

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Porovnání analytických metod pro stanovení hořkých
kyselin v chmelových produktech**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petr Kolář

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Jan Táborský, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Porovnání analytických metod pro stanovení hořkých kyselin v chmelových produktech“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2019

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Janu Táborskému, Ph.D., konzultantce doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc. a Ing. Michalu Kovaříkovi za cenné rady, čas a připomínky, které mé práci věnovali.

Porovnání analytických metod pro stanovení hořkých kyselin v chmelových produktech

Souhrn

Mezi světovými pěstiteli chmele zaujímá Česká republika, jak svou plochou chmelnic, tak i produkcí chmele, 3. místo. V současnosti je u nás registrováno 16 českých odrůd chmele. Za nejkvalitnější odrůdu je považován Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ).

Chmel je po sklizni sušen a zpracováván dle požadavků pivovarů. Podle zákona o ochraně chmele je ověřována jeho kvalita i původ. Nejdůležitější složku v chmelové hlávce představují z hlediska pivovarského průmyslu chmelové pryskyřice a silice. Hořké kyseliny jsou klasifikovány jako α - a β -kyseliny. Stanovit obsah těchto kyselin ve chmelu je nejdůležitější podmínkou při sjednávání obchodů s chmelem. Proto je analytickým metodám, které slouží k určení obsahu α -kyselin, připisována značná publicita. Dříve byly používány metody gravimetrické a titrační, které byly v současnosti nahrazeny a doplněny o metody spektrofotometrické, chromatografické, resp. elektroforetické.

V praktické části této práce byly na základě opakovaných měření testovány a porovnávány dvě základní analytické metody pro stanovení alfa- a beta-hořkých kyselin v chmelových peletách – metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a metoda spektrofotometrická. Jako testovací materiál byly použity chmelové pelety vyrobené z definovaných chmelových odrůd a v jednom případě chmelové hlávky. Vzorky pelet z rozdílných roků sklizně byly analyzovány dle norem European Brewery Convention (EBC) a následně byla provedena statistická vyhodnocení podle současných zásad správné laboratorní praxe (GLP). Naměřené hodnoty byly porovnány s hodnotami deklarovanými v literatuře pro jednotlivé chmelové odrůdy.

Při analýze chmelů bylo zjištěno, že u starších chmelů porovnávané metody nevykazují shodné výsledky. Výsledky se shodují pouze u čerstvě sklizeného chmele. V obsahu hořkých kyselin existoval ve většině případů statisticky významný rozdíl.

Klíčová slova: chmelové produkty; hořké kyseliny; analytické metody; porovnání; HPLC; spektrofotometrie

Comparison of analytical methods for the determination of bitter acids in hop products

Summary

The Czech Republic occupies the third place among the world's hop growers with its hop gardens areas and hop production. The Czech Republic is the third largest hop grower in the world as regards area of hop gardens and hop production. There are 16 Czech hop varieties registered in our country at present. The best quality variety is Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ).

After harvesting, the hops are dried and processed according to the requirements of the breweries. Their quality and origin are verified according to the Act on the Protection of Hops. The most important ingredients in the hop cones for the brewing industry are hop resins and essential oils. Bitter acids are classified as α - and β -acids. Determination of the content of these acids in hops is the most important condition for negotiating the commercial value of hops. Therefore, substantial publicity is set down to the analytical methods used to determine α -acids. Previously, gravimetric and titrimetric methods were used. They have now been replaced and supplemented by spectrophotometric, chromatographic, and/or electrophoretic methods.

In the practical part of this study, two basic analytical methods for the determination of alpha and beta-bitter acids in hops pellets – high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometric method – were tested, based on repeated measurements. Hop pellets made from defined hop varieties and in one case hop cones were used as test material. Pellet samples from different harvest years were analyzed according to the standards of European Brewery Convention (EBC). After that, statistical evaluations were made according to current GLP principles. The measured values were compared with the values declared in the literature for individual hops varieties.

It was found that the different testing methods compared in the study do not show the same results when older hops were analysed. The results are identical only for freshly harvested hops. There was a statistically significant difference in the content of bitter acids in most cases.

Keywords: hop products; bitter acids; analytical methods; comparison; HPLC; spectrophotometry

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Charakteristika chmele	10
3.1.1 Vlastnosti kvalitní chmelové hlávky	10
3.2 Pěstební oblasti	11
3.3 Odrůdy chmele	11
3.4 Technologie pro pěstování chmele	13
3.5 Sušení, úprava a certifikace chmele	13
3.6 Chemické složení chmele	15
3.6.1 Chmelové pryskyřice	17
3.6.2 Chmelové silice	20
3.6.3 Chmelové polyfenoly	20
3.7 Etapy hodnocení ročníkových obsahů alfa kyselin	21
3.7.1 Předsklizňové prognózy pro ŽPČ	21
3.7.2 Sklizňové prognózy pro ŽPČ i hybridní odrůdy	21
3.7.3 Skutečné sklizňové obsahy alfa kyselin pro ŽPČ i hybridní odrůdy.....	22
3.8 Analytické metody pro stanovení hořkých kyselin	22
3.8.1 Titrační metody	23
3.8.2 Spektrofotometrické metody	23
3.8.3 Tenkovrstvá chromatografie TLC	24
3.8.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC	24
3.8.5 Ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC).....	26
3.8.6 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS).....	26
3.8.7 Dvourozměrná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií	27
3.8.8 Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC)	27
3.8.9 Nukleární magnetická resonance.....	27
4 Materiál a metody	29
4.1 Vzorky	29
4.2 Analytické metody	30
4.2.1 Metoda chromatografická – HPLC.....	30
4.2.2 Metoda spektrofotometrická UV/VIS	35
5 Výsledky	38
6 Diskuze	41
7 Závěr	44
8 Seznam literatury	45

1 Úvod

V r. 2017 dosáhl objem v pěstování chmele svého vrcholu. Světová rozloha chmelnic čítala v tomto roce 59 211 ha a celosvětová produkce se dle údajů firmy Hopsteiner vyšplhala na 113 902 t při průměrné sklizni 1,92 t/ha (MZe 2017). Z Tiskové zprávy vydané 9. srpna 2018 byla Evropskou komisí Mezinárodního sdružení pěstitelů chmele (I.H.G.C.) k 31. 7. 2018 odhadnuta světová výměra chmele sklizeného v r. 2018 na 60 557 ha s celosvětovou produkcí podobnou v r. 2017, a to ve výši 117 500 t. Cca 95 % celosvětové produkce chmele připadá pro účely pivovarského průmyslu, zbylých 5 % je určeno na výrobu léčiv a přírodních potravinových doplňků.

České chmele jsou v tuzemských pivovarech běžně používané. V České republice se ročně spotřebuje zhruba 20 % roční produkce chmele. Piva s chráněným zeměpisným označením „České pivo“ musí český chmel obsahovat. Pivovary používají pro hořký základ ležáků extrakty cizí provenience (případně pelety / hlávky do některých svrchně kvašených piv pro hořkost i aroma).

Jednou ze základních surovin procesu výroby piva jsou samičí hlávky chmele otáčivého (*Humulus lupulus* L.). Používají se v různě upravené podobě a obsahují vyjma technologicky hodnotných látek, jako jsou silice, α -hořké kyseliny, polyfenolové sloučeniny, i celou řadu dalších druhotných metabolitů s kladnými účinky na lidské zdraví. Níže citované studie přináší nárůst počtu důkazů ukazujících na pozoruhodné účinky různorodých sekundárních metabolitů chmele na zdraví lidí. Bylo prokázáno, že hořké kyseliny působí na zánětlivé procesy, kardiovaskulární choroby, karcinogenní bujení, cukrovku a na některé metabolické syndromy (Van Cleemput et al. 2009, Taniguchi et al. 2015).

Z pohledu pivovarské technologie jsou prvořadou součástí chmele α -hořké kyseliny. Dle Krofity et al. (2017b) alfa hořké kyseliny samy o sobě hořké nejsou, avšak termickou izomerací se z nich vytváří iso-alfa kyseliny, vykazující již intenzivně hořkou chuť a tvořící tak základ charakteristického smyslového znaku piva. Poslední studie uvádějí, že čisté β -kyseliny k hořkosti piva nikterak nepřispívají. Jednoznačně to potvrdily výzkumy, při nichž byly čisté β -kyseliny přidávány do mladiny formou ethanolového roztoku. Mladina ani pivo žádnou smyslovou hořkost nevykazovaly, naopak zřetelně hořkou chuť mají produkty oxidace beta kyselin, které jsou rozpustné ve vodě.

Obsah alfa hořkých kyselin je základním parametrem pro stanovení kvality chmele, protože zejména jejich obsah stanovuje prodejní cenu chmele. Proto je analytickým metodám stanovení obsahu α -kyselin ve chmelu připisována značná pozornost (Jurková et al. 2012). Míkyška et al. (2017) uvádějí, že od roku 1950 je prováděna Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským klasifikace obsahu hořkých kyselin právě sklizeného chmele a od roku 1994 je používána chromatografická metoda k zjištění alfa- a beta-hořkých kyselin a jejich analogů,

a to metoda HPLC podle EBC. Od r. 1997 je v ČR proces určování α - a β -hořkých kyselin kapalinovou chromatografií normalizován a zakotven společně s dalšími metodami používanými ke zkoušení chmele v normě ČSN 46 2520 v části 17, která všeobecně vychází z metod EBC a Mitteleuropäische Brautechnische Analysen Kommission (MEBAK). Kapalinovou chromatografií je možné určit vedle α -kyselin také β -kyseliny, které jsou odlišného charakteru. V tomto oboru úzce spolupracují Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. Praha (VÚPS) a Chmelařský institut, s.r.o. Žatec (Jurková et al. 2012).

Spektrofotometrická metoda je používána pro čerstvé chmele po sklizni. Se stářím chmele klesá přesnost stanovení hořkých kyselin, neboť se mění tvar absorpčních spekter chmelových pryskyřic. Tato metoda je používána v USA, kde byla vyvinuta, používání v Evropě není příliš běžné (Krofta 2008). Metoda spektrofotometrická je jednodušší a méně nákladná.

