

Z výzkumu a praxe

STANOVENÍ CHMELOVÝCH SILIC METODOU MIKROEXTRAKCE NA TUHOU FÁZI (SPME)

Ing. KAREL KROFTA, Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Doc. Ing. JAROSLAV ČEPIČKA, Csc., Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Klíčová slova: chmel, chmelové silice, mikroextrakce na pevnou fázi, plynová chromatografie

1 ÚVOD

Chmelové silice patří mezi důležité sekundární metabolity chmele, a to jak z pivovarského, tak chemotaxonomického hlediska. Jsou nositelem typického chmelového aróma, které se v transformované formě přenáší i do piva. Obsahují více než 200 látek různého chemického složení. Absolutní obsahy řady složek nebo jejich vzájemné poměry jsou geneticky závislé. Největší podíl (přibližně 75 % jejich hmotnosti) tvoří terpenické uhlovodíky, a to jak monoterpenické (α -pinen, β -pinen, myrcen, limonen), tak seskviterpenické (β -karyofylen, α -humulen, β -farnesen, α -selinen, β -selinen, trans- α -bergamoten aj.). Z kyslíkaté frakce, která tvoří zhruba 25 % hmotnosti silic, jsou nejvíce zastoupeny methylestery vyšších mastných kyselin ($C_6 - C_{11}$) a alifatické 2-ketony. Složení silice je důležitým chemotaxonomickým parametrem chmelových odrůd a novošlechtění. Má nezastupitelný význam při identifikaci odrůd chmele a jejich klasifikaci [1, 2, 3]. Identitu odrůdy lze určit nejen z hlávkového a granulovaného chmele, ale i z chmelových extraktů. Důležitým předpokladem je však šetrná izolace silic tak, aby při ní nedocházelo k sekundárním změnám jejího složení.

Zatímco pro vlastní analýzu složení chmelových silic se používá téměř výhradně plynová chromatografie, k přípravě vzorku silice z chmele lze použít metod několik. Tradiční metodou izolace silic z chmele je destilační metoda, při které jsou složky silice uvolňovány z matrice destilací s vodní párou [4, 5]. Celý postup se provádí většinou za atmosférického tlaku, jsou však popsány i postupy, které izolaci provádí za sníženého tlaku [6]. Tyto postupy jsou časově náročné a k dosažení spolehlivých výsledků vyžadují poměrně velké množství chmele (min. 50 g). Z dalších metod jsou popsány různé extrakční metody používající organická rozpouštědla [7, 8], nebo superkritická fluidní extrakce (SFE) oxidem uhličitým [9]. Nevýhodou extrakčních metod je možnost kontaminace vzorku nebo ztráta analytů během zakoncentrování primárního extraktu.

Principiálně odlišný přístup analýzy chmelových silic je založen na přímém vzorkování plynné fáze nad pevným

vzorkem chmele v uzavřené vzorkovnici. Tyto postupy jsou často označovány jako „head space“ metody. V provedení statické „head space“ je vzorek plynné fáze injikován přímo na analytickou kolonu plynového chromatografu [10, 11]. K dosažení uspokojivé citlivosti metody je však nutno vytvořit dostatečnou tenzi těkavých látek, čehož se dosahuje zahříváním vzorku chmele při zvýšené teplotě po definovanou dobu [12].

Poměrně novou separační technikou, která nalézá stále širší uplatnění při separaci organických látek z plynné, kapalné i pevné fáze, je mikroextrakce na tuhou fázi (Solid Phase MicroExtraction – SPME). Metoda, která byla původně vyvinuta pro extrakci těkavých látek z odpadních vod [13], nepoužívá při separaci žádná organická rozpouštědla. Je založena na sorpci analytů na povrchu křemenného vlákna, které je pokryto aktivní vrstvou sorbentu nebo polymeru. Vlákno může být ponořeno do kapaliny nebo v provedení „head-space“ exponováno v plynné fázi nad kapalným nebo pevným vzorkem. Zachycené látky jsou z vlákna termicky desorbovány na analytickou kolonu v nástřikovém prostoru plynového chromatografu. Pro kapalinovou chromatografii se k uvolnění zachycených látek používá speciální adaptér s desorpční komorou, ve které jsou látky vymývány proudem mobilní fáze a nánášeny na HPLC kolonu.

Pro „head-space“ techniku byl vypracován jednoduchý kinetický model [14]. Podle tohoto modelu je látkové množství složky zachycené na vláknech dáno vztahem (1)

$$(1) \quad n = \frac{C_0 V_1 V_2 K_1 K_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} = \frac{C_0 V_1 V_2 K}{K V_1 + K_2 V_3 + V_2}$$

V_1, V_2, V_3 – objem aktivní vrstvy SPME vlákna, objem vzorku (nemusí nutně být pevný), objem plynného prostoru nad vzorkem

C_0 – počáteční koncentrace látky ve vzorku
 $K_1 = C_1/C_3$ – rozdělovací koeficient koncentrací látky mezi vlákno a plynnou fázi
 $K_2 = C_3/C_2$ – rozdělovací koeficient koncentrací látky mezi plynnou fázi a pevný vzorek

Pro celkovou rovnováhu platí:

$$(2) \quad K = K_1 K_2 = C_1/C_2$$

SPME metoda je použitelná i pro analýzy méně těkavých látek bez dosažení fázové rovnováhy za předpokladu dostatečného zakoncentrování na SPME vláknech. Díky tomu našla široké uplatnění v dalších oblastech analytické chemie především při analýze těkavých látek a vůní v nápojích, ovoci [15, 16], koření, jedlých olejích a dalších potravinách [17], i v analýze rostlinných silic [18]. V oblasti pivovarovství a vinařství se používá při stanovení esterů a alkoholů v pivu [19, 20], vicinálních diketonů v pivu a vínu [21, 22]. Stanovením chmelových silic metodou SPME se doposud zabývala práce Field, Nickerson z roku 1996 [23]. Složení silice je hodnoceno zejména z pohledu poměru humulen/karyofylen pro jeden typ SPME vlákna při různých experimentálních podmínkách.

Tato práce předkládá další poznatky o využití SPME techniky v analýze chmelových silic. Vzhledem k širokému spektru chemických a fyzikálních vlastností jednotlivých složek silice byly odzkoušeny další typy SPME vláken s polárnějším charakterem polymerní fáze za různých experimentálních podmínek. Naměřená data jsou porovnána s klasickou destilační metodou.

