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 800 ot/min ($n = 3$)



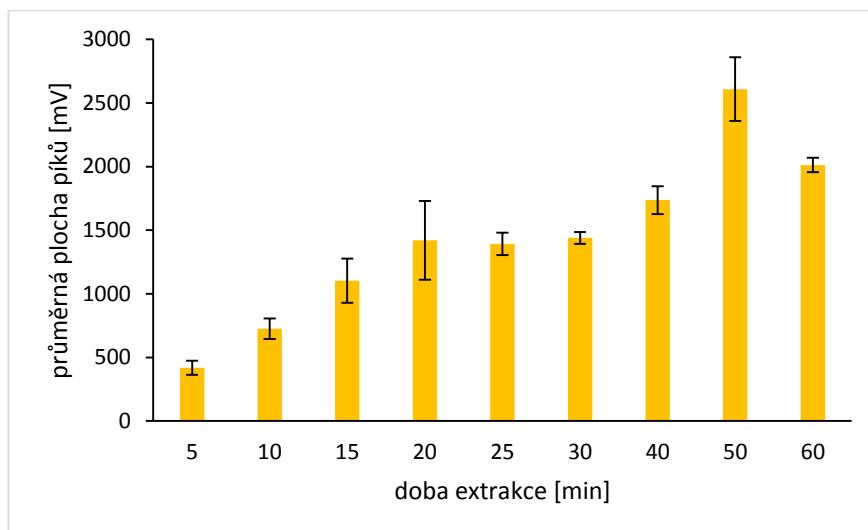
Obrázek II. 19: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 900 ot/min ($n = 3$)



Obrázek II. 20: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 1000 ot/min ($n = 3$)

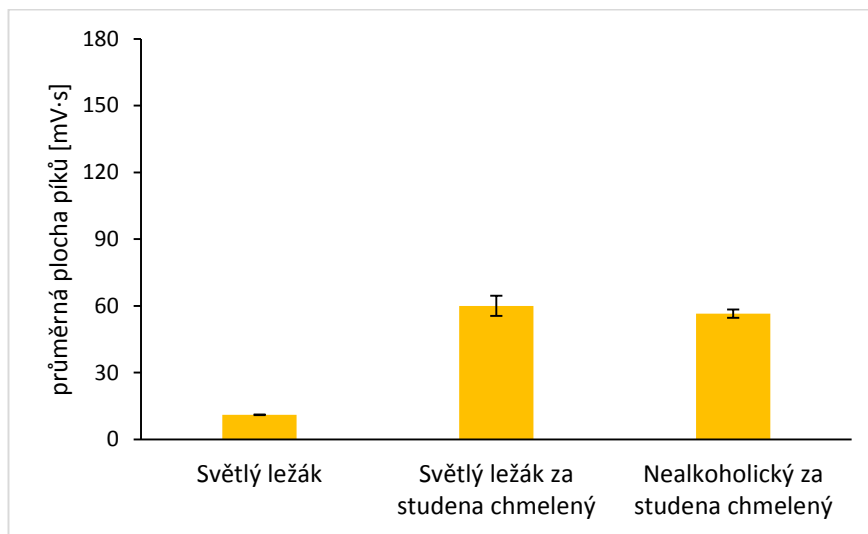


Obrázek II. 21: Závislost průměrné plochy píků na jednotlivých časech při 1100 ot/min ($n = 3$)

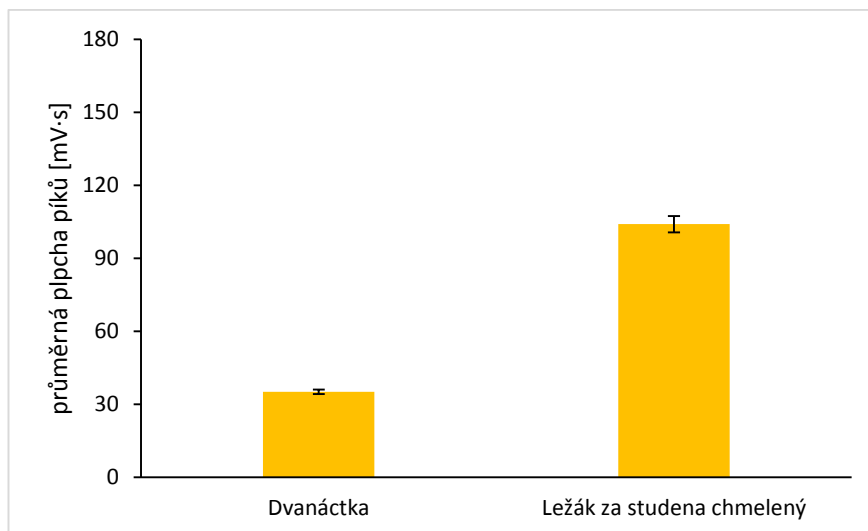


Obrázek II. 22: Závislost průměrné plochy píkú na jednotlivých časech při 1200 ot/min ($n = 3$)