V roce 2000 začala samostatná klasifikace chmele ze standardní a bezvirózní sadby Žateckého poloraného červeňáku. O čtyři roky později bylo zahájeno hodnocení dalších českých odrůd Premiant a Sládek, jejichž objem výroby je pro tuzemské pivovary podstatný. S hodnocením hořké odrůdy Agnus se začalo v r. 2009, od r. 2014 se hodnotí odrůda Kazbek a v r. 2015 se začala hodnotit aromatická odrůda Saaz Late (Míkyška & Jurková 2018).

Česká republika, jako první země Evropské unie, zaregistrovala u chmele zeměpisnou ochrannou značku Evropské unie, a to chráněné označení původu Žatecký chmel. Touto značkou může být označován pouze jemný aromatický chmel vypěstovaný v Žatecké chmelařské oblasti, a to Žatecký poloraný červeňák (Pluháčková et al. 2011).

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Cílem této práce je porovnat dvě základní analytické metody pro stanovení alfa- a beta-hořkých kyselin v chmelových peletách: metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (metoda EBC 7.7) a metodu spektrofotometrickou (metoda Hops-6 podle ASBC). Metody budou testovány na vzorcích chmelových pelet definovaného původu (odrůda, rok sklizně), popřípadě též na chmelových hlávkách. Bude provedeno statistické vyhodnocení naměřených výsledků podle současných zásad správné laboratorní praxe.

Hypotéza: Testované analytické metody poskytují srovnatelné výsledky.

3 Literární rešerše

3.1 Charakteristika chmele

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) je trvalá rostlina (na stejném stanovišti vydrží 25 i více let), dvoudomá, z čeledi konopovitých, která se během svého růstu (cca od výšky 50 cm) otáčí kolem určitého svodu vždy doprava a může v dobrých klimatických podmínkách dorůst do výšky 6 až 7, nebo i více metrů. Kolem jednoho svodu se zpravidla zavádějí dvě rostliny (Otto 1897). Vzhledem k tomu, že po opylení ztrácí květy na své kvalitě, musí pěstitelé chmele dbát na to, aby se na chmelnici nevyskytovaly samčí rostliny. Neve (1991) dělí rod chmele do tří druhů, a to chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.), chmel japonský (*Humulus japonicus* Sieb. et Zuc.) a chmel junnanský (*Humulus yunnanensis* Hu). Naopak Rybáček et al. (1980) považují za správné dělit chmel na otáčivý, japonský a oplétavý (*Humulus scandens* Lour et Merrill).

Jedná se o rostlinu vlhkomilnou, které vyhovuje hluboká ornice, kde hladina spodní vody je 150 – 200 cm. Hlavní části rostliny tvoří kořenová soustava, réva s pazochy, listy a květenství, které trvá v závislosti na odrůdě cca 15 až 30 dní, a poté se postupně přeměňuje v plody, chmelové hlávky typického vejčitého tvaru (Basařová et al. 2010). V době, kdy obsahuje nejvíce účinných látek, dochází ke sklizni chmele. Zpravidla to bývá od poloviny měsíce srpna nebo od počátku září (Nesvadba et al. 2013).

3.1.1 Vlastnosti kvalitní chmelové hlávky

Kvalitní chmelová hlávka má vykazovat následující znaky a vlastnosti:

- musí být správně česána a dle stanovených zásad sušena;
- dobrý vzrůst (od 15 do 35 mm) a vyzrálost - hlávky musí být uzavřené a co do velikosti stejné;
- bez symptomu poškození škůdci, chorobami, bez mechanického poškození;
- hlávka má mít zlatozelenou barvu se zřetelným leskem;
- bohatý obsah hořčin barvy světle žluté;
- vůně hlávky musí být jemná;
- vysoký obsah α hořkých kyselin (Šnobl et al. 2002).

Chmel je jednou z nejvíce kultivovaných plodin, která je klíčovou složkou při procesu vaření piva (Bertelli et al. 2018). Chmelové šišťice (jedná se o hlávky samičích květů) se

v pivovarnickém průmyslu používají k výrobě piva, protože obsahují lupulin (hořčiny), který dodává pivu charakteristickou chuť a aroma. Taniguchi et al. (2015) uvádějí, že lupulinové žlázy z květu samičího chmele akumulují silice, prenylflavonoidy a hořké kyseliny (jedná se o deriváty floroglucinolu, které jsou klasifikovány jako α - a β -kyseliny).

3.2 Pěstební oblasti

V současné době (od roku 2015) jsou největším světovým producentem chmele Spojené státy Americké. Na ploše 23 325 ha je pěstováno až 60 chmelových odrůd, z nichž nejrozšířenější je aromatická odrůda Cascade. Nejrozsáhlejší plochy pro jeho pěstování se nachází ve státě Washington. Do roku 2014 si prvenství drželo Německo (nejrozsáhlejší pěstební oblast Hallertau). V současné době je chmel pěstován na 20 144 ha. Třetím největším producentem je Česká republika (jedná se o jemně aromatický chmel), čtvrté místo zaujímá Čína. Plochou chmelnic zaujímá ČR také třetí místo (v r. 2017 byl chmel pěstován na 4 945 ha, v r. 2018 byly plochy rozšířeny o dalších 75 ha, na 5 020 ha). Svoje odrůdy chmele mají i další státy, např. Anglie, Polsko, Slovinsko, Ukrajina, Austrálie, Nový Zéland a další (Barborka 2017; Kroupa 2017; MZ 2017; Altová 2018).

V České republice jsou katastrálně vymezeny tři oblasti určené pro pěstování chmele, a to Žatecko, Úštěcko (obě v Čechách) a Tršicko (na Moravě) (Forejtová 2007), a v současnosti je zde evidováno celkem 119 pěstitelů (ÚKZÚZ 2018). Chmel pěstovaný na našem území byl a stále je považován za velmi kvalitní. Zejména chmel z oblasti Žatecka je nejméně od 15. století ceněn jako světový standard kvality. Vzhledem k tomu, že je chmel náročný na teplo, světlo a vláhu, tak nejvhodnějšími oblastmi pro jeho pěstování jsou právě oblasti mírného pásu severní polokoule s průměrnými ročními teplotami kolem 8 – 10 °C (Basařová et al. 2010).

3.3 Odrůdy chmele

Basařová et al. (2010) rozdělují odrůdy chmele takto:

- dle odstínu chmelové révy – na červeňáky a zeleňáky;
- dle délky období zrání – na rané, polorané a pozdní;
- dle obsahu chmelových pryskyřic a chmelového aroma – na jemně aromatické chmele a vysokoobsažné hořké chmele.

Pro účely obchodu na světových trzích se odrůdy dále dělí dle skladby pryskyřic a silic do pěti skupin na:

- tradiční aromatické chmele (příkladem odrůda ŽPČ – ČR, Spalt – Německo),

- nové aromatické chmele (odrůdy Sládek – ČR, Cascade – USA),
- šlechtěné aromatické chmele (Premiant – ČR, Perle – Německo),
- kvalitní hořké chmele (Northern Brewery – Německo),
- hořké chmele (odrůdy Columbus – USA, Magnum – Německo).

Jednotlivé odrůdy chmele se dále dělí do čtyř kvalitativně odlišných skupin:

- jemně aromatické odrůdy (obsah α -kyselin 3,5 – 4,0 % hmotnosti v sušině \rightarrow z toho kohumulon 25 – 30 %),
- aromatické chmele (α -kyseliny 3,5 – 6,5 % \rightarrow kohumulon 20 – 40 %),
- hořké chmele (α -kyseliny okolo 8 % \rightarrow kohumulon 30 %),
- vysokoobsažné chmele (α -kyseliny až 15 %).

V Tabulce č. 1 je uvedena odrůdová skladba chmele pěstovaného v ČR, včetně osázených ploch, sklizně a výnosů v letech 2017 a 2018. Nejsou v ní jmenovitě uvedeny nově registrované české odrůdy v roce 2017, a to odrůda Gaia, Boomerang, Country a Jazz. Dle informace Ing. Kovaříka, tajemníka Svazu pěstitelů chmele České republiky, je v letošním roce plánována registrace další nové české odrůdy – Blues. Majoritní odrůdou pěstovanou u nás je ŽPČ. V roce 2017 byl pěstován na ploše zaujímající 87,3 % ze všech ploch. V r. 2018 to bylo o 0,5 % méně.

Tabulka č. 1: **Odrůdová skladba chmele, sklizeň a výnos v České republice v letech 2017 a 2018**

Odrůda chmele	Rok 2017			Rok 2018		
	Plocha (ha)	Sklizeň (t)	Výnos (t/ha)	Plocha (ha)	Sklizeň (t)	Výnos (t/ha)
ŽPČ*	4 317	5 514,22	1,28	4349	4089,95	2,70
Agnus	42	97,71	2,33	42	90,61	4,83
Bohemie	2	1,70	0,85	1	1,33	1,33
Harmonie	5	11,20	2,24	8	12,02	1,50
Kazbek	34	70,61	2,08	34	63,91	5,97
Premiant	165	342,27	2,07	170	240,87	3,99
Rubín	1	1,37	1,37	2	2,09	1,05
Saaz Late	44	81,21	1,85	46	81,35	4,08
Saaz Special	26	45,04	1,73	34	33,35	3,32
Sládek	295	613,89	2,08	320	497,66	4,82
Vital	3	6,57	2,19	4	3,83	1,28
ostatní	11	9,00	1,11	10	9,45	2,54
CELKEM	4 945	6 794,79	1,37	5 020	5 126,42	1,02

Pozn. * všechny klony

Zdroj: Ministerstvo zemědělství 2017; Altová 2018; vlastní úprava

3.4 Technologie pro pěstování chmele

Od r. 2008 se u nás začala používat nová technologie pro pěstování chmele, a to na nízkých konstrukcích, jejichž výše je pouze do 3 m. Osvědčený způsob pěstování chmele používal konstrukce vysoké až 7 m a toto pěstování chmele bylo jak po stránce finanční, tak i pracovní, velice náročné. Zejména při zavádění odkloněných vegetačních vrcholů nebo znovuzavedení révy po živelné pohromě, či zavěšení spadlých rév (Štranc et al. 2012). Glendinning (2009) uvádí, že s tímto druhem pěstování začala Velká Británie už od poloviny devadesátých let. Přejít k tomuto způsobu pěstování chmele výrazně snížil požadavky na sezónní lidské práce a spotřebu pesticidů nutných na ochranu proti škůdcům a chorobám.