2 MATERIÁL A METODY

Vzorky

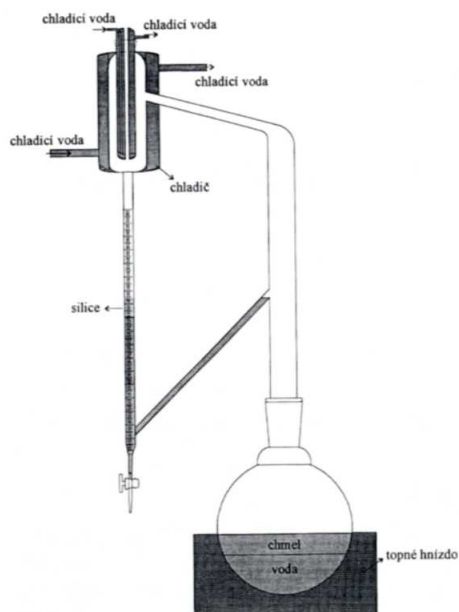
K provedení experimentálních prací byly použity tyto odrůdy chmele:

- Žatecký poloraný červeňák
- Samčí chmel ze sbírky Chmelařského institutu v Žatci.

Chmele byly sklizeny v optimálním stadiu zralosti a sušeny 12 hodin při teplotě 55 °C. Po usušení byly chmele zabaleny a až do zpracování uchovávány v temnu při teplotě + 4 °C.

Destilační metoda izolace chmelových silic

Izolace chmelových silic byla provedena na aparatuře, jejíž schéma je na obr. 1. Celý pracovní postup, který je dále stručně popsán, byl odzkoušen a validován na několika odrůdách chmele [24,



Obr. 1 Schéma aparatury na izolaci chmelových silic destilační metodou

25]. Do zábrusové varné baňky o objemu 4 litry byly přidány 2 litry destilované vody a 100 g chmele. Na baňku byl nasazen kolimátor s vodním chlazením a celá aparatura byla umístěna do topného hnízda. Obsah baňky byl přiveden k varu. Za začátek destilace silice byl považován okamžik, kdy zkondenzovaná voda začala separační trubicí přetékat zpět do varné baňky. Doba varu byla 90 minut. Po skončení varu a ochlazení baňky byla z kolimátoru nejprve odpuštěna destilovaná voda. Vydestilovaná silice, která se udržovala na hladině vodního sloupce, se odpustila do předem zvážené zkumavky. Pokud byla silice zakalená, přidalo se 0,1 g bezvodého síranu sodného. Vysušená silice byla injikována na kolonu plynového chromatografu.

„Head-space“ SPME metoda izolace chmelových silic (HS-SPME)

K extrakci složek chmelové silice byl použit SPME manuální držák (SUPELCO) a čtyři typy SPME vláken (SUPELCO) o délce 10 mm. Charakteristika testovaných vláken je uvedena v tab. 1. Všechna vlákna byla před použitím aktivována v souladu s předpisy výrobce. Čistota používaného vlákna byla denně kontrolována desorpcí při 250 °C po dobu 5 minut.

Tab. 1 Charakteristika SPME vláken

Označení	Max. teplota [°C]	Typ (sorbentu) polymeru	Síla filmu [μm]
PDMS 100	280	Polydimethylsiloxan	100
PDMS 30	280	Polydimethylsiloxan	30
PDMS/DVB 65	270	Styren-divinylbenzen Částečně síťovaný	65
PA 85	320	Polyakrylát Částečně síťovaný	85

Vlastní extrakce byla provedena tak, že do 4 ml vzorkovnice (vialky) byl navážen mletý chmel v množství 0,1 až 0,3 g. Po uzavření byla vialka s navážkou vložena do vyhřívaného bloku. Poté bylo přes septum do plynného prostoru nad chmelem vysunuto SPME vlákno a exponováno po dobu 30 minut až 4 hodin při teplotách 25 °C, 40 °C a 50 °C. Po ukončení sorpce bylo vlákno zataženo do jehly, vytaženo ze vzorkovnice a okamžitě desorbováno v nástřikovém prostoru plynového chromatografu. Předmětem optimalizace celého analytického postupu byly experimentální podmínky sorpce (expozice) vlákna ve vzorkovnici (teplota, doba, navážka vzorku) a desorpce vlákna v injektoru plynového chromatografu (teplota, doba).

Chromatografická analýza

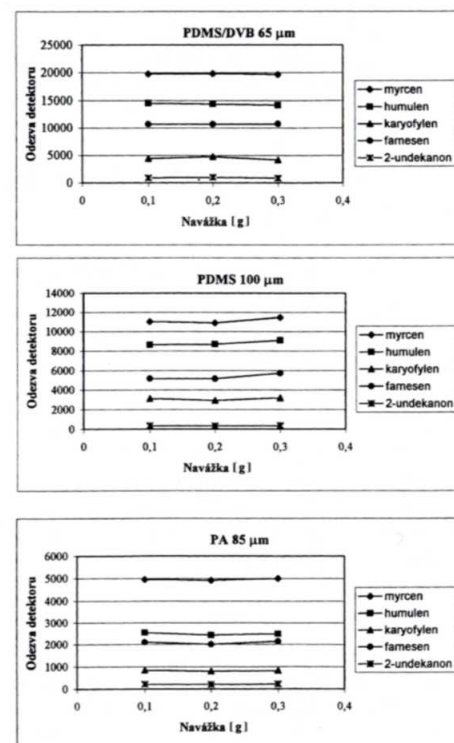
Všechny analýzy byly provedeny na plynovém chromatografu Varian 3400 ve spojení s hmotnostním detektorem Finnigan ITD 800. Chromatograf byl osazen 1075 split/splitless injektorem. Dělení jednotlivých složek silice bylo provedeno na kapilární chromatografické koloně DB 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) s teplotním programem 40 °C (3 min izotermicky), 60 °C – 10 °C/min, 150 °C – 2 °C/min, 225 °C – 5 °C/min, 250 °C – 25 °C/min, 250 °C (5 minut izotermicky). Nástřikový prostor byl vyhříván na 250 °C. Průtok nosného plynu (hélium) byl 1,0 ml/min. Kapalné vzorky byly nastříkované ve split poměru 1:50, SPME analýzy ve splitless režimu po dobu 90 sekund. Teplota detektoru byla 220 °C. Hmotnostní detektor na principu iontové pasti pracoval v ionizačním režimu „elektron impact“ (70 eV) při skenovací frekvenci 1 scan/s.

Kvalitativní analýza složení silice byla provedena porovnáním retenčních časů analytických standardů a odpovídajících složek silice a porovnáním hmotnostních spekter s knihovními spektry. Semikvantitativní analýza byla provedena stanovením ploch chromatografických píků jednotlivých složek silice (v elektronických jednotkách plochy) a vyjádřena v relativních procentech vztažených na celkovou integrovanou plochu všech složek.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