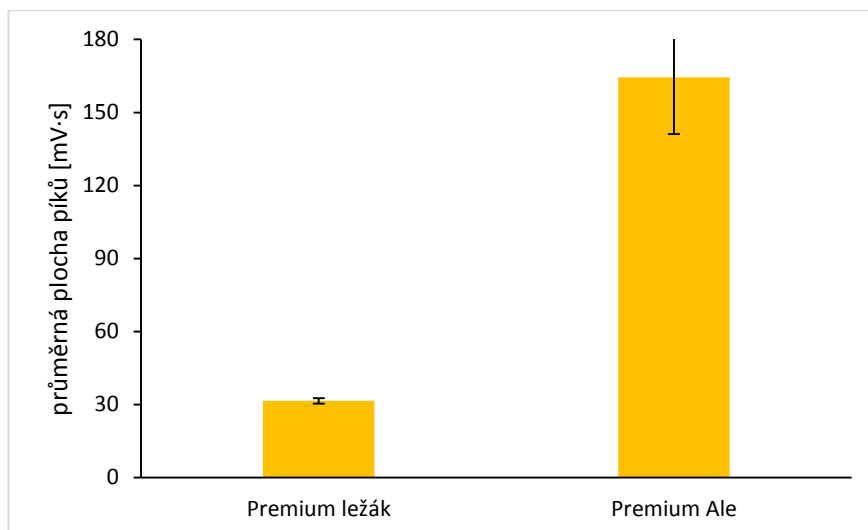
Příloha III. Analýzy reálných vzorků



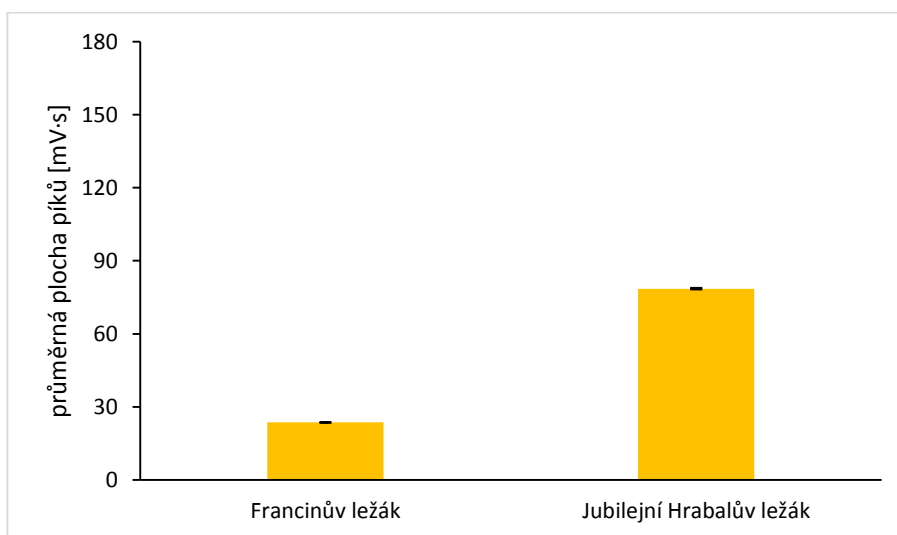
Obrázek III. 1: Porovnání reálných vzorků značky Bakalář ($n = 3$)



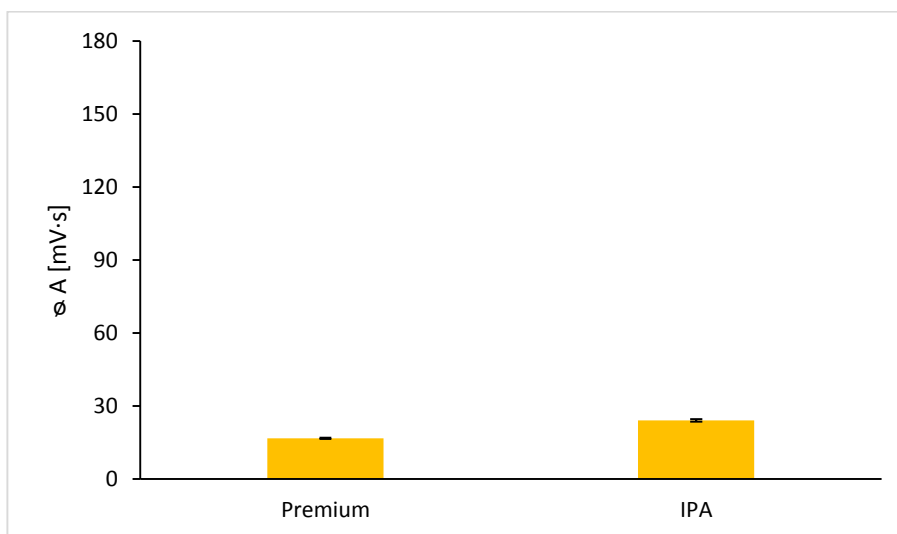
Obrázek III. 2: Porovnání reálných vzorků značky Krušovice ($n = 3$)



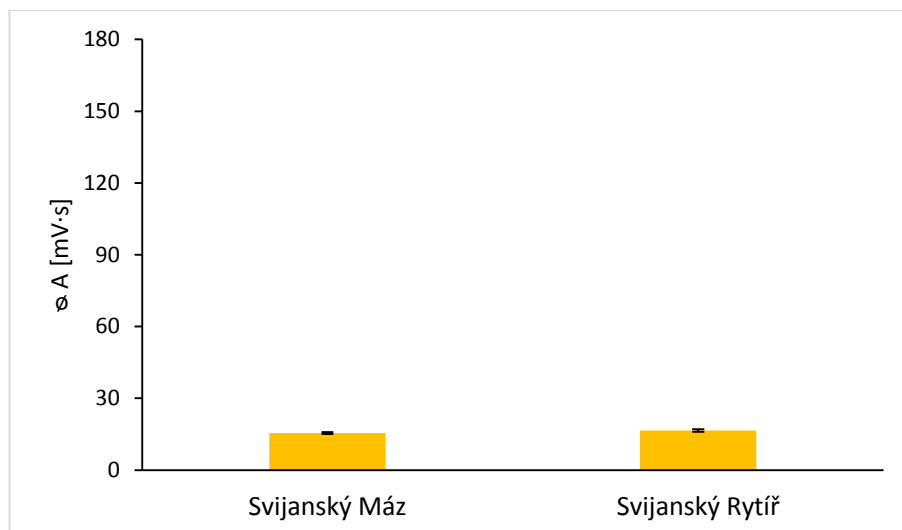
Obrázek III. 3 Porovnání reálných vzorků značky Lobkowicz ($n = 3$)