K modernímu pěstování na nízkých konstrukcích jsou využívány pouze „vysoké“ české odrůdy, a to Premiant, Sládek a ŽPČ. Ty však nejsou pro tento typ pěstování vhodné (mohutná rostlina s nadměrným olistěním na úkor chmelových hlávek), a proto je nutné vyšlechtit odrůdy speciální – „trpasličí“ (Nesvadba 2016). Barborka (2017) však uvádí, že plocha pro pěstování chmele na nízkých konstrukcích se u nás meziročně snižuje, protože vysazované odrůdy nedávaly žádanou úrodu. Nízké konstrukce totiž vyžadují velice nízké nasazení hlávek, které prozatím naše odrůdy (jak tradiční, tak i hybridní) nemají. Nesvadba (2016) dále informuje, že do registračních zkoušek Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) bylo přihlášeno 12 nadějných genotypů. Patzak et al. (2017) potvrzují, že tvorba nových českých genotypů chmele na nízké konstrukce se již ukončuje a výsledky genetických analýz zřetelně prokázaly, že vybrané genotypy mají ve svém původu genetickou informaci aromatických evropských chmelů. Na základě toho byly v roce 2017 zaregistrovány dvě nové odrůdy určené pro pěstování na nízkých konstrukcích, a to odrůdy Jazz a Country.

3.5 Sušení, úprava a certifikace chmele

Chmel se po sklizni suší a dále je zpracováván a balen dle požadavků jednotlivých pivovarů. Šnobl et al. (2002) uvádějí, že obsah vody v chmelových hlávkách je před počátkem procesu sušení v rozsahu 75 – 85 %, hrozí jim nebezpečí zapaření až znehodnocení, a proto musí být urychleně dopraveny do sušárny. Časový úsek mezi česáním a sušením chmele nesmí překročit 2 hodiny. Sušení probíhá 6 – 9 hodin při teplotě 55 – 60 °C na komorových, resp. pásových sušárnách. Průběh sušení ovlivňuje též rozdílná struktura chmelových hlávek u různorodých odrůd chmele, zejména dle zařazení do klíčových typových skupin (Kořen et al. 2008). Optimální obsah vlhkosti usušeného chmele je v rozmezí 8 – 11 %. Pokud je vlhkost

usušeného chmele menší než 7 %, může docházet k rozpadu na listeny a věténka. Tento proces je nežádoucí, protože dochází při dalším zpracování ke ztrátě lupulinu. Pokud je obsah vody vyšší než 13 %, může docházet ke vzniku plísní, ke změně barvy nebo k samovznícení (Krofta et al. 2017a).

Hlávky upravené v klimatizační komoře, která bývá součástí pásové sušárny, se lisují do transportních žoků (jejich hmotnost bývá v rozmezí 60 – 70 kg). Každý žok je nezávisle zvážen, vybaven štítkem s nezbytnými údaji, v horní části zaplombován a zapsán do výkazu dodávky označeného chmele (tzv. známkování), které je řízeno zákonem (Šnobl et al. 2002). Pro snadnou manipulaci je hlávkový chmel lisováním pod velmi nízkým tlakem zpracováván do tzv. pelet (puků). Ty jsou zárukou zachování silic, které jsou potřebné k tomu, aby pivo mělo prvotřídní aroma a pravou chuť. Povrch pelety pokrývá pryskyřice, která chrání chmel před oxidací, zajišťuje jeho trvanlivost a kvalitu, zachovává mu typickou vůni, chuť a chmel setrvává v této podobě nesrovnatelně déle čerstvý. Granule typu 90 a 45 jsou baleny do nepropustných vakuovaných obalů. Lze je snadno rozebrat a dále s nimi manipulovat. Takto je zpracováno cca 60 % usušeného chmele (Mikyška et al. 2012). Pivovarům jsou odrůdy chmele dodávány buď v surové formě (suché hlávky) nebo v již zmíněných peletách, anebo CO₂ – extrakt, resp. ethanolový extrakt (Chmelařský institut 2012).

Chmelové pelety jsou skladovány při teplotě menší než 4 °C. Chmelové pelety typu 90 mají stejnou strukturu jako autentický chmel. Ze 100 kg chmele (usušeného) se semletím získá 90 kg pelet s běžnou standardizovanou kvalitou obsahu alfa hořkých kyselin. Obohacené chmelové pelety typu 45 se vyrábějí z dosušeného chmele, z něhož jsou odstraněny nečistoty. Následně jsou hlávky rozemlety, homogenizovány a obohaceny lupulinem flotací v plynné fázi při značném podchlazení na teploty -30 až -35 °C. Ze 100 kg chmele se takto získá 45 kg granulí s téměř dvojnásobným obsahem hořkých kyselin. Zvýšením teplot při tlakové granulaci dochází k nepatrným změnám chemického složení (Basařová et al. 2010).

Podle Zákona č. 97/1996 Sb., § 5 o ochraně chmele rovněž dochází k ověřování kvality a původu chmele. Ověřuje se výhradně výrobcem označený chmel, který pochází z oblastí splňujících požadavky stanovené předpisy Evropských společenství. Vydáním certifikátu, který provází zabalený chmel až k zákazníkům, je ověřování zakončeno (Nařízení komise (ES) č. 1850/2006)). V ověřovací listině musí být uvedeno místo, resp. místa produkce chmele, rok sklizně a odrůda. Ověřovací listina, týkající se chmelového prášku, chmelového prášku s vyšším obsahem lupulinu, chmelového výtažku a smíšených chmelových produktů, může být vystavena pouze v případě, že obsah α kyselin v uvedených produktech není nižší než u chmele,

z něhož byly opatřeny. Certifikaci provádí ÚKZÚZ za účelem zabránit záměně produktů v sektoru chmele. Např. v období 2016/2017 bylo ověřeno ze všech tří pěstebních oblastí, celkem 7 590 t chmele české provenience, z toho bylo 5 343 t zpracováno do granulí a dále bylo do granulí upraveno pod kontrolou i 121 t zahraničního chmele (MZe 2017).

Příklad ověřovací listiny, která doprovází chmelové pelety vyrobené z Žateckého poloraného červeňáku, které nakupuje pivovar „Poutník“ Pelhřimov, dokládá Obrázek č. 1.



Obrázek č. 1: Ověřovací listina českého chmele ŽPČ

Zdroj: foto autor

3.6 Chemické složení chmele

Krofta et al. (2017a) uvádějí, že skladba chmele se neustále mění. V procesu dozrávání, při zpracovávání chmele na výrobky a rovněž i při jeho skladování. Chmel po sklizni stárne. Wain et al. (1977) zjistili, že na rychlost stárnutí chmele má vliv celá řada okolností jako např. čas, teplota, působení světla, přístup vzduchu, a také vše závisí na odrůdě chmele. Oxidací dochází k nevratným změnám ve skladbě chmelových pryskyřic, silic a dalších důležitých složek chmele. Nejpodstatnější změnou je úbytek obsahu alfa a beta kyselin. V Tabulce č. 2 je uveden průměrný obsah a skladba chmelových pryskyřic a silic u českých odrůd chmele, které uvádí Chmelařský institut, s. r. o, Žatec, a u vybraných dovezených odrůd chmele.

Tabulka č. 2: Obsah a složení chmelových pryskyřic a silic u českých odrůd chmele a vybraných světových odrůd

České odrůdy chmele (tradiční)	Chmelové pryskyřice						Chmelové silice g/100 g
	α -kyseliny (% hm.)	β -kyseliny (% hm.)	poměr α/β	kohumulon (% rel.)	kolupulon (% rel.)	Celkové pryskyřice (% hm.)	
Saaz / ŽPČ	2,5 – 4,5	4,0 – 6,0	0,6 – 1,0	23 – 26	39 – 43	13 – 20	0,4 – 0,8
Saaz Late	3,5 – 6,0	4,0 – 6,5	0,8 – 1,0	20 – 25	39 – 43	15 – 22	0,5 – 1,0
Sládek	4,5 – 8,0	4,0 – 7,0	0,7 – 1,3	23 – 30	44 – 50	17 – 24	1,0 – 2,0
Kazbek	5,0 – 8,0	4,0 – 6,0	0,9 – 1,5	35 – 40	57 – 62	17 – 22	0,9 – 1,8
Bohemie	5,0 – 8,0	6,0 – 9,0	0,8 – 1,0	23 – 26	40 – 45	22 – 26	1,0 – 1,5
Harmonie	5,0 – 8,0	5,0 – 8,0	0,8 – 1,2	17 – 21	35 – 40	22 – 26	1,0 – 2,0
Bor	6,0 – 9,0	3,0 – 5,5	1,6 – 2,3	22 – 27	43 – 48	18 – 25	1,2 – 2,0
Premiant	7,0 – 10,0	3,5 – 5,5	1,7 – 2,3	18 – 23	39 – 44	19 – 25	1,0 – 2,0
Rubín	9,0 – 12,0	3,5 – 5,0	2,5 – 3,2	25 – 33	45 – 52	22 – 27	1,0 – 2,0
Agnus	9,0 – 12,0	4,0 – 6,5	1,9 – 2,6	29 – 38	51 – 59	26 – 32	2,0 – 3,0
Vítal	12,0 – 16,0	6,0 – 10,0	1,6 – 2,1	21 – 26	45 – 50	25 – 30	1,5 – 2,5
Nové odrůdy od r. 2017							
Gaia	12,0 – 15,0	5,0 – 10,0	1,3 – 2,7	20 – 29	40 – 48	26 – 33	1,5 – 2,5
Boomerang	10,0 – 14,0	5,0 – 10,0	1,5 – 2,3	27 – 32	47 – 50	24 – 30	1,5 – 3,0
Country	3,0 – 5,0	1,5 – 2,5	1,5 – 2,4	22 – 30	35 – 50	13 – 20	0,2 – 0,5
Jazz	3,0 – 7,0	2,0 – 4,0	1,5 – 2,7	22 – 35	40 – 60	15 – 24	0,4 – 1,5
Dovezené odrůdy							
Cascade	4,5 – 7,0	4,8 – 7,0	0,9 – 1,0	33 – 40	39 – 43	nenalezeno	0,8 – 1,5
Citra	11,0 – 13,0	3,5 – 4,5	2,4 – 3,7	32 – 38	55,0	nenalezeno	nenalezeno
Triskel	8,0 – 9,0	4,0 – 4,7	nenalezeno	20 – 23	nenalezeno	nenalezeno	1,5 – 2,0
Northern Brewer	8,0 – 10,0	3,0 – 5,0	nenalezeno	27 – 33	nenalezeno	nenalezeno	1,0 – 1,6
Galaxy	13,5 – 14,8	5,0 – 6,5	2,1 – 2,9	32 – 38	nenalezeno	nenalezeno	3,0 – 5,0