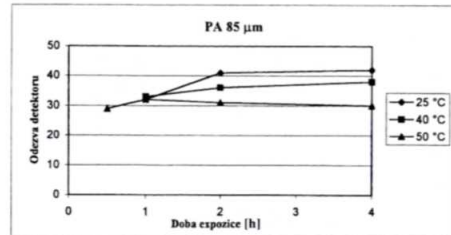
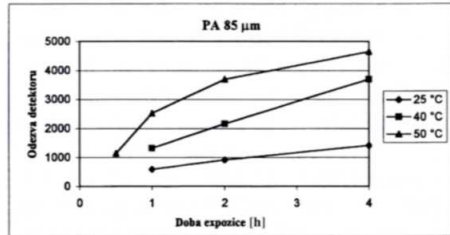
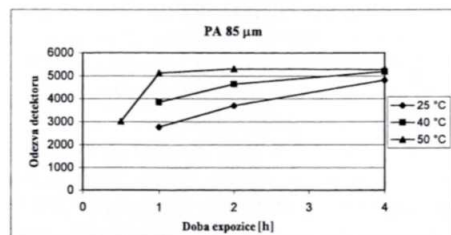
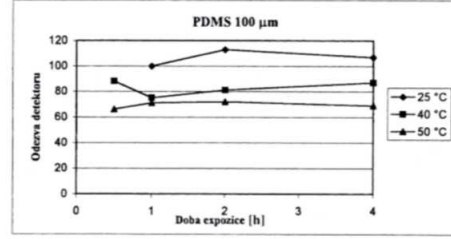
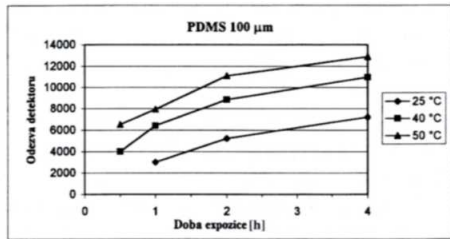
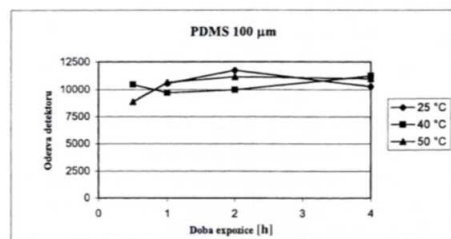
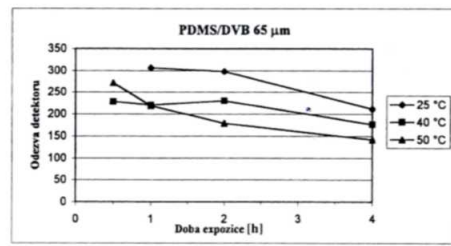
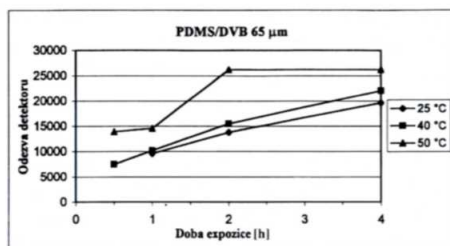
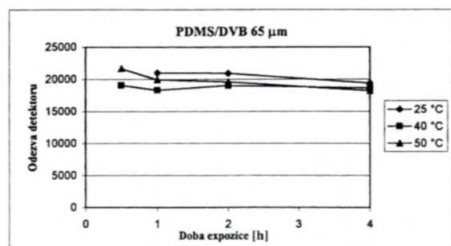
V první fázi experimentů byly prošetřeny podmínky kvantitativní desorpce složek silice z jednotlivých vláken v nástřikovém prostoru. Všechny analyty se při teplotě 250 °C desorbovaly během 1,5 minuty ze všech testovaných vláken. Přesto byla vlákna ponechána v injektoru po dobu 3 minut, aby bylo s rezervou dosaženo úplné desorpce i nejméně těkavých látek.

Vliv navážky chmele pro SPME analýzu na odezvu detektoru byl zkoumán



Obr. 2 Vliv navážky vzorku na sorpci vybraných složek silice na SPME vlákna při 50 °C a expozici 60 minut

při množstvích 0,1, 0,2 a 0,3 gramů mletého chmele a podmínkách sorpce 50 °C po dobu 60 minut. Výsledky měření pro pět složek silice (myrcen, β-karyofylen, α-humulen, β-farnesen, 2-undekanon) a vlákna PDMS 100 μm, PA 85 μm a PDMS/DVB 65 μm jsou znázorněny na obr. 2. Z rovnice (1) vyplývá, že množství analytu zachycené na vláknech je nepřímo úměrné objemu plynné fáze, což v praxi znamená vyšší sorpci analytu s rostoucí navážkou. Tento trend se v malé míře projevil pouze u vlákna PDMS 100 μm, u kterého je patrná mírně zvýšená sorpce při navážce 0,3 g u myrcenu, α-humulenu a β-farnesenu. U dalších vláken se ukázalo, že v daném rozsahu navážek zachycené množství analytů na navážce prakticky nezávisí. V práci [14] se uvádí, že pro většinu analytů je rozdělovací koeficient K_2 velmi malý. To zřejmě platí i pro složky chmelové silice, a proto se celý člen $K_2 V_3$ v rovnici (1) významně neuplatňuje. Ze závislosti na obr. 2 je dále patrné, že zachycená množství jednotlivých složek silice se pro různá vlákna značně liší. Pořadí účinnosti sorpce jednotlivých vláken vyjádřené plochou chromatografických píků pro sledované složky je PDMS/DVB 65 μm > PDMS 100 μm > PA 85 μm, a to v přibližném poměru ploch 4 : 2 : 1 pro myrcen a 2-undekanon, pro výšeovroucí látky, jako jsou například seskviterpenické uhlovodíky β-karyofylen, α-humulen a β-farnesen je tento poměr přibližně 5 : 3 : 1. Na základě zjištěných výsledků byla pro další experimenty zvolena standardní navážka 0,2 g mletého chmele.



Obr. 3 Průběh sorpce myrcenu na různá SPME vlákna

Obr. 4 Průběh sorpce humulenu na různá SPME vlákna

Obr. 5 Průběh sorpce methylheptanoátu na různá SPME vlákna

Pro orientační analýzu složení chmelových silic není mletí hlávky nutné. V takovém případě postačí navážít do vzorkovnice několik listů chmelové hlávky. HS-SPME analýzu lze dokonce provést s čerstvou nesusušenou hlávkou chmele. Pomocí této metody lze během 1 až 2 hodin zjistit identitu odrůdy ještě před sklizní, protože k provedení head-space SPME analýzy postačuje **jediná hlávka chmele**. Metodou lze rovněž bez problémů analyzovat granulované chmele i chmelové extrakty.

Dynamika sorpce jednotlivých složek chmelové silice na SPME vlákna byla sledována v závislosti na čase (30 minut, 1, 2 a 4 hodiny) a teplotě (25 °C, 40 °C a 50 °C). Delší expoziční časy při teplotách nad 50 °C nebyly systematicky testovány z důvodu možné oxidace některých složek silice [23]. V tab. 2 jsou uvedeny výsledky naměřené pro vlákno PDMS/DVB 65 μm při teplotě 50 °C a expozičních časech 30 minut, 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny. V tabulce jsou uvedeny jak absolutní plochy chromatografických píků vybraných složek chmelové silice, tak obsahy složek, vyjádřené v relativních procentech integrované plochy. Z údajů je patrné, že nejvíce ovlivňují složení silice obsahy myrcenu, β-karyofylenu, α-humulenu a β-farnesenu. Zatímco množství myrcenu, zachyceného na SPME vláknech, se s časem podstatně nemění, množství absorbovaných vyšších terpenů má s časem silně progresivní charakter, což dokumentuje rostoucí chromatografická plocha. Z tohoto důvodu se relativní množství myrcenu a dalších nižších terpenů

chmelové silice snižuje a zastoupení méně těkavých látek stoupá. U dalších složek, jako jsou například geraniol, 2-undekanon, se relativní zastoupení s časem výrazně nemění, přestože množství zachycené na vláknech mírně stoupají. Stejný charakter sorpce byl zjištěn u všech testovaných SPME vláken.