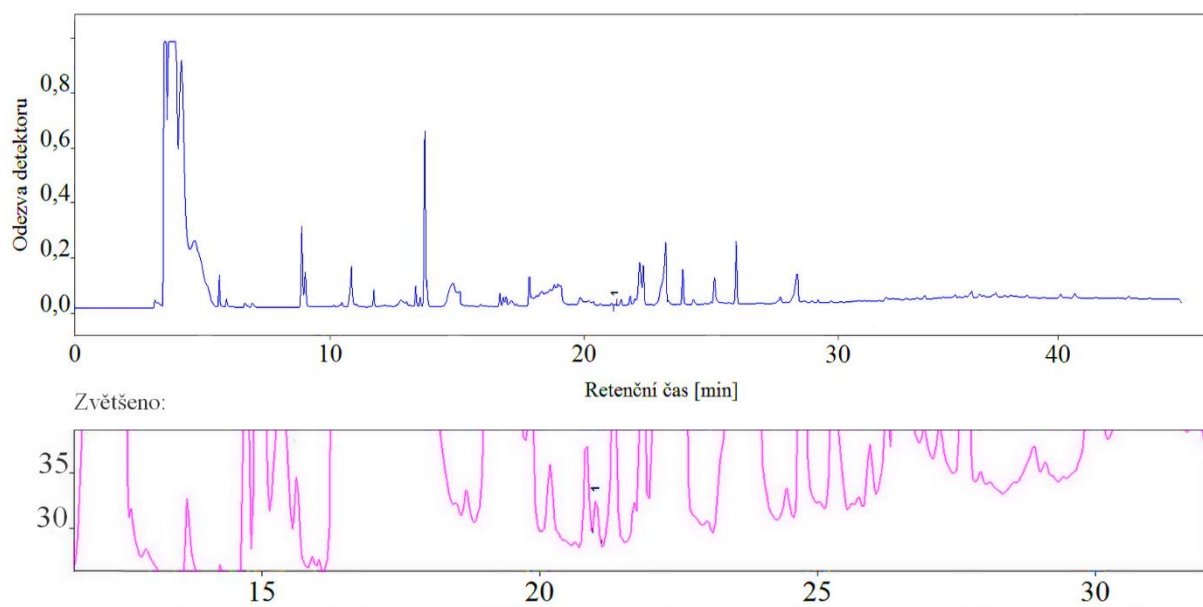
Obrázek III. 4: Porovnání reálných vzorků značky Postržižinské ($n = 3$)



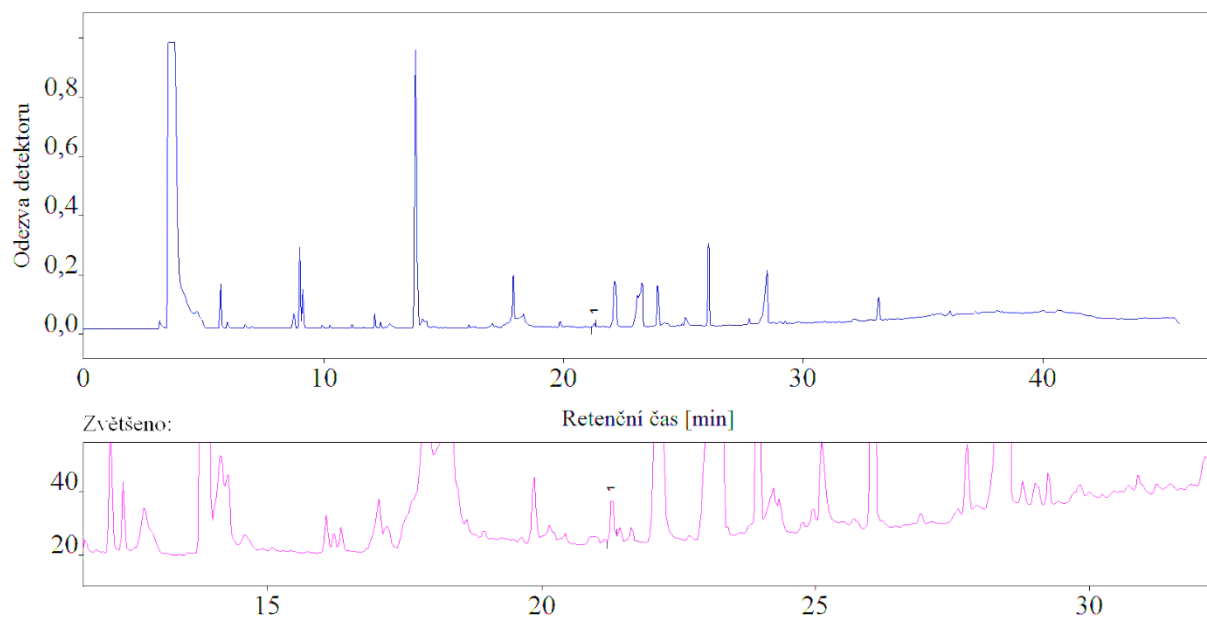
Obrázek III. 5: Porovnání reálných vzorků značky Primátor ($n = 3$)



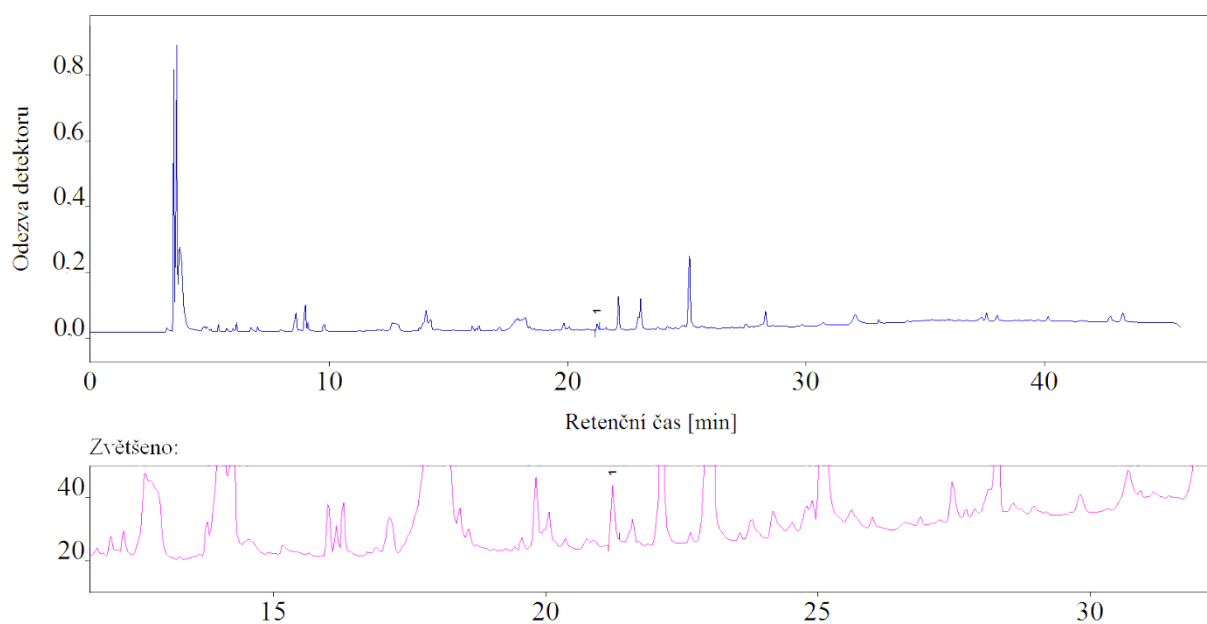
Obrázek III. 6: Porovnání reálných vzorků značky Svijany ($n = 3$)