Zdroj: Chmelářský institut s.r.o., Žatec 2012; Barth & Schönberger 2014; Altová 2018, vlastní úprava

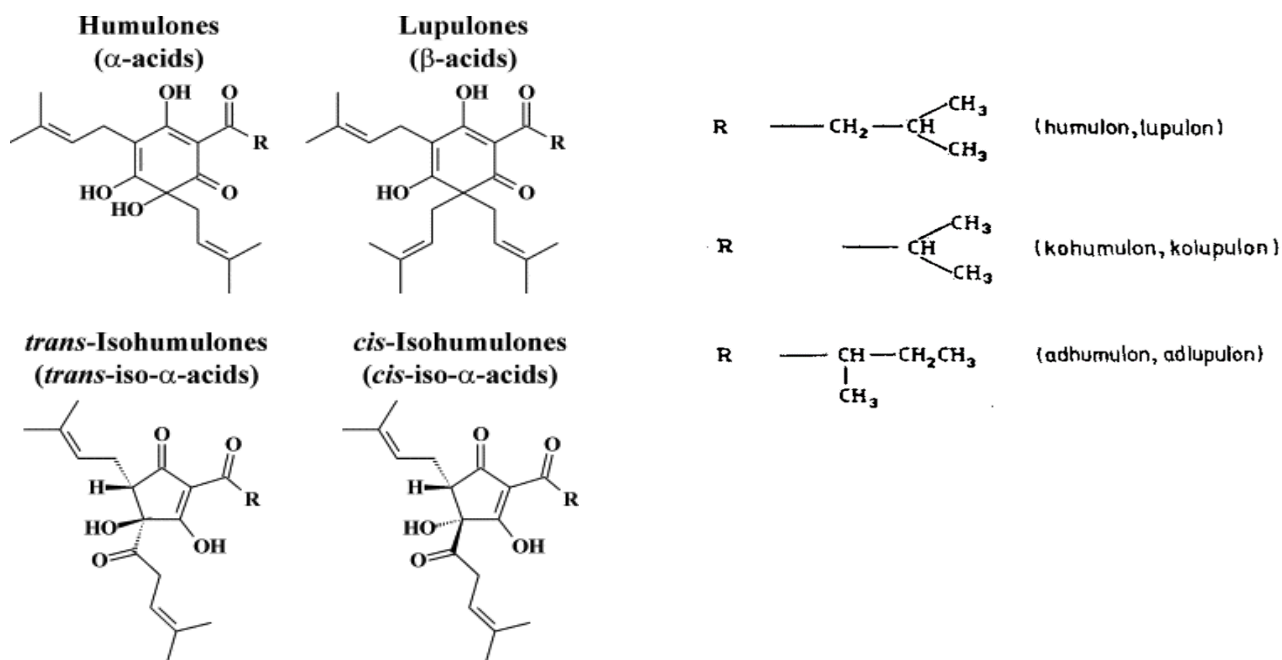
Z hlediska pivovarského průmyslu jsou právě ve chmelové hlávce nejdůležitější složkou chmelové pryskyřice, chmelové silice a polyfenoly. Kromě těchto složek obsahuje chmelová hlávka značné množství vody a též látky označované jako problematické, a to jsou dusičnany, těžké kovy, rezidua postřikových látek, resp. rezidua chemických katalyzátorů (Prugar et al. 2008).

3.6.1 Chmelové pryskyřice

Jedná se o komplikovaný soubor látek, z nichž jenom u některých je známo chemické složení. Především k nim patří α -hořké kyseliny a β -hořké kyseliny. Oba druhy kyselin jsou v čistém stavu bez chuti, vůně a ve vodě málo rozpustné. Hořké kyseliny jsou pryskyřičné alicyklické fenolové kyseliny a obvykle se klasifikují takto:

α -hořké kyseliny – chemicky jsou velice nestálé, tvoří je směs sedmi doposud známých analogů, z nichž nejvíce převažuje humulon (35 – 70 %), kohumulon (20 – 55 %), a adhumulon (10 – 15 %) (Basařová et al. 2010);

β -hořké kyseliny – tvoří směs analogů, z nichž nejvýznamnější jsou lupulon (30 – 55 %), kolupulon (20 – 55 %) a adlupulon (5 – 10 %). Beta kyseliny lze klasifikovat jako bezbarvé krystalické látky, jejichž bod tání je v rozmezí od 82 do 97 °C a ve vodě málo rozpustné (Krofta & Mikyška 2014). Od α -kyselin se β -kyseliny odlišují přítomností jiného postranního řetězce na 6. uhlíku aromatického jádra, což je znázorněno na Obrázku č. 2 (Krofta et al. 2017a)



Obrázek č. 2: Strukturální vzorce α - a β -hořkých kyselin a jejich izomerů

Zdroj: www.kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/1992/05/01.pdf

Oba typy těchto hořkých kyselin mají několik homologů, jako jsou normální, co- a ad-homology. Vedlejší a méně zastoupené chmelové kyseliny jsou posthumulon, postlupulon, prehumulon, prelupulon a adprehumulon. Během procesu vaření se humulony převádějí na izohumulony, které jsou odpovědné za specifickou hořkou chuť, stabilitu pивní pěny a zásluhou antiseptických účinků stoupá i biologická trvanlivost piva (Prugar et al. 2008; Česlová et al. 2009). Pluháčková et al. (2011) konstatují, že obsah α -hořkých kyselin je u českých chmelů v rozmezí od 2,5 do 16 % a β -kyselin od 3 do 10 %, naopak Basařová et al. (2010) uvádějí množství β -kyselin 3 – 5 %. Poměr mezi oběma kyselinami by měl být 1 : 1,2 – 1,5.

Povětrnostní podmínky v průběhu vegetačního období mají nejdůležitější vliv na obsah α - a β -kyselin ročníkové sklizně chmele. Zejména se jedná o srážky a teplotu v období června až srpna. Jsou-li pěstovány hybridní odrůdy s delší vegetační dobou, může se toto období prodloužit až do měsíce září. Zprávy o obsahu α -kyselin v českých chmelech jsou vědeckou veřejností pokaždé očekávány se značným zájmem. Proto se prognózování a klasifikaci obsahu α - a β -kyselin z ročníkové sklizně chmele připisuje velká publicita. V posledních letech se letní období v celé střední Evropě vyznačuje značnými extrémními počasí (vysoké teploty a málo srážek); výsledkem jsou nejen nízké výnosy chmele, ale i podprůměrné obsahy α -hořkých kyselin (Krofta et al. 2017b).

V roce 2017 bylo vyrobeno, dle prozatímních výsledků sklizně v jednotlivých státech, 11 034 t α -hořkých kyselin, což je o 3,9 % více než v roce 2016. Souhrn počtu α -kyselin vyrobených na českých chmelnicích v uplynulých letech je uveden v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Množství alfa kyselin vyprodukovaných v České republice v letech 2011 – 2017

Rok	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
α-kyseliny (v tunách)	306,8	215,4	214,1	243,5	159,9	341,1	269,9

Zdroj: Krofta et al. 2017c

V Tabulce č. 4 je vyhodnocen obsah α - a β -hořkých kyselin v důležitých českých odrůdách chmele ze sklizně v letech 2016, 2017 a 2018. Jednalo se o vzorky čerstvě sklizeného a usušeného chmele, které byly analyzovány metodou HPLC dle metodiky EBC. Výsledky analýz hořkých látek jsou vyjádřeny v % hmotnostních v sušině. Mikyška & Jurková (2019) konstatují, že rok 2018, co se týče obsahu alfa a beta hořkých kyselin v odrůdě ŽPČ, byl nižší než průměr za posledních 26 let, a prakticky shodný s rokem 2017.