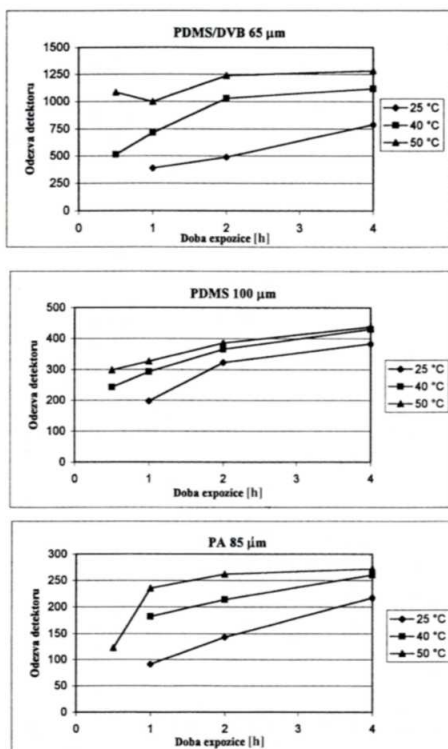
Na obr. 3 až 6 jsou znázorněny průběhy sorpce několika typických složek chmelové silice (myrcen, α-humulén, methylheptanoát, 2-undekanon) na třech různých SPME vláknech při teplotách

25 °C, 40 °C a 50 °C a expozičních dobách 30 minut až 4 hodiny. Rovnovážná koncentrace myrcenu, jako relativně těkavější složky chmelových silic (b.v. 167 °C), se na nepolárním PDMS vláknech a slabě polárním PDMS/DVB vláknech ustavuje během 1–2 hodin i při teplotě 25 °C. Se zvyšující se teplotou a delším expozičním časem jeho koncentrace vlivem silné kompetitivní sorpce mírně klesá, ale zásadně se nemění. Na polárním polyakrylátovém vláknech je dosaženo rovnovážné kon-

Tab. 2 Dynamika sorpce chmelové silice na PDMS/DVB 65 μm vlákno při 50 °C

Složka	Doba sorpce							
	30 minut		1 hodina		2 hodiny		4 hodiny	
	plocha* píku	obsah složky [% rel.]	plocha* píku	obsah složky [% rel.]	plocha* píku	obsah složky [% rel.]	plocha* píku	obsah složky [% rel.]
α-pinen	64,4	0,09	55,7	0,09	52,6	0,06	53,1	0,05
β-pinen	416	0,57	343	0,53	339	0,37	335	0,34
myrcen	21630	37,0	19920	30,2	19575	21,2	18194	18,6
methylheptanoát	271	0,37	218	0,33	178	0,19	142	0,15
limonen	603	0,82	433	0,66	454	0,49	422	0,43
2-nonanon	341	0,46	266	0,42	242	0,26	234	0,24
linalool	487	0,66	372	0,57	363	0,39	366	0,37
methyl-oktanoát	184	0,25	146	0,22	132	0,14	121	0,12
2-dekanon	255	0,35	217	0,30	221	0,24	219	0,22
methyl-nonanoát	154	0,21	146	0,22	145,5	0,16	146	0,15
geraniol	96,4	0,13	78,0	0,12	141	0,15	155	0,16
2-undekanon	1082	1,47	997	1,27	1237	1,34	1282	1,31
methyl-4-decenoát	1104	1,50	1116	1,54	1407	1,52	1569	1,60
2-dodekanon	104	0,14	123	0,19	196	0,21	252	0,26
β-karyofylen	4385	6,52	4731	6,85	8217	8,90	8320	8,49
α-humulén	13859	21,6	14543	22,4	26187	28,4	26208	26,8
β-farnesen	6803	9,3	10726	15,2	14289	15,5	16271	16,6
γ-murolen	519	0,70	591	0,9	1389	1,51	1543	1,57
β-selinén	351	0,48	394	0,62	628	0,68	725	0,74
δ-cadinén	1156	1,57	965	1,48	2171	2,35	2578	2,63
karyofylenoxid	155	0,21	184	0,28	302	0,33	503	0,51

*elektronické jednotky plochy · 10³



Obr. 6 Průběh sorpce 2-undekanonu na různých SPME vlákna

centrace myrcenu až při teplotě 50 °C a 2 hodinách expozice. Dynamika sorpce α -humulenu se od myrcenu značně liší. α -Humulen patří mezi vyševroucí seskviterpenické uhlovodíky (b.v. 267 °C), který je hojně zastoupen v silicích většiny odrůd chmele. Z obr. 4 je vidět, že na polyakrylátovém a PDMS vlákne není rovnovážné koncentrace α -humulenu dosaženo ani po 4 hodinách expozice při 50 °C. Pouze na PDMS/DVB vlákne je rovnováha dosažena po 2 hodinách při 50 °C. Podobné výsledky jako pro humulen byly naměřeny i pro karyofylen. Toto zjištění je v souladu s výsledky uvedenými v práci Field a Nickerson [22]. Terpeny s vyšším bodem varu než humulen (β -farnesen, γ -muurolen, α -selinen, β -selinen, γ -cadinen, δ -cadinen) nedosáhnou rovnovážné koncentrace na žádném z testovaných vláken ani po 4 hodinách expozice při 50 °C. Potvrdilo to i několik orientačních stanovení při 60 °C, kdy odezvy detektoru vyševroucích terpenů byly větší než při teplotě 50 °C.

Zcela odlišný charakter sorpce mají níževroucí estery mastných kyselin. Na obr. 5 jsou znázorněna data naměřená pro methylheptanoát. U těchto látek množství zachycené na vláknech klesá se zvyšující se teplotou sorpce bez ohledu na typ vlákna. Na polyakrylátovém a PDMS vlákne se rovnováha ustavuje zhruba po 2 hodinách sorpce, s dalším prodlužováním expozice vlákna se zachycené množství látek již výrazně nemění. Na vlákne PDMS/DVB se s časem zachycené množství mírně snižuje. Podobné chování bylo zjištěno i u met-

hyloktanoátu a methyl-6-methylheptanoátu. V případě 2-undekanonu, jako nejdůležitějšího zástupce homologické řady alifatických 2-ke-tonů ve chmelové silici, je množství látky zachycené na SPME vláknech závislé jak na sorpční teplotě, tak na době expozice, jak je patrné z obr. 6. Rovnovážné koncentrace je dosaženo pouze na polárním PA vlákne při teplotě 50 °C a 2 hodinách expozice a slabě polárním PDMS/DVB vlákne za stejných podmínek.