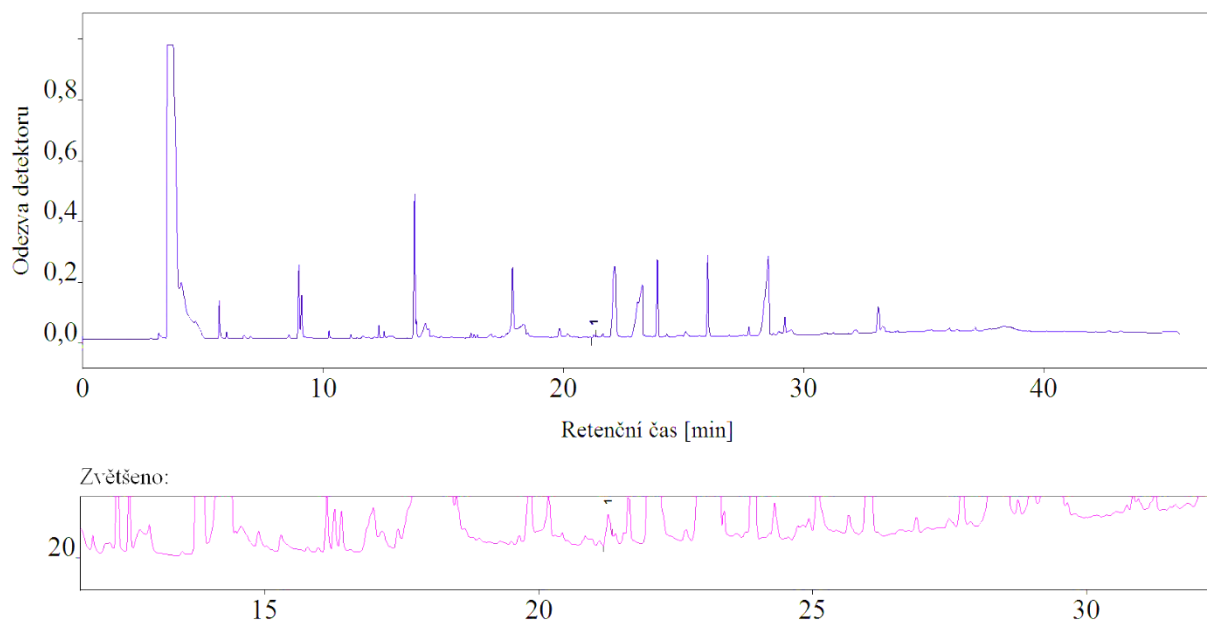
Obrázek III. 7: Chromatogram reálného vzorku Bakalář – Světlý ležák



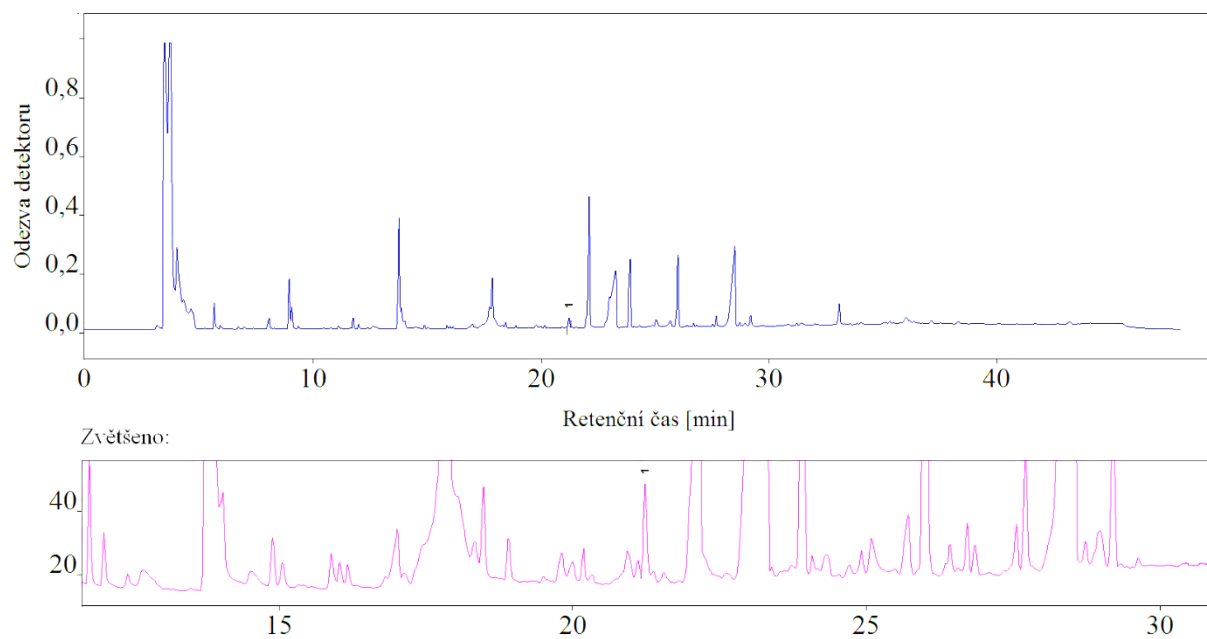
Obrázek III. 8: Chromatogram reálného vzorku Bakalář – Světlý ležák za studena chmelený