Tabulka č. 4: Obsah α - a β -hořkých kyselin v důležitých českých chmelech v letech 2016, 2017 a 2018

Odrůda chmele	Rok 2016					Rok 2017					Rok 2018				
	α -kyseliny (% hm.)	β -kyseliny (% hm.)	Poměr α / β	Kohumulon (% rel.)	Kolupulon (% rel.)	α -kyseliny (% hm.)	β -kyseliny (% hm.)	Poměr α / β	Kohumulon (% rel.)	Kolupulon (% rel.)	α -kyseliny (% hm.)	β -kyseliny (% hm.)	Poměr α / β	Kohumulon (% rel.)	Kolupulon (% rel.)
ŽPČ	3,35	4,99	0,67	23,50	39,7	2,81	4,41	0,64	24,2	39,4	2,89	3,92	0,74	24,4	38,9
Sládek	7,29	6,40	1,17	23,70	46,9	6,43	5,87	1,11	24,0	47,1	4,96	3,37	1,39	26,3	48,0
Premiant	9,02	5,54	1,68	20,01	42,5	7,65	5,66	1,40	18,9	39,6	4,65	3,54	1,31	20,5	39,2
Agnus	9,70	6,34	1,54	38,30	60,2	10,97	6,32	1,75	32,7	55,9	10,91	5,18	2,13	28,1	50,3
Kazbek	4,96	5,45	0,91	37,20	61,1	5,65	5,01	1,13	35,5	60,2	4,68	4,82	0,96	34,7	56,4
Saaz Late	4,76	5,66	0,83	21,00	38,4	3,44	4,89	0,71	21,1	37,5	1,57	3,78	0,40	26,2	38,6

Zdroj: Mikyška et al. 2017; Mikyška & Jurková 2018; Mikyška & Jurková 2019; vlastní úprava

3.6.2 Chmelové silice

Vyskytují se v lupulinových zrnech chmelové hlávky společně s pryskyřicemi a dalšími látkami a jejich obsah se pohybuje v rozmezí od 0,5 – 3 %. Jsou rozhodující skupinou látek zodpovídajících za aroma chmele. Chmelové silice jsou směsicí mnoha set přírodních těkavých látek odlišného chemického složení. Složky chmelových silic lze členit do tří kategorií. Značná část patří uhlovodíkové frakci, která u čerstvého chmele představuje 70 – 80 % celkové hmotnosti silic. Zbylá část patří látkám obsahujícím kyslík (cca 20 - 30 %) a zbylé 1 % náleží sírné frakci chmelových silic. V pivovarském procesu je využit jen velmi malý podíl silic. Většina vytěká při chmelovaru a další ubývá při kvašení (Prugar et al. 2008; Pluháčková et al. 2011).

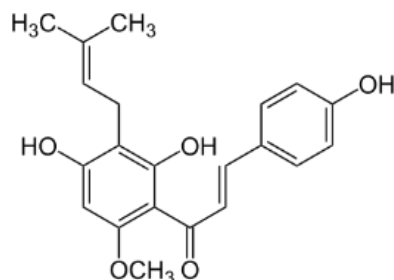
Analýza skladby chmelových silic je prováděna pouze plynovou chromatografií, zatímco oddělení silic z chmelové matrice je možno provádět několika postupy. Nejčastěji se silice izolují destilační metodou nebo extrakcí na tuhou fázi (Krofta et al. 2017a).

3.6.3 Chmelové polyfenoly

Mezi chmelové polyfenoly jsou řazeny jednoduché fenolové kyseliny (hydroxyskořicová, gallová, kávová, kumarová a další) a jejich deriváty, a polycyklické struktury tzv. flavonoidy. V chmelu je obsaženo 2 – 6 % polyfenolů, opět ale vše závisí na odrůdě chmele a na lokalitě pěstování. Polyfenoly jsou rozpustné ve vodě, proto pronikají až do výsledného produktu a tvoří cca 30 % celkových polyfenolů přítomných v pivu. Hlávkový chmel a peletovaný chmel typ 90 obsahují plné množství chmelových polyfenolů, naopak koncentrované pelety typu 45 obsahují pouhou část polyfenolů v závislosti na stupni obohacení. Při jejich výrobě je z produktu oddělena část rostlinného podílu (Prugar et al. 2008).

Působení polyfenolových substancí na kvalitu piva je zkoumáno již celou řadu let, často ale se spornými poznatky. Jde o značně mnohotvárnou skupinu látek vyznačující se různými vlastnostmi z hlediska chemického složení, antioxidačních schopností, zákalotvorných vlastností, a tudíž vlivu na stabilitu piva (Mikyška & Jurková 2018). Almaguer et al. (2014) konstatují, že převážná část polyfenolů se nachází v listenech a vřetenu chmelových hlávek, z lupulinových žláz společně s hořkými kyselinami a silicemi jsou vylučovány tzv. prenylflavonoidy, které jsou specifickou skupinou flavonoidů. Zahrnují dvě podskupiny, a to chalkony a flavanony (Karabín et al. 2015). Mezi nejvýznamnější chalkony patří xanthohumol a desmethylxanthohumol. Xanthohumol je významná biologicky aktivní látka

s protinádorovými a antioxidačními účinky. Byla prokázána schopnost inhibice enzymů cytochromu P450. Působí také inhibičně proti některým bakteriím, virům, plísním a prvokům. Na Obrázku č. 3 je znázorněna struktura xanthohumolu (Nešpor et al. 2017).



Obrázek č. 3: **Strukturní vzorec Xanthohumolu**

Zdroj: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/xanthohumol>

3.7 Etapy hodnocení ročníkových obsahů alfa kyselin

V České republice se celý průběh hodnocení obsahů alfa kyselin sestává ze tří etap, které na sebe vzájemně navazují. Do 90. let minulého století celý proces platil pouze pro odrůdu chmele ŽPČ. V letech 1995 – 2000 se začaly pěstovat i hybridní odrůdy chmele a hodnocení se s postupem času rozšířilo i na odrůdy Agnus, Premiant a Sládek.

3.7.1 Před sklizňové prognózy pro ŽPČ

Před očekávaným začátkem sklizně, zpravidla (v průběhu 3 – 4 týdnů), se ve vybraných chmelařských oblastech Žatecka a Ústěcka provede sběr chmelových hlávek. Odběrná místa jsou zvolena tak, aby byly odebrány vzorky ze starších chmelnic, které jsou osázené sadbou ŽPČ. Jedná-li se o chmelnice osázené ozdravenou sadbou, musí být porosty staré alespoň pět let. Vzorkování v obou takovýchto oblastech se musí stihnout během jednoho pracovního dne. Takto jsou realizovány tři – čtyři zkušební odběry. Poslední, tzv. kontrolní odběr je prováděn cca týden po zahájení sklizně. Vzorky chmelů jsou odebírány vždy ze stejné chmelnice, ve stejném místě, z 5 – 10 rostlin. Tyto očesané hlávky musí být do druhého dne usušeny při teplotě 50 – 55 °C v laboratorní komorové sušárně a druhý den po odběru jsou separovány na obsah α -kyselin (Krofta et al. 2017c).

3.7.2 Sklizňové prognózy pro ŽPČ i hybridní odrůdy

Sklizňové prognózy pro výše uvedené odrůdy se dělají na základě rozborů zvolených nákupních vzorků chmele během sklizně a těsně po jejím skončení ze všech pěstebních oblastí.

Jednotlivé vzorky se shromažďují v laboratoři Chmelařství, družstva Žatec a to je následně předává Výzkumnému ústavu pivovarskému a sladařskému v Praze, kde je provedena konečná selekce vzorků a jejich rozbor. Každý rok se testuje cca 115 vzorků ŽPČ, cca po 30-ti vzorcích odrůd Premiant a Sládek a cca 10 vzorků odrůd Agnus, Kazbek a Saaz Late. Výsledky analýzy obsahu α - a β -kyselin jsou statisticky zpracovány po jednotlivých pěstebních oblastech v celé republice a následně jsou předávány pivovarům a publikovány v odborném časopise Kvasný průmysl (Krofta et al. 2017c).

3.7.3 Skutečné sklizňové obsahy alfa kyselin pro ŽPČ i hybridní odrůdy

Na základě zpracování rozborů veškerých nákupních a farmářských vzorků chmele (největší počet připadá na ŽPČ) jsou zjišťovány skutečné sklizňové obsahy α -kyselin. V závislosti na sklizni chmele v daném roce, se celkový počet hodnocených vzorků mnohdy pohybuje v rozmezí 2 000 – 3 000. Vzorky jsou stanovovány podle nejrozšířenějších odrůd i všech tří chmelařských oblastí. V současnosti se takto hodnotí odrůdy: ŽPČ, Agnus, Kazbek, Premiant a Sládek.

Krofta et al. (2017c) dále uvádějí, že vzorky pro odrůdu ŽPČ jsou dále diferencovány dle typu sadby na standardní a viruprosté (značení VT – virus-tested nebo VF – virus-free). Zejména označení VF pro ŽPČ má svůj význam, protože ozdravení sadby této odrůdy od hospodářsky škodlivých virů a viroidů, má značný vliv na množství a kvalitu sklizeného chmele. Podrobné zprávy o obsahu alfa kyselin z ročníkové sklizně v českých chmelech jsou publikovány v časopisu Chmelařství.

3.8 Analytické metody pro stanovení hořkých kyselin

Analytickým metodám, dle kterých se stanovuje obsah α - kyselin ve chmelu, je připisována značná publicita. Analytica EBC (7. část – Chmel a chmelové výrobky) je nejdůležitější evropský předpis obsahující analytické metody pro chmel. EBC (European Brewery Convention) je mezinárodní vědecko-technická organizace, která byla založena v r. 1947 za účelem podpory a propagace zájmů pivovarského průmyslu. Podobnou funkci ve Spojených státech Amerických uskutečňuje organizace ASBC (American Society of Brewing Chemists). Ta zpracovala souhrn analytických metod týkajících se chmele a chmelových produktů s titulem „Methods of Analysis of the ASBC“. Byl zaznamenán přechod od méně specifických titračních metod k metodám více specifickým, které jsou založené na kapalinové chromatografii. Od r. 1997 je v ČR postup určení α - a β -hořkých kyselin kapalinovou

chromatografií normalizován a zakotven společně s dalšími metodami používanými ke zkoušení chmele v normě ČSN 46 2520 v části 17 pod názvem „Zkoušení chmele“ (Krofta 2008; Jurková et al. 2012).

Určit obsah α - a β -hořkých kyselin ve chmelu je nejdůležitější podmínkou při sjednávání obchodů s chmelem. Při nákupu chmele musí být přesně specifikována použitá metoda (Krofta & Tichá 1997).