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že ve složitém systému několika desítek složek chmelové silice různého chemického složení, těkavosti a polarit, dosáhne rovnovážné koncentrace na SPME vláknech pouze několik. I přes toto zjištění lze metodou dosáhnout velmi reprodukovatelných výsledků za předpokladu striktního dodržování všech experimentálních podmínek. Opakovatelnost složení chmelové silice byla stanovena provedením 5 opakovaných analyz homogenního vzorku chmele jak standardní destilační metodou, tak metodou HS-SPME s jednotlivými vlákny při teplotě 50 °C a době expozice 2 hodiny. Výsledky, které jsou uvedeny v tab. 3, byly vyjádřeny jako relativní směrodatná odchylka (RSD) střední hodnoty obsahů osmi vybraných složek silice.

Dosažené výsledky ukazují, že hod-

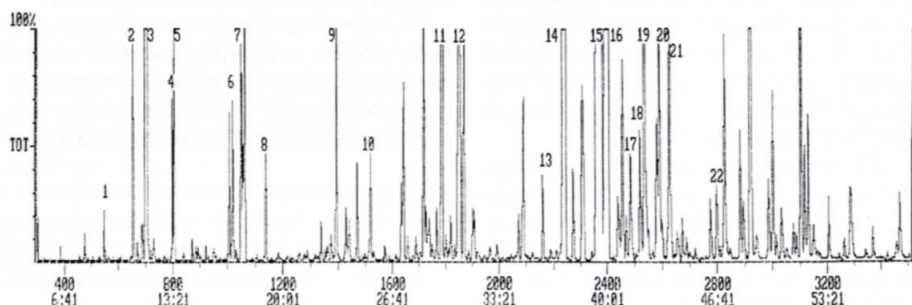
Tab. 3 Opakovatelnost složení chmelové silice ($n = 5$)

Složka	Dest. metoda RSD [% rel]	PDMS/DVB 65 µm RSD [% rel]	PA 85 µm RSD [% rel]	PDMS 100 µm RSD [% rel]
β -pinen	9,8	5,9	8,0	1,7
myrcen	4,0	4,1	3,5	4,5
limonen	10,0	7,8	7,2	4,0
linalool	12,9	7,1	4,9	3,8
2-undekanon	8,0	5,1	1,9	2,0
methyl-4-decenoát	9,0	4,2	3,6	1,2
β -karyofylen	3,8	2,9	3,5	1,9
α -humulen	9,4	6,0	5,1	4,0

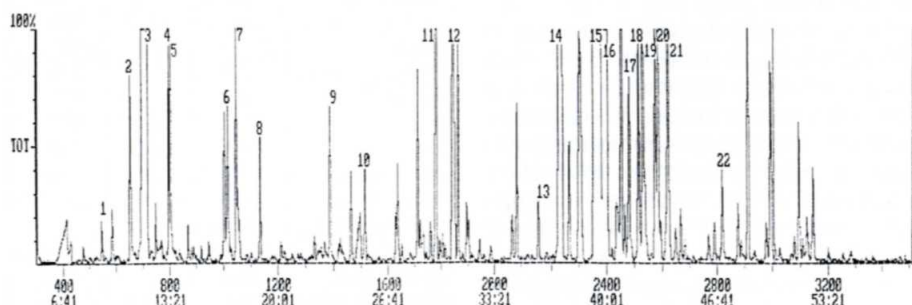
noty RSD jsou pro všechna SPME vlákna až na výjimky podstatně nižší než u standardní destilační metody. Porovnání mezi jednotlivými vlákny vyznívá nejlépe pro vlákno PDMS 100 µm. Nejvyšší hodnoty RSD byly pro většinu hodnotených složek zjištěny pro vlákno PDMS/DVB 65 µm, což pravděpodobně souvisí s největší intenzitou sorpce v porovnání s ostatními vlákny.

Na obr. 7 a 8 jsou znázorněny chromatogramy chmelové silice Žateckého poloraného červeňáku izolované destilační metodou (obr. 7) a SPME vlákne – PDMS/DVB 65 µm (obr. 8) při 50 °C o době expozice 2 hodiny. Na první pohled je zřejmé, že chromatogramy jsou si velmi podobné. Při detailním zkoumání lze však nalézt některé odlišnosti:

• Na začátku chromatogramu SPME analýz je v elučním čase 6,40 minut vidět širší chromatografický pás, který u destilační metody chybí. Jedná se o tě-



Obr. 7 Chromatogram chmelové silice Žateckého poloraného červeňáku – destilační metoda



Obr. 8 Chromatogram chmelové silice Žateckého poloraného červeňáku / HS-SPME, PDMS/DVB 65 µm

Legenda k obr. 7 a 8

1 – α -pinen, 2 – β -pinen, 3 – myrcen, 4 – methylheptanoát, 5 – limonen, 6 – 2-nonanon, 7 – linalool, 8 – methylheptanoát, 9 – 2-dekanon, 10 – methylnonanoát, 11 – 2-undekanon, 12 – methyl-4-decenoát, 13 – 2-dodekanon, 14 – β -karyofylen, 15 – α -humulen, 16 – β -farnesen, 17 – β -selinen, 18 – α -selinen, 19 – 2-tridekanon, 20 – γ -cadinen, 21 – δ -cadinen, 22 – karyofylenoxid

kavé složky silic nedostatečně fokusované na začátku analytické kolony. Tento jev by s největší pravděpodobností vymizel při použití speciálního SPME lineru v injektoru plynového chromatografu o průměru 0,75 mm namísto použitého lineru o průměru 2,0 mm.

- Spektrum chromatografických píků eluovaných v časech delších než 45 minut je mnohem bohatší u destilační metody než u SPME analýzy. V této části chromatografické analýzy se eluují převážně oxidační produkty β -karyofyleny, α -humulenu a dalších seskviterpenů. Tyto produkty vznikají jednak v průběhu přirozeného stárnutí chmele, ale mohou rovněž vznikat i při izolaci silice destilací s vodní párou [26]. Předpokládáme-li, že při šetrné izolaci silic SPME metodou

k této sekundární oxidaci nedochází, mělo by být spektrum těchto látek v této části chromatogramu chudší. Druhou příčinou tohoto jevu mohou být nízké distribuční konstanty K oxidačních produktů seskviterpenů – rovnice (2) – na jednotlivá SPME vlákna, což se zdá na základě dosavadních zkušeností pravděpodobnější.