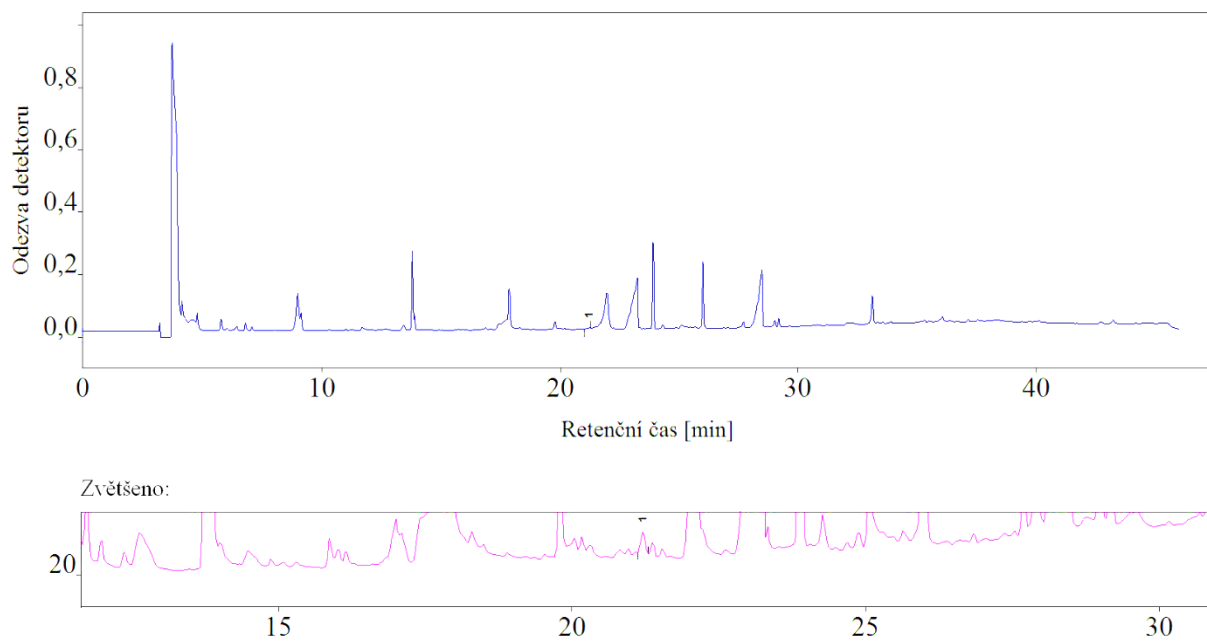
Obrázek III. 9: Chromatogram reálného vzorku Bakalář – Nealkoholický za studena chmelený



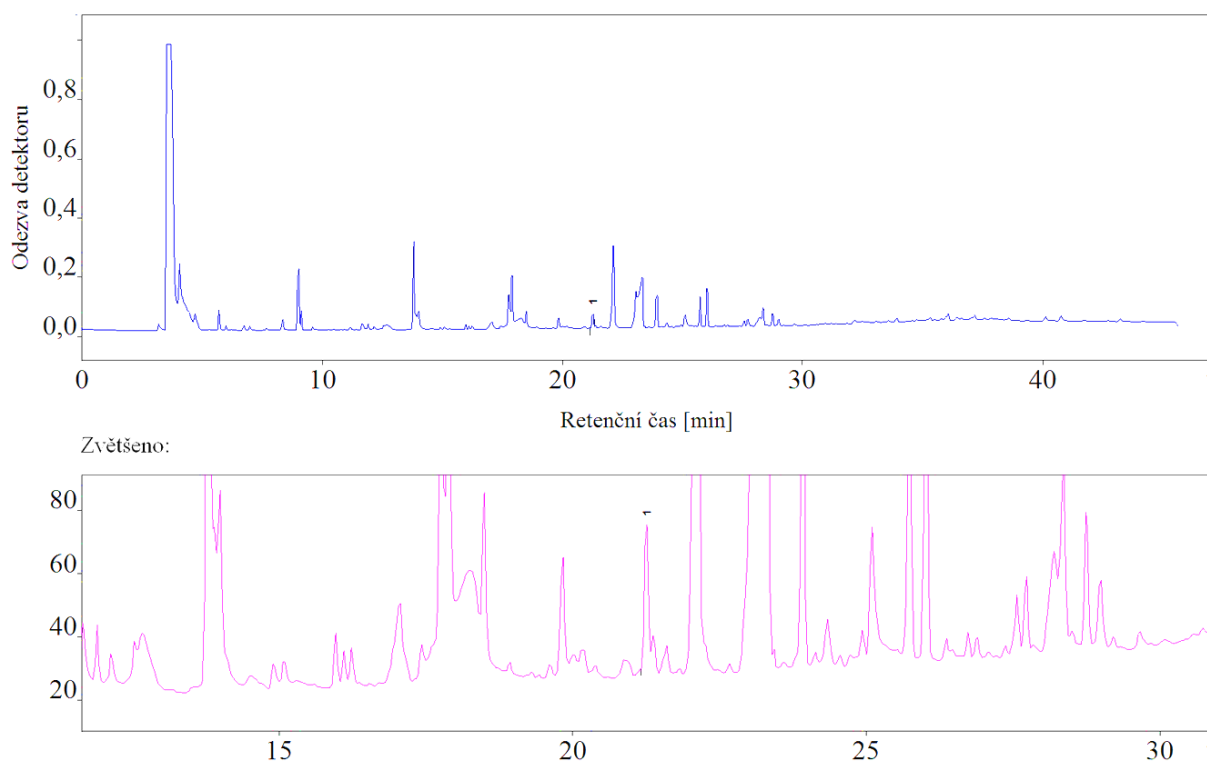
Obrázek III. 10: Chromatogram reálného vzorku Krušovice – Dvanáctka