3.8.1 Titrační metody

Do 50. – 70. let minulého století byly používány metody titrační a gravimetrické založené na vysrážení α -kyselin v nerozpustnou sraženinu humulonát olovnatý pomocí dvoumocného olova. Následně se určil obsah kyselin zvážením dané sraženiny (Krofta & Tichá 1997). Tyto metody byly později upraveny a nahrazeny konduktometrickou titrací octanem olovnatým. V titrační metodě se dříve využívalo rozpouštědla toluenu (Analytica-EBC, 2005a). Toluén je považován za relativně „měkké“ rozpouštědlo, které nedokáže kvantitativně převést hořké kyseliny do roztoku (Krofta & Tichá 1997). Později se tento krok nahradil diethyletherem v kyselém prostředí (Analytica-EBC, 2005b). Extrakt je titrován octanem olovnatým za vzniku komplexů s hořkými kyselinami a konduktometricky je sledována změna vodivosti systému. Výsledkem je obsah α -kyselin vyjádřený hmotnostními procenty hodnotou KH (konduktometrická hodnota). Konduktometrická hodnota je ale ovlivněna dalšími látkami, které také reagují s octanem olovnatým, a proto jsou naměřené hodnoty méně přesné. Beta kyseliny jsou stanoveny rozdílem celkového obsahu hořkých kyselin a hodnoty KH (Jurková et al. 2012). Výhodou těchto metod je hlavně cena, protože nepotřebují nákladné přístrojové vybavení a také relativně kratší čas analýzy (Krofta & Tichá 1997).

V současnosti byly nahrazeny a doplněny o metody spektrofotometrické, chromatografické, resp. elektroforetické. Inovace metod byla umožněna díky rychlému vývoji především HPLC – vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Olšovská et al. 2016).

3.8.2 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické stanovení je založené na schopnosti hořkých kyselin pohlcovat světlo v UV oblasti. Pohlcování světla hořkými kyselinami je závislé hlavně na pH roztoku a také na použitém rozpouštědle. Proto je potřebné tato měření uskutečňovat za přesně definovaných podmínek pH v kyselém či zásaditém prostředí. V toluenu vyextrahované vzorky se, po naředění alkalickým methanolem předepsaným způsobem, proměří ve spektrofotometru při

vlnových délkách 275 nm (α i β -kyseliny), 325 nm (α -kyseliny) a 355 nm (β -kyseliny). Naměřené hodnoty absorbance se následně dosadí do regresních rovnic (Krofta 2008). Užití této metody v Evropě není příliš běžné a je spíše vhodná pro čerstvé chmele. Metoda je výhradně zakotvena v metodice American Society of Brewing Chemists (ASBC) pod označením Hops 6. Při spektrofotometrické analýze lze z hořkých kyselin získat také tzv. index skladování chmele ($HSI = A_{275}/A_{325}$). Tato hodnota určuje stupeň degradačních změn ve chmelech (Krofta & Tichá 1997).

3.8.3 Tenkovrstvá chromatografie TLC

Od 2. poloviny 20. století se tenkovrstvá chromatografie využívala pro separaci α - a β -kyselin v pivu a chmelových extraktech. Tato metoda je jednoduchá, nákladově efektivní a používá velice malá množství rozpouštědel.

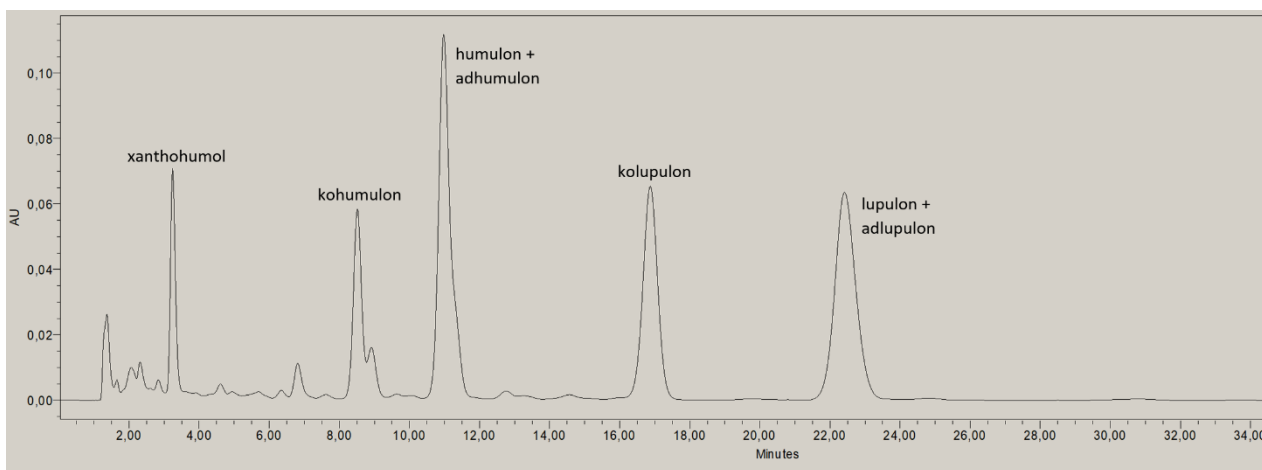
Jako příklad velmi propracovaného TLC stanovení lze uvést publikaci Franiau & Mussche (1974), kde se jako stacionární fáze využívá směs silika-gelu a celulózového prášku a jako mobilní fáze směs iso-oktanu, isopropylalkoholu, diethyletheru a kyseliny mravenčí. Tato metoda poskytuje vysoké rozlišení, sníženou dobu eluce a vysokou citlivost. Pro kvantitativní stanovení jsou chromatografické desky pozorovány pod UV světlem a skvrny odpovídající každé skupině látek jsou vyříznuty. Následně jsou rozpuštěné v alkalickém methanolu a měřeny při vhodné vlnové délce.

Dnes je možné hořké kyseliny analyzovat přímo z povrchu chromatografické desky, a to pomocí analytické techniky MIDAS (Molecular Ionization Desorption Analysis Source). MIDAS je nedávno zavedená ionizační a vzorkovací platforma pro hmotnostní spektrometrii (Winter et al. 2017). Sestává se z desorpčního chemického ionizačního zdroje (DAPCI) za atmosférického tlaku, který poskytuje ionty plynného dusíku a činidel potřebné pro desorpci analytu a platformy, která používá systém vyměnitelných desek pro provádění různých typů analýz (Winter et al. 2016). Vývoj každé desky trvá přibližně 20 min. Na druhou stranu analýza každého bodu pomocí MIDAS trvá pouze 4 minuty, což nabízí úsporu z hlediska času a rozpouštědel v porovnání s běžnými HPLC metodami. Problémem této metody je ale značná relativní směrodatná odchylka mezi vzorky, a to v rozmezí 16 – 35 % (Winter et al. 2017).

3.8.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC

Kapalinová chromatografie je metoda používaná ke zjištění obsahu alfa kyselin ve chmelu a dalších z chmele vyráběných produktů. Touto metodou lze přesně stanovit alfa

kyseliny i ve starších chmelech, což jiné metody neumožňují. Principem metody je chromatografická separace chmelových pryskyřic, které jsou získány vhodnou extrakcí chmele na analytické koloně a následně jsou detekovány jednotlivé složky na principu pohlcování UV světla. Vzhledem k tomu, že je k detekci využíván UV detektor, jedná se v podstatě o metodu spektrofotometrickou. Analýzou lze kromě obsahu alfa kyselin stanovit i obsah beta kyselin a zastoupení hlavních analogů kohumulonu, respektive kolupulonu (Krofta 2008). Graf č. 1 znázorňuje chromatogram HPLC analýzy dle metody EBC 7.7, kde se alfa kyseliny vymývají z kolony ve dvou zónách. V samostatné zóně kohumulon a ve společné zóně n-humulon s adhumulonem. Podobně se vymývají i beta kyseliny, kde samostatně se vymývá kolupulon a ve společné zóně n-lupulon s adlupulonem.



Graf č. 1: **Chromatogram chmelových pelet Žatecký poloraný červeňák 2017**

Zdroj autor, vlastní analýza

Jako příklad propracovanější a citlivější techniky HPLC lze uvést publikaci Prencipe et al. (2014), kde k extrakci využívá maceraci ve směsi methanolu s příměsí kyseliny mravenčí v poměru 99:1 jako nejvhodnější extrakční postup. Výhodou je její jednoduchost nevyžadující nákladné zařízení a vysoká výtěžnost sekundárních metabolitů. Jako detektor je využit UV/DAD detektor schopný proměřit rozsah všech vhodných vlnových délek. Dále je využívána kolona s povrchově porézními částicemi, která zlepšuje účinnost HPLC ve srovnání s konvenčními stacionárními fázemi (Prencipe et al. 2014). Částice této stacionární fáze obsahují stejně velká pevná jádra, která jsou na povrchu obalena silikagelem. Díky stejně velkým částicím se tvoří v koloně menší odpor. Jelikož analyt nemusí difundovat přes celou částici díky pevnému jádru, doba separace se výrazně zkrátí. Výsledkem je úplné oddělení všech složek v kratším čase a s nižším použitím rozpouštědla (Olšovská & Jurková 2012).

Jedná se o metodu, která je schopna současně analyzovat většinu sekundárních metabolitů chmele, a to jak hořkých kyselin, tak prenylflavonoidy. Hodnota LOD byla v rozmezí 0,3 – 1,0 µg/ml pro prenylflavonoidy a 2,8 – 5,8 µg/ml pro hořké kyseliny. Hodnota LOQ byla v rozmezí 1,3 – 3,8 µg/ml pro prenylflavonoidy a 8,1 – 21,4 µg/ml pro hořké kyseliny. Tyto hodnoty naznačují, že navrhovaná metoda HPLC-UV/DAD má vhodnou citlivost pro analýzu sekundárních metabolitů chmele (Prencipe et al. 2014).