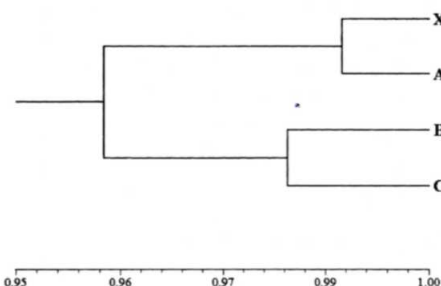
- Spektrum složek chmelové silice zachycených na všech testovaných vláknech je, kromě výše diskutovaných rozdílů, prakticky shodné se spektrem destilačního postupu. Menší difference existují pouze v zastoupení jednotlivých složek, ale nejsou nijak velké. Toto zjištění je, vzhledem k velkým rozdílům ve fyzikálních a chemických vlastnostech jednotlivých složek silice, velmi pozitivní.

Metodu HS-SPME tak lze pro izolaci chmelových silic použít jako rovnocennou alternativu destilačního postupu.

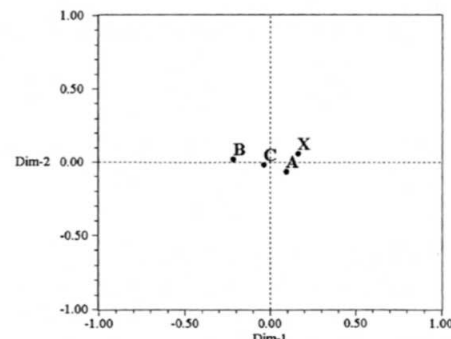
Tab. 4 Porovnání složení chmelové silice Žateckého poloraného červeňáku stanovené destilační metodou a metodou HS-SPME na různých vláknech (50 °C, 2 hod)

Složka	Destilace X	PDMS/DVB 65 μ m A	PA 85 μ m B	PDMS 100 μ m C
isobutylisobutyřát	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
α -pinen	0,05	0,06	0,08	0,13
β -pinen	0,36	0,37	0,54	0,68
myrcen	16,8	21,2	27,4	26,0
3-methylbutylisobutyřát	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
2-methylbutylisobutyřát	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
methylheptanoát	0,18	0,19	0,21	0,17
limonen	0,32	0,49	0,53	0,41
ocimen	0,03	0,10	0,07	0,03
NI	0,20	0,19	0,27	0,20
2-nonanon	0,25	0,26	0,46	0,19
linalool	0,39	0,39	0,89	0,24
2-nonanol	0,18	0,10	0,17	0,08
methyloktanoát	0,15	0,14	0,15	0,11
2-dekanon	0,37	0,24	0,28	0,19
NI	0,15	0,14	0,19	0,12
methylnonanoát	0,19	0,16	0,09	0,12
geraniol	0,14	0,15	0,28	0,04
6-undekanon	0,28	0,18	0,20	0,14
NI	0,55	0,34	0,46	0,24
NI	0,08	0,08	0,09	0,07
2-undekanon	1,97	1,34	1,38	0,90
methyl-4-decenoát	1,86	1,52	1,81	1,27
methyl-4,8 decadienoát	0,66	0,69	0,79	0,40
methylgeranát	0,09	0,13	0,17	0,06
methyldekanoát	0,08	0,09	0,08	0,05
α -cubenene	0,03	0,09	0,04	0,07
NI	0,08	0,12	0,09	0,13
α -copaene	0,29	0,45	0,29	0,46
2-dodekanon	0,29	0,21	0,23	0,16
β -karyofylen	7,77	8,79	6,33	8,07
NI	0,33	0,49	0,28	0,37
trans- α -bergamoten	1,17	1,11	0,95	1,74
α -humulen	25,18	28,4	18,77	25,88
β -farnesen	17,48	15,48	13,75	16,72
NI	0,13	0,13	0,16	0,14
γ -muurolen	0,86	1,19	0,69	1,08
β -selinen	0,52	0,68	0,48	0,57
α -selinen	0,53	0,72	0,48	0,62
2-tridekanon	1,69	1,34	1,30	1,04
β -bisabolen	0,64	0,66	0,69	0,56
γ -cadinene	1,07	1,54	1,01	1,06
NI	0,16	0,21	0,15	0,12
δ -cadinene	1,54	2,35	1,32	1,62
karyofylenoxid	0,95	0,33	0,71	0,56
humulenepoxid	3,20	1,25	2,60	2,01

NI = složka neidentifikována



Obr. 9a Hodnocení SPME vláken metodou shlukové analýzy



Obr. 9b Hodnocení SPME vláken metodou základních komponent

nání s 30 μ m vláknem. Vzhledem k nízkým sorpčním koncentracím látek není PDMS 30 μ m vlákno pro analýzu chmelových silic příliš vhodné. Lze jej použít v krajních případech, kdy vhodnější vlákno není k dispozici.

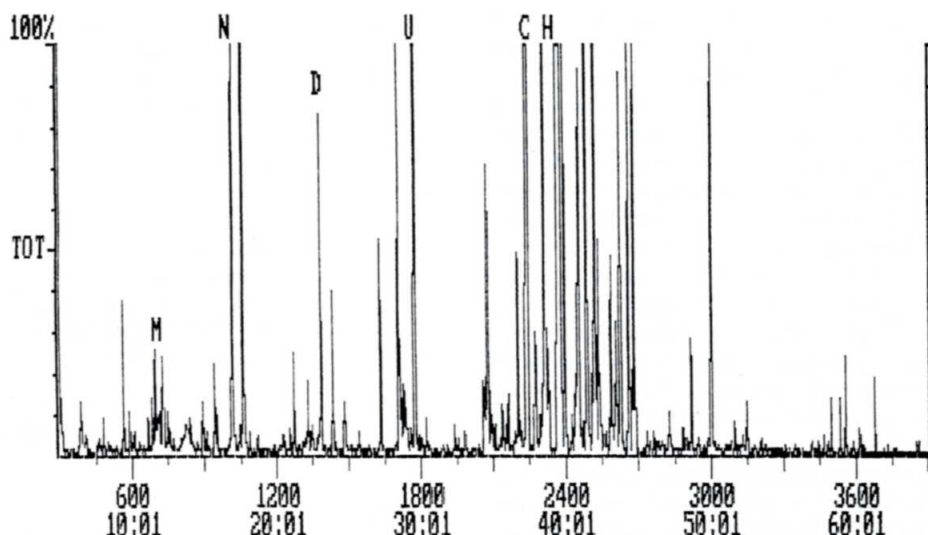
Metoda HS-SPME se ukázala jako mimořádně vhodná pro analýzu silic samčích chmelů. Znalost složení jejich silic je cenná především pro účely křížení a šlechtění chmele. Květ samčích rostlin obsahuje podstatně méně lupulinových žláz [27, 28], a proto většina metod používaných k izolaci silic z hlávek samčích rostlin není v tomto případě použitelná. Na obr. 10 je zobrazen chromatogram silice květu samčí rostliny planého chmele. K analýze bylo použito vlákno PDMS/DVB 65 μ m. Navážka vzorku 0,3 g sušených květů byla bez dalších úprav extrahována při 50 °C po dobu 2 hodin. Na složení silice je zajímavý nízký obsah myrcenu a významná zastoupení C_9 - C_{11} alifatických methylketonů, β -karyofyleny a α -humulenu.