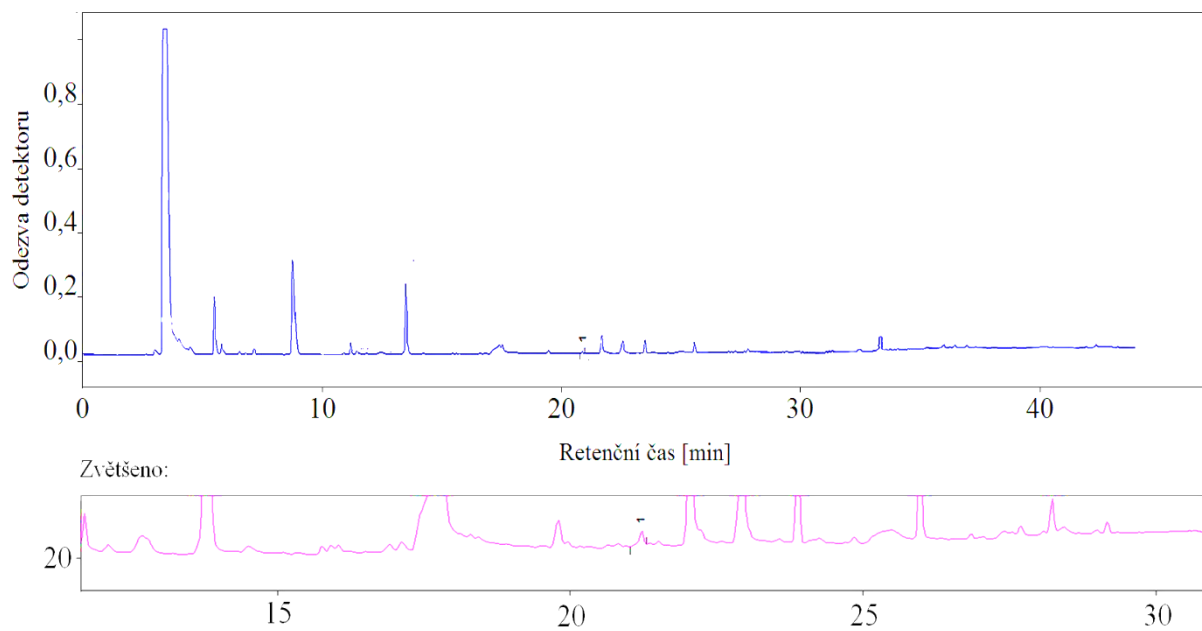
Obrázek III. 11: Chromatogram reálného vzorku Krušovice – Ležák za studena chmelený:



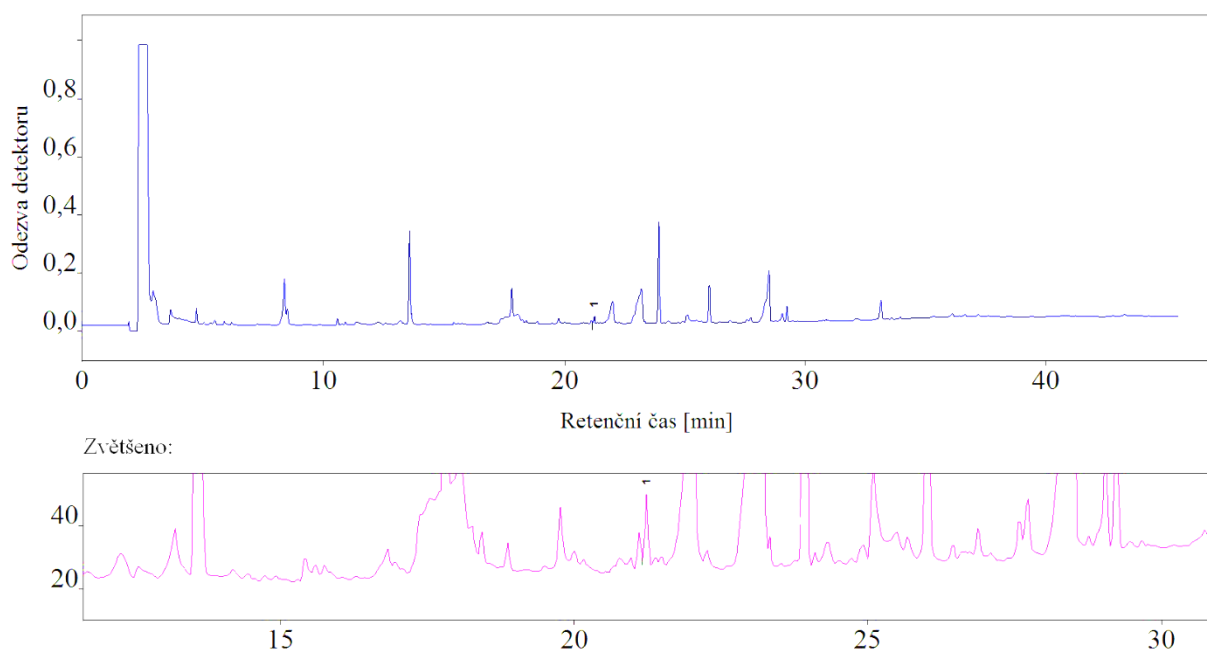
Obrázek III. 12: Chromatogram reálného vzorku Lobkowicz – Premium ležák