3.8.5 Ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Jedná se o nově vyvinutou generaci kolon pro chromatografické stanovení společně s novou instrumentací pracující při vysokých tlacích cca 100 MPa (Swartz 2005). Kolony jsou tvořené částicemi o průměru ≤ 2 µm. Takto malé částice zvyšují účinnost separace a s využitím vyšších průtokových rychlostí se doba separace výrazně zkrátí (Mellors & Jorgenson 2004). Olšovská & Jurková (2012) uvádějí, že pomocí této technologie se zkrátí doba analýzy až devětkrát, citlivost se zlepší třikrát a rozlišení se zlepší až dvakrát. Společně s tím se sníží i spotřeba rozpouštědel. Nevýhodou takto malých částic v koloně je tvorba vyššího zpětného tlaku. Proto bylo potřeba poupravit celý přístroj tak, aby za takto vysokých tlaků mohl spolehlivě pracovat. UHPLC kolony jsou díky vysoké účinnosti schopny zlepšit separaci píků a v případě separace hořkých kyselin ve chmelu jsou schopny od sebe rozdělit i analogy n-humulon a adhumulon a stejně tak i n-lupulon a adlupulon. Běžné HPLC kolony tohoto nejsou schopny (Jurková et al. 2012).

3.8.6 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)

Metody založené na použití hmotnostní spektrometrie (MS), jako je např. kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), jsou vysoce citlivé a poskytují vynikající identifikační kapacitu. Využívají se při profilování či objevování nových sloučenin společně s dalšími technikami jako FTICR-MS či NMR. FTICR-MS je typ hmotnostního analyzátoru pro stanovení poměru hmotnost/náboj (m/z) na základě cyklotronové rezonance iontů v pevném magnetickém poli. Navzdory výhodám FTICR-MS při odhalování nových isoprenylovaných sloučenin v chmelu tato technika ukázala nekonzistentní výsledky zatížení v PCA (analýza hlavních komponent) ve srovnání s daty odvozenými od NMR a LC/MS. Jedno omezení ve FTMS se týká nedostatku kvantifikace a nutnosti získání spektra v pozitivním i negativním iontovém módu za účelem získání komplexních profilů vzorků, a další nevýhodou FTICR-MS je neschopnost rozlišit izomery jako humulon a adhumulon (Farag et al. 2012).

3.8.7 Dvourozměrná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Komplexní dvourozměrná kapalinová chromatografie (LC x LC) je jednou z nejlepších strategií pro získání zvýšené kapacity píků a selektivitu velmi složitých vzorků. Při tomto postupu se celý vzorek podrobí dvěma nezávislým separacím; eluent z první kolony se kontinuálně shromažďuje a znovu vstupuje do druhé kolony přes rozhraní, kterým je obvykle více portový přepínací ventil. Oddělené sloučeniny jsou dále detekovány jak UV, tak i MS detektory. Tato metoda je schopna oddělit více druhů sloučenin s uspokojivou selektivitou, stejně jako izomerní sloučeniny, a to právě díky spojení různých separačních kolon, a je velmi vhodná pro přesné profilování nebo objevování nových sloučenin v chmelových produktech (Sommella et al. 2018).

3.8.8 Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC)

MEEKC je chromatografická modifikace elektroforézy umožňující oddělení neutrálních molekul v elektrickém poli. K dosažení tohoto účinku se k pufru přidává povrchově nabitá aktivní látka, obvykle dodecyl-sulfát sodný (SDS), v koncentraci nad kritickou koncentrací micel. Neutrální molekuly jsou rozděleny mezi vodnou fázi a nabitou micelární mikrofázi podle jejich hydrofóbnosti. Prostřednictvím sdružování s micelami se neutrální molekuly pohybují v poli jako by byly nabitě a různé stupně sdružování určují zjevné rozdíly v elektroforetické pohyblivosti, které vedou k separaci. Hořké kyseliny mohou být rozděleny do α a β -frakcí čistou elektroforézou, nikoliv však na jednotlivé druhy. Povzbuzující výsledky byly získány s SDS jako povrchově aktivní látkou, nicméně tato analýza vyžaduje přísnou regulaci pH separačního pufru (v rozsahu 0,2 jednotek) a ztráta rozlišení může nastat vlivem tepelných účinků v koloně. Substituce povrchově aktivní látky emulzí olej/voda sestávající z SDS, n-heptanu a n-butanolu v boraxovém pufru vede ke značnému zlepšení robustnosti. Využitím vylepšeného rozlišení, které lze získat pomocí mikroemulzní elektrokinetické chromatografie (MEECC), je nyní možné určit obsah adhumononu a adlupulonu v odrůdách chmele (Szucs et al. 1994).

3.8.9 Nukleární magnetická rezonance

. Na rozdíl od analýz založených na MS, je nukleární magnetická rezonance (NMR) univerzální (tj. nezávislá na schopnostech ionizace analyzovaných látek) a poskytuje velké množství informací o molekulární struktuře a o absolutní kvantifikaci sloučenin ve složitějších vzorcích. NMR ve srovnání s MS má nižší citlivost (Moco et al. 2007)

V současné době může být aplikována pro různé účely v různých oblastech. Nedávná studie zaměřená na vývoj nové, jednoduché a efektivní metody pro fingerprinting metabolitů bioaktivních sloučenin v chmelových peletách s využitím nového nástroje ERETIC 2 ukázala, že kvantitativní nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (qNMR) představuje vhodnou techniku pro kontrolu kvality rostlinných produktů. Jedná se o první pokus použití této metody na složité matrice přírodního původu, jako jsou extrakty chmele. ERETIC 2 je založen na metodě interního standardu, která porovnává absolutní intenzity dvou různých spekter. Intenzita NMR signálu je úměrná počtu jader, která způsobují tento signál za specifických podmínek. Tato úměra závisí na excitačním pulsu, době zpoždění a širokopásmovém odpojení; proto jsou nezbytné konstantní podmínky. Pro kvantifikaci byla plocha píku signálů náležejících k cílovým sloučeninám manuálně integrována a porovnána s plochou píku vytvořenou externím standardem o známé koncentraci, jejíž spektrum bylo získáno stejně jako analyzované vzorky. qNMR umožnilo současnou identifikaci a kvantifikaci těchto analytů, s kratší dobou analýzy a nižším použitím rozpouštědla než HPLC metoda (Bertelli et al. 2018). I přesto, že je NMR instrumentace pracná a stále ne zcela běžná v provozních laboratořích, samotná příprava vzorku a optimalizace metody v porovnání s metodou HPLC je rychlejší, jednodušší a výsledky jsou dobře reprodukovatelné (Olšovská et al. 2016).

4 Materiál a metody

4.1 Vzorky

Pro experimentální část diplomové práce byly využity chmelové pelety typu 90 a v jednom případě chmelové hlávky. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí dvou analytických metod, a to chromatografické s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie a optické s využitím spektrofotometru Helios Gamma U.



Obrázek č. 4: Chmelové pelety 90 a chmelové hlávky

Zdroj: foto autor

Celkem bylo analyzováno 10 vzorků chmelových pelet (4 české odrůdy, z toho ŽPČ ve dvou termínech sklizně a 5 odrůd ze zahraničních) a jeden vzorek chmelových hlávek (Žatecký poloraný červeňák) s počtem opakování $n = 3$ u obou metod. Jednalo se o následující odrůdy (v závorkách je uvedena země původu):

- Agnus (Česká republika) – rok sklizně 2016,
- Cascade (USA) – rok sklizně 2016,
- Citra (USA) – rok sklizně 2016,
- Galaxy (Austrálie) – rok sklizně 2015,
- Harmonie (Česká republika) – rok sklizně 2017,
- Northern Brewer (Německo) – rok sklizně 2016,
- Sládek (Česká republika) – rok sklizně 2016,
- Triskel (Francie) – rok sklizně 2016,
- Žatecký poloraný červeňák (Česká republika) – rok sklizně 2016,
- Žatecký poloraný červeňák (Česká republika) – rok sklizně 2017,
- Žatecký poloraný červeňák (Česká republika) – rok sklizně 2018, chmelové hlávky.

Vzorky chmelů byly skladovány v chladničce při teplotě 6 °C. Před analýzou byly vzorky vytemperovány na teplotu laboratoře, která byla 25 °C, a analýzy probíhaly při stejné teplotě.

4.2 Analytické metody

4.2.1 Metoda chromatografická – HPLC

Princip metody

Při stanovení bylo postupováno podle analytické metody EBC 7.7 publikované v monografii Hodnocení kvality chmele (Krofta 2008). Chmelové pryskyřice byly extrahovány s využitím směsi methanolu, diethyletheru a zředěné HCl ($c = 0,1 \text{ mol/l}$). Z oddělené etherové fáze byly analyzované látky separovány metodou HPLC na chromatografické koloně s reverzní stacionární fází a UV detektorem při vlnové délce 314 nm.

Laboratorní vybavení

Mlýnek na chmel, třepačka, analytické váhy, skleněné láhve se šroubovacím a těsně uzavíratelným víčkem o objemu 250 ml, ultrazvuková lázeň, odměrný válec o objemu 100 ml, odměrná pipeta, odměrné baňky o objemu 100 ml, injekční stříkačky s jehlami, filtry (LUT Syringe filter PVDF, průměr disku 25 mm, průměr pórů 0,45 μm), vialky s částečně perforovaným uzávěrem, analytická HPLC kolona, kapalinový chromatograf s UV detektorem a počítačovou datastanicí.

Chemikálie

- methanol p. a.,
- methanol pro HPLC,
- diethylether p. a.,
- demineralizovaná voda,
- zředěná HCl ($c = 0,1 \text{ mol/l}$).
- mobilní fáze pro HPLC:
methanol pro HPLC + demineralizovaná voda + kyselina fosforečná p. a. (85 %) v poměru 450 + 135 + 2,5 ml
- kalibrační extrakt (International Calibration Extract, ICE-3, Labor Veritas, Zürich).