4 ZÁVĚR

1. Metoda „headspace“ SPME je velmi dobrým alternativním postupem izolace chmelových silic z chmele. Je použitelná nejen pro hlávkový chmel, ale i pro chmel granulovaný i chmelové extrakty. Jedná se o relativně levnou, velmi šetrnou a rychlou metodu, která nepoužívá žádné organické rozpouštědlo. Z hlediska reprodukovatelnosti stanovení je vhodné chmel před analýzou homogenizovat mletím, ale pro orientační stanovení není mletí nutné. K provedení

V tab. 4 je uvedeno složení chmelové silice Žateckého poloraného červeňáku stanovené standardní destilační metodou a HS-SPME metodou na třech testovaných vláknech. Objektivní porovnání podobnosti resp. rozdílů jednotlivých analýz bylo provedeno metodami vícerozměrné statistické analýzy – shlukovou analýzou dat a metodou hlavních komponent pomocí statistického programu NTSYSpc (Exeter Software). Výsledek hodnocení je zobrazen na obr. 9. Jak shlukovou analýzou, tak metodou základních komponent byla jako statisticky nejshodnější s destilační metodou vyhodnocena HS-SPME analýza s vláknem PDMS/DVB 65 μ m. Principiálně však lze k analýze chmelových silic použít všechna testovaná vlákna, protože statistické vzdálenosti chromatografických analýz na jednotlivých vláknech nejsou nijak velké.

Porovnání sorpce složek chmelové silice na SPME vlákna PDMS 100 μ m a 30 μ m bylo provedeno při expozici 1 hodina při teplotách 25 °C a 50 °C. Výsledky ukázaly, že odezva detektoru byla při 25 °C pro níževroucí látky (myrcen, limonen, linalool) přibližně 5 až 6krát větší pro 100 μ m vlákno v porovnání s vláknem 30 μ m. Pro výševroucí složky (α -humulen, β -farnesen, cadineny) bylo zvýšení odezvy detektoru pouze 1,5 až 2násobné. Při 50 °C byl tento poměr pro těžkavější složky stejný jako při 25 °C, (tj. 5–6násobek), pro výševroucí látky byla odezva detektoru na 100 μ m 3 až 4krát vyšší v porov-



Obr. 10 Chromatogram chmelové silice květenství samčího chmele – HS-SPME, PDMS/DVB 65 μm 50 $^{\circ}\text{C}$, 2 hodiny; M = myrcen, N = 2-nonanon, D = 2-dekanon, U = 2-undekanon, C = karyofylen, H = humulen)

HS-SPME analýzy chmelových silic postačuje jediná hlávka chmele. Analýzu lze provést dokonce s čerstvou, nesušenou hlávkou chmele.

2. Výhody metody lze nejvíce využít v případech, kdy není k dispozici dostatečné množství vzorku pro provedení standardní izolace destilační metodou. Týká se například novošlechtěnců, planých a samčích chmelů.

3. Z testovaných vláken (PDMS/DVB 65 μm , PA 85 μm , PDMS 100 μm , PDMS 30 μm) bylo pro analýzu chmelových silic vyhodnoceno jako nejvhodnější vlákno PDMS/DVB 65 μm . Spolehlivé výsledky poskytují i vlákna PA 85 μm , PDMS 100 μm . Vlákno PDMS 30 μm lze použít v případě, kdy není k dispozici jiné, vhodnější.

4. S ohledem na dynamiku sorpce jednotlivých složek silice na SPME vlákna je vhodné provádět expozici vláken při teplotě 50 $^{\circ}\text{C}$ po dobu minimálně 2 hodin. Reprodukovatelné výsledky jsou dosažitelné pouze za předpokladu

prísneho dodržování všech experimentálních podmínek.

5. Pro analýzu chmelových silic květů samčích chmelů je nejvhodnější vlákno PDMS/DVB 65 μm exponované při teplotě 50 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 hodin.

Literatura

- [1] KRALJ, D., ZUPANEC, J.: J. Inst. Brew. **97**, 1991, s. 197
- [2] KENNY, S., T.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **48**, 1990, s. 3
- [3] NARZISS, L., MIEDANER, H., GRESER, A.: Brauwelt **36**, 1985, s. 1794
- [4] WRIGHT, R., G., CONNERY, F.: Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1951, s. 87
- [5] KRÜGER, E., BARON, G.: Mschr. Brauerei **28**, 1975, s. 118
- [6] SEELEITNER, P., SEIF, P., PÜSPÖK, J.: Mschr. Brauwiss. **38**, 1985, s. 367
- [7] GODEFROOT, M., SANDRA, P., VERZELE, M.: J. Chromatogr. **203**, 1981, s. 325
- [8] LAM, K. C., NICKERSON, G., DEINZER, M.: J. Agric. Food Chem. **34**, 1986, s. 63
- [9] DAVID, F., SANDRA, P., PIPKIN, W.:

Hewlett-Packard Application Note 228-115, 1990

- [10] DE METS, M., VERZELE, M.: J. Inst. Brew. **74**, 1968, s. 74
- [11] MAIER, J.: Jahresbericht der Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau. 1984, s. 79
- [12] FREUNDORFER, J., MAIER, J., REINER, L.: Mschr. Brauwiss. **44**, 1991, s. 176
- [13] POTTER, D. W., PAWLISZYN, J.: J. Chromatogr. **65**, 1992, s. 247
- [14] ZHANG, Z., PAWLISZYN, J.: Anal. Chem. **65**, 1993, s. 1843
- [15] SONG, J., ET. AL.: J. Agric. Food Chem. **45**, 1997, s. 1801
- [16] IBÁÑEZ, E., ET. AL.: Food Chemistry **63**, 1998, s. 281
- [17] CHIN, H. W., BERNHARD, R. A., ROSENBERG, M.: J. Food Sci. **61**, 1996, s. 1118
- [18] JÄRVENPÄÄ, E. P., ZHANG, Z., HUOPALAHTI, R., KING, J. W.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, **207**, 1998, s. 39
- [19] JELEN, H., ET. AL.: J. Agric. Food Chem. **46**, 1998, s. 1469
- [20] CONSTANT, M., COLLIER, J.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **55**, 1997, s. 112
- [21] HAYASAKA, Y., BARTOWSKI, E. J.: J. Agric. Food Chem. **47**, 1999, s. 612
- [22] PENTON, Z.: SPME – Varian Application Note Nr. 15, 1997, s. 1
- [23] FIELD, A. J., NICKERSON, G., JAMES, D. D., HEIDER, CH.: J. Agric. Food Chem. **44**, 1996, s. 1768
- [24] KROFTA, K.: Výroční zpráva projektu ME 243, Žatec, leden 1999
- [25] KROFTA, K.: Výroční zpráva projektu ME 243, Žatec, leden 2000
- [26] PICKETT, J. A., COATES, J., SHARPE, F. R.: Chemistry and Industry, 1975, s. 571
- [27] NEVE, R. A.: Hops, Chapman Hall, London, 1991, s. 1
- [28] BROOKS, S. N., LIKENS, S. T.: Crop Sci. **2**, 1962, s. 189

Tato studie byla vypracována v rámci řešení grantu č. EP9351, financovaného Ministerstvem zemědělství ČR.