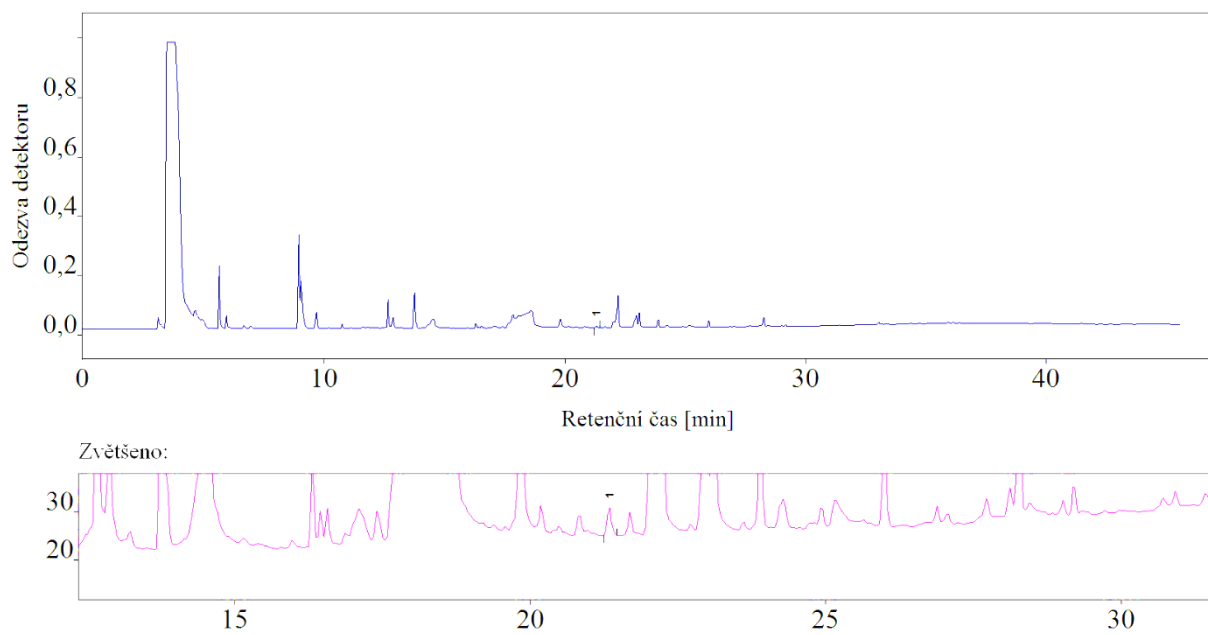
Obrázek III. 13: Chromatogram reálného vzorku Lobkowicz - Premium Ale



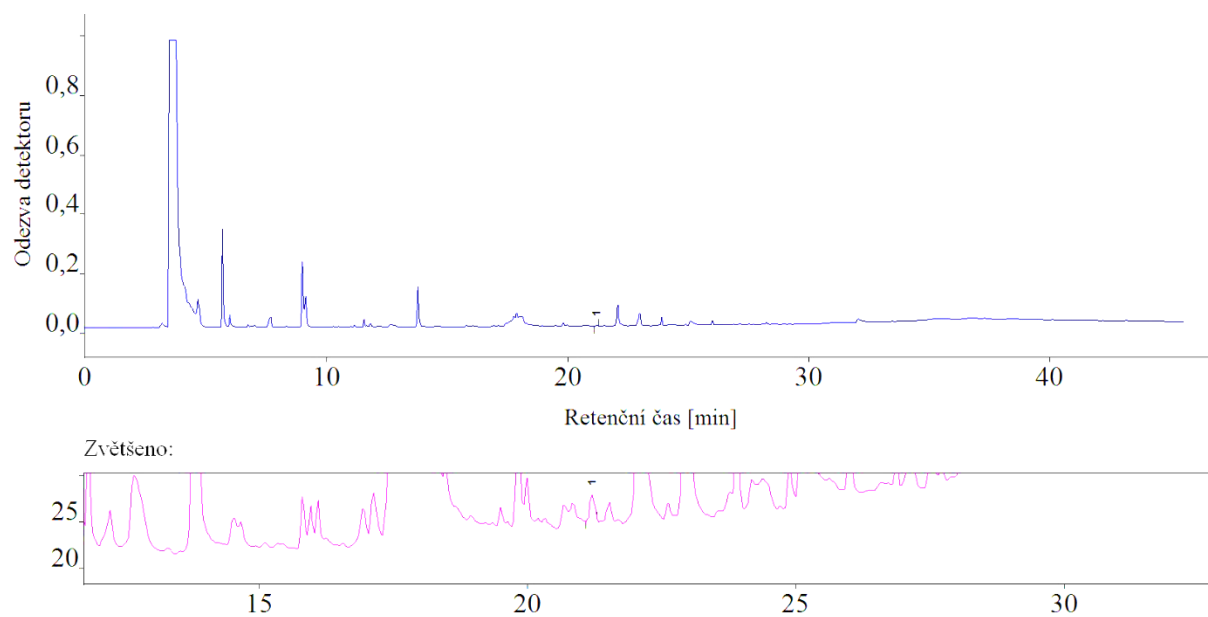
Obrázek III. 14: Chromatogram reálného vzorku Postřižinské - Francinův ležák



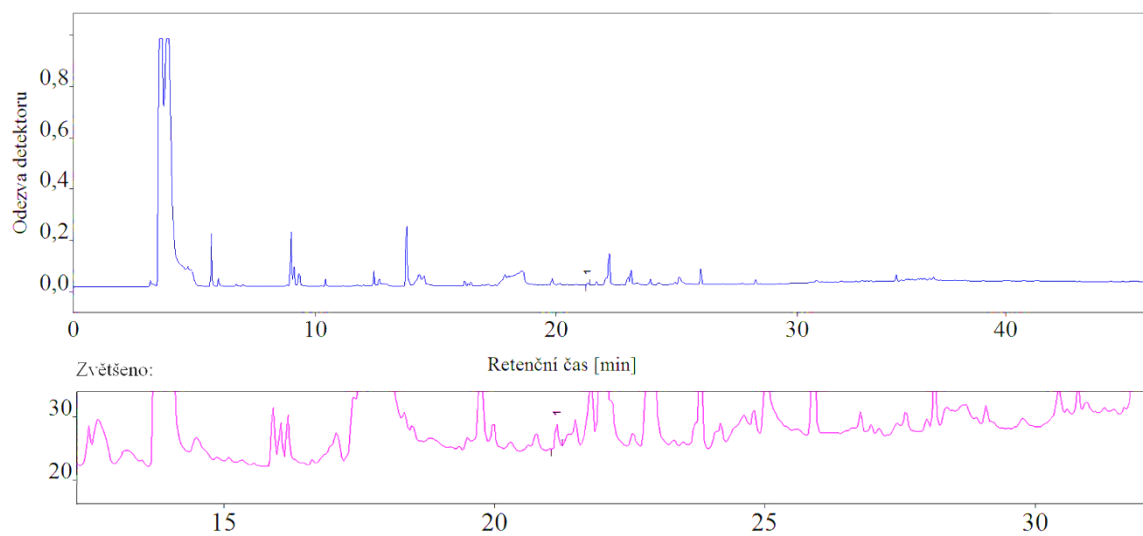
Obrázek III. 15: Chromatogram reálného vzorku Postřižinské - Jubilejní Hrabalův ležák