Lektorovala dr. ing. Kateřina Holadová
Do redakce došlo 26. 4. 2000

Krofta, K. – Čepička, J.: Stanovení chmelových silic metodou mikroextrakce na tuhou fázi (SPME). Kvasny Prum. **46**, 2000, č. 9, s. 235–241.

Metoda mikroextrakce na tuhou fázi v provedení „headspace“ (HS-SPME) byla použita k izolaci chmelových silic z hlávek samčích rostlin a z květenství samčích rostlin. Bylo testováno několik SPME vláken s různou polaritou aktivní vrstvy (PDMS 100 μm a 30 μm , PDMS/DVB 65 μm , PA 85 μm) za různých experimentálních podmínek (teplota, čas expozice, navážka vzorku). Sorpce analytů byla silně ovlivněna teplotou a expoziční dobou, navážka vzorku v rozsahu 0,1 až 0,3 g sorpci jednotlivých složek silice zásadně neovlivnila. Z testovaných SPME vláken se jako nejvhodnější ukázalo vlákno PDMS/DVB 65 μm , a to jak pro analýzu hlávek, tak květů samčích rostlin. Intenzita sorpce na vlákne PDMS/DVB 65 μm byla, v porovnání s ostatními, 2x až 6x větší. Optimální výsledky na

všech vláknech byly získány při navážce vzorku 0,2 g, teplotě expozice 50 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 hodin. Složení chmelových silic izolovaných metodou HS-SPME a standardní destilační metodou ukázalo velmi dobrou shodu. Protože k izolaci silice SPME metodou postačuje jediná hlávka chmele, je tento postup výhodný zejména v případech, kdy není k dispozici dostatečné množství vzorku k provedení izolace alternativní metodou.

Krofta, K. – Čepička, J.: Determination of Hop Oils Using the Solid-Phase Microextraction Method (SPME). Kvasny Prum. **46**, 2000, No. 9, p. 235–241.

The method of solid-phase microextraction in the „headspace“ execution (HS-SPME) was used for the insulation of hop oils from the hop cones of female plants and from the inflorescences of male plants. Several SPME fibres with different polarity of the active layer

(PDMS 100 μm and 30 μm , PDMS/DVB 65 μm , PA 85 μm) were tested under various experimental conditions (temperature, exposure time, sample weighed-out). The sorption of the analytes has been vigorously influenced by the temperature and the exposure time, while the sample weighed-out in the range of 0,1 to 0,3 g has not basically influenced the sorption of the individual oil components. From the tested SPME fibres the most suitable one proved to be the PDMS/DVB 65 μm fibre, for the analyses both of cones and of female plants flowers. The sorption intensity on the PDMS/DVB 65 μm fibre was twice to six times higher in comparison with the other ones. The optimum results on all fibres were achieved with the sample weight-out of 0,2 g, the exposure temperature of 50 $^{\circ}\text{C}$ in a two-hours period. The composition of hop oils insulated by the HS-SPME method and by the standard distillation one showed a very good conformity.

Due to the fact that only one cone is sufficient for the oil insulation by the SPME method, is this procedure advantageous mainly in cases when a sufficient quantity of sample for insulation by the alternative method is not at disposal.

Krofta, K. – Čepička, J. : Bestimmung der Hopfenöle mittels Mikroextraktion auf feste Phase (SPME). Kvasny Prum. 46, 2000, Nr. 9, S. 235–241.

Die Methode der Mikroextraktion auf feste Phase in der Durchführung „headspace“ (HS-SPME) wurde zur Isolation der Hopfenöle aus den Dolden der männlichen Pflanzen und aus den Blüten der weiblichen Pflanzen appliziert. Getestet wurden einige SPME Fasern mit verschiedener Polarität der aktiven Schicht (PDMS 100 µm und 30 µm, PDMS/DVB 65 µm, PA 85 µm) bei unterschiedlichen Experimentalbedingungen (Temperatur, Expositions-Zeit, Einwaage der Probe. Die Analytensorption wurde stark beeinflusst durch die Temperatur und die Expositionszeit, wogegen die Einwaage der Probe im Bereich von 0,1 bis 0,3 g keinen wesentlichen Einfluss auf die Sorption der einzelnen Ölbestandteile hatte. Aus den getesteten SPME Fasern zeigte sich als die am besten geeignete die Faser PDMS/DVB 65 µm und zwar nicht nur für die Analyse der Dolden, sondern

auch für die Analysen der Blüten männlicher Pflanzen. Die Intensität der Sorption auf der Faser PDMS/DVB 65 µm war, im Vergleich mit den übrigen Fasern, 2x bis 6x grösser. Die optimalen Ergebnisse auf allen Fasern wurden bei der Probeneinwaage 0,2 g und der Temperatur der Exposition 50 °C während 2 Stunden erzielt. Die Zusammensetzung der Hopfenöle, die mittels der Methode HS-SPME und mittels der Standard-Destillationsmethode isoliert wurden, zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Weil zur Isolation des Hopfenöls durch SPME – Methode eine einzige Hopfendolde ausreicht, ist dieses Verfahren vor allem in den Fällen vorteilhaft, wenn eine Probe in ausreichender Menge zur Isolation mittels alternativer Methoden nicht zur Verfügung steht.

Крофта, К. – Чепичка, Я.: Определение хмелевых эфирных масел методом микроэкстрагирования твердой фазы (SPME). Kvasny Prum. 46, 2000, № 9, стр. 235–241.

Метод микроэкстрагирования твердой фазы в исполнении „headspace“ (HS-SPME) был использован для изолирования хмелевых масел из хмелевых шишек женских растений и из соцветия мужских растений. Тесту подвергалось несколько SPME-волокон с разной по-

лярностью активного слоя (PDMS 100 мкм и 30 мкм, PDMS/DVB 65 мкм, PA 85 мкм при разных экспериментальных условиях (температура, продолжительность экспозиции, навеска образца). На сорпцию аналитов значительно повлияли температура и продолжительность экспозиции. Навеска образца в количестве 0,1–0,3 г на сорпцию отдельных компонентов масла решающим образом не повлияла. Из теста подвергаемых SPME-волокон показалось самым подходящим волокно PDMS/DVB 65 мкм не только для анализа шишек, но и для цветов мужских растений. Интенсивность сорпции на волокне PDMS/DVB 65 мкм была по сравнению с остальными в 2–6 разов больше. Оптимальные результаты на всех волокнах были получены при навеске образца 0,2 г и температуре экспозиции 50 °C в течение 2 часов. Хмелевые масла изолированные методом HS-SPME и обыкновенным перегонным методом оказались по своему составу совпадающими. Так как для изолирования масла методом SPME хватит единственная хмелевая шишка, можно метод использовать прежде всего в тех случаях, когда не имеется достаточное количество образца для изолирования альтернативным методом.