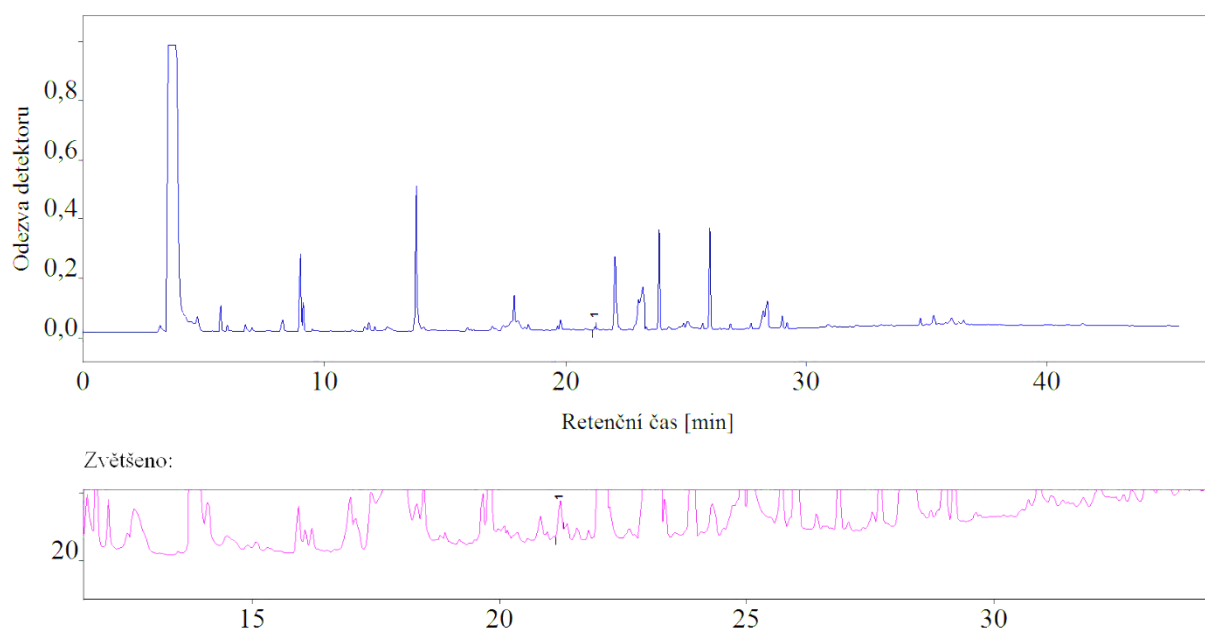
Obrázek III. 16: Chromatogram reálného vzorku Primátor – Premium



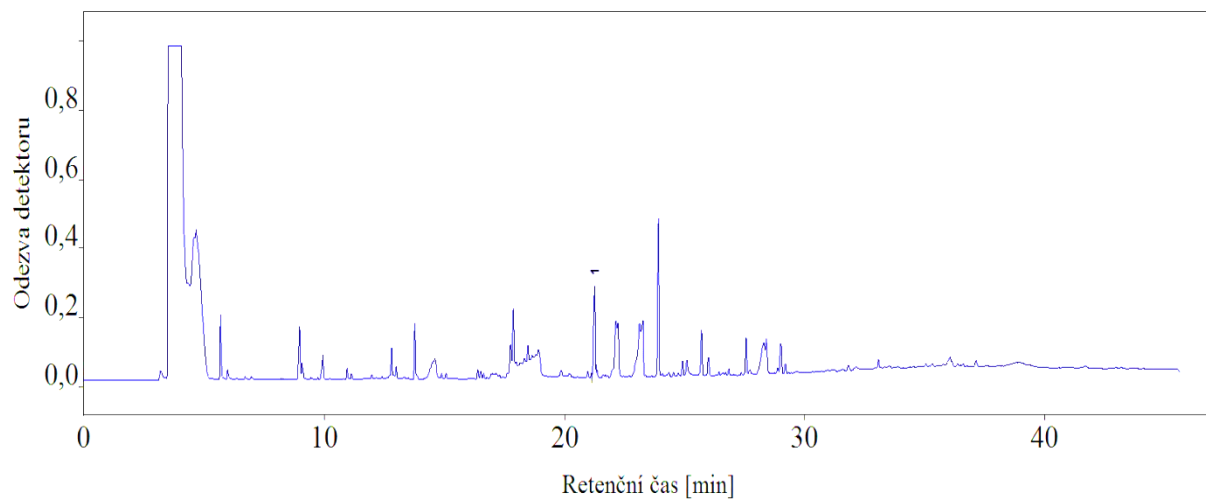
Obrázek III. 17: Chromatogram reálného vzorku Primátor - India Pale Ale



Obrázek III. 18: Chromatogram reálného vzorku Svijany - Svijanský máz



Obrázek III. 19: Chromatogram reálného vzorku Svijany - Svijanský rytíř



Obrázek III. 20: Chromatogram reálného vzoru Raven - Gunslinger