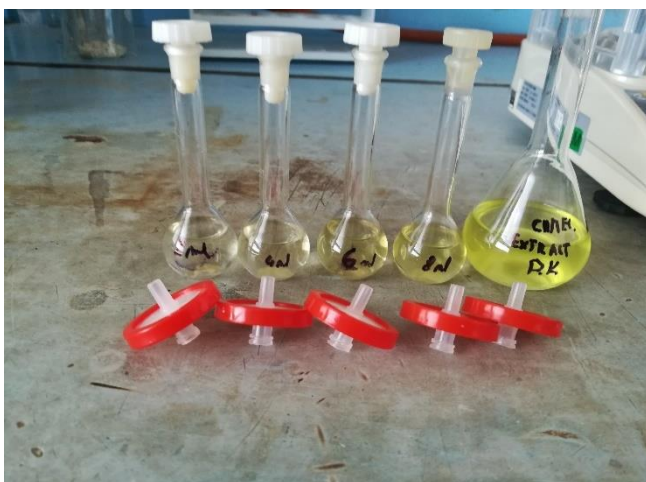
Příprava zředěné HCl (c = 0,1 mol/l)

Do 500ml odměrné baňky bylo dělenou skleněnou pipetou s použitím nasávacího balonku odměřeno 4,4 ml 35% kyseliny chlorovodíkové, odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou, zazátkována a roztok byl důkladně promíchán.

Pracovní postup

Příprava kalibračního roztoku chmelového extraktu

Kalibrační extrakt byl po vyjmutí z mrazničky vytemperován na teplotu laboratoře. Celý obsah lahvičky byl pomocí špachtle důkladně zhomogenizován a poté bylo odváženo 0,726 g kalibračního extraktu do 50ml kádinky (tato navážka obsahovala přibližně 0,5 g veškerých pryskyřic). Do kádinky bylo přidáno 30 ml methanolu p. a. a v ultrazvukové lázni byl extrakt rozpuštěn. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn po rysku methanolem. Obsah baňky byl důkladně promíchán a poté bylo odpipetováno 10 ml do 50ml odměrné baňky a opět bylo doplněno methanolem po rysku. Obsah byl znovu promíchán a bylo odpipetováno 2, 4, 6 a 8 ml do 25ml odměrných baněk. Následně byly odměrné baňky doplněny po rysku methanolem. Vzniklá kalibrační řada byla převedena do vialek a proměřena v HPLC přístroji.



Obrázek č. 5: Příprava kalibrační řady

Zdroj: foto autor

Příprava vzorku z chmelových pelet a hlávek

Chmelové pelety a hlávky byly důkladně rozemlety na vhodném mlýnku. Poté bylo naváženo 10 g namletého vzorku do skleněné láhve. Bylo přidáno 20 ml methanolu, 100 ml diethyletheru a 40 ml kyseliny chlorovodíkové. Láhev byla uzavřena a vložena na třepačku, kde byla důkladně třepána po dobu 40 minut. Po vytřepání se obsah nechal ustát po dobu

alespoň 10 minut, aby se fáze oddělily. Do 50ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml horní vyčreňené etherové fáze a baňka byla doplněna po rysku methanolem. Obsah baňky byl promíchán a pomocí injekční stříkačky s filtrem byl daný vzorek převeden do vialky. Takto připravený vzorek byl vložen do autosampleru přístroje HPLC. Vzorky bylo možné uchovat maximálně 24 hodin v chladu a ve tmě.

Chromatografické stanovení

Pro stanovení vzorků byl využit kapalinový chromatograf firmy WATERS e2695 se separačním modulem WATERSTM e2695, vysokotlaké čerpadlo, automatický dávkovač a termostat s chromatografickou kolonou 3,9 x 150 mm Cartridge, Nova-Pak® C18, 4 μ m a detektorem WATERSTM 996, PAD – detektor diodového pole (210 – 400 nm) a programem pro vyhodnocení – EMPOWER.

HPLC přístroj byl uveden do chodu, byl nastaven průtok mobilní fáze na 0,8 ml/min, UV detektor byl nastaven na 314 nm a teplota termostatu byla nastavena na 40 °C. Byla zkontrolována správná funkce celého systému. Objem nástřiku vzorku byl nastaven na 10 mikrolitrů. Chromatografická kolona byla před nástřikem 1. vzorku eluována průtokem mobilní fáze až do ustálení základní čáry, což trvalo přibližně půl hodiny. Analýza jednoho vzorku trvala cca 25 minut.



Obrázek č. 6: **Kapalinový chromatograf firmy WATERS e2695**
Zdroj: foto autor

Vyhodnocení

Obsahy jednotlivých složek hořkých kyselin se podle použité metody EBC 7.7 počítají na základě tzv. jednobodové kalibrace podle vzorce:

$$c_i = F \cdot m_{CS} \cdot c_{iC} \cdot A_i / m_S \cdot A_{iC}$$

c_i = koncentrace složky i ve vzorku vyjádřená v % hm.

F = faktor ředění = 2

m_{CS} = hmotnost kalibračního extraktu (v našem případě 0,726 g)

c_{iC} = koncentrace složky i v kalibračním extraktu vyjádřená v % hm

A_i = Plocha elučního pásu složky i ve vzorku

m_S = hmotnost vzorku (g)

A_{iC} = plocha elučního pásu i v kalibračním roztoku

V našem případě bylo místo jednobodové kalibrace využito metody vícebodové kalibrační přímky, kde bylo naměřeno celkem pět kalibračních bodů, které byly získány definovaným naředěním základního roztoku kalibračního standardu (viz str. 34) a proměřením odezvy detektoru na jednotlivých koncentračních úrovních. Příslušné regresní rovnice jsou uvedeny v následujícím textu, který se zabývá charakteristikou použitého kalibračního extraktu (Grafy č. 2 až 5).

Celkový obsah alfa kyselin byl vyjádřen součtem kohumulonu, humolonu a adhumulonů; celkový obsah beta kyselin byl vyjádřen součtem kolupulonu, lupulonu a adlupulonů. Výsledky byly vyjádřeny v hmotnostních procentech.

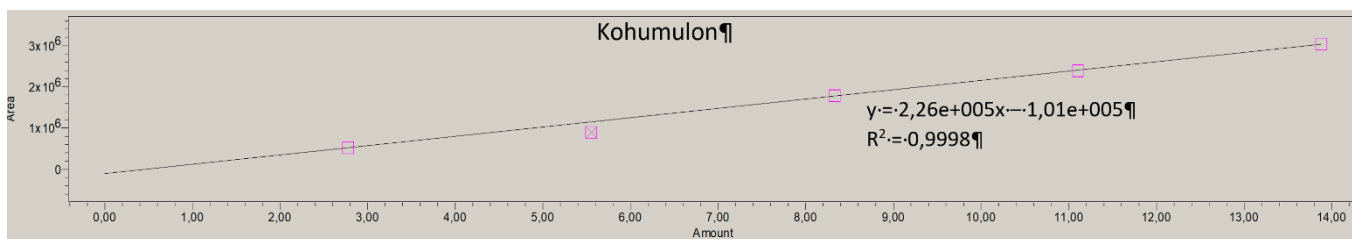
Kalibrační extrakt ICE-3 (International Calibration Extract ICE-3)

Extrakt obsahoval přesně dané koncentrace alfa a beta kyselin. ICE 3 nahrazuje ICE 2 od roku 2010 a složením se nijak neliší od předešlého standardu.

Složení kalibračního extraktu (dle certifikátu dodaného výrobcem):

Kohumulon	13,88 %	Kolupulon	13,44 %
N+Adhumulon	30,76 %	N+Adlupulon	10,84 %
Celkem alfa kyselin	44,64 %	Celkem beta kyselin	24,28 %

Skladováno při teplotě -20 °C a vypláchnuto dusíkem.

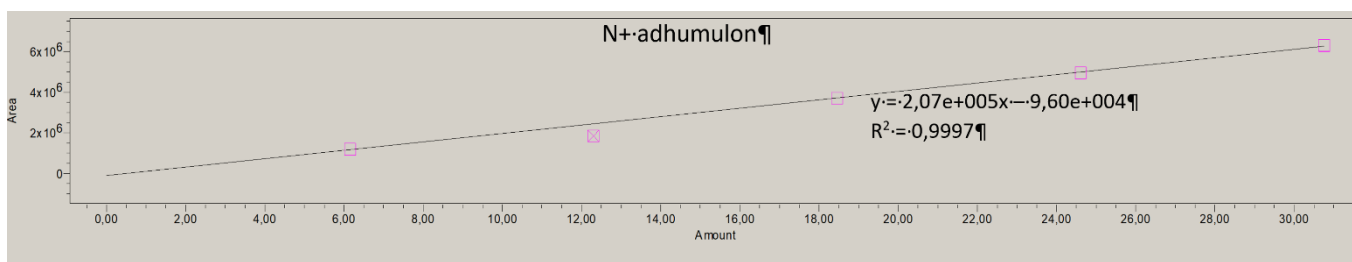


Graf č. 2: Kalibrační přímka kohumulonu

$$Y = 2,26e + 005x - 1,01e + 005$$

$$R^2 = 0,9998$$

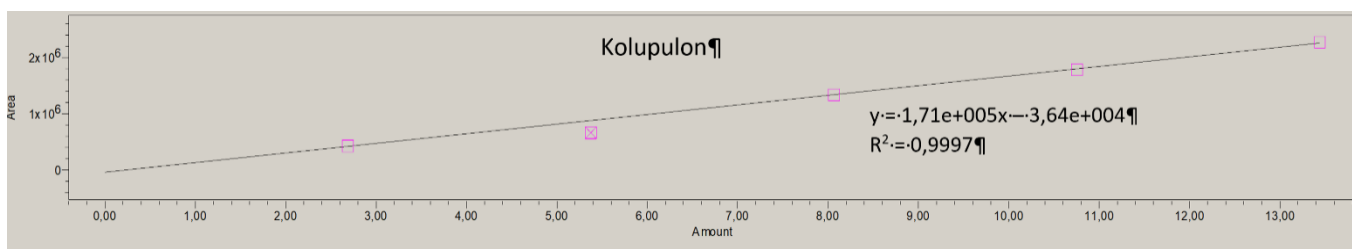
Osa x znázorňuje množství látky v procentech a osa y znázorňuje plochu píků.



Graf č 3: Kalibrační přímka humulonů + adhumulonů

$$Y = 2,07e + 005x - 9,60e + 004$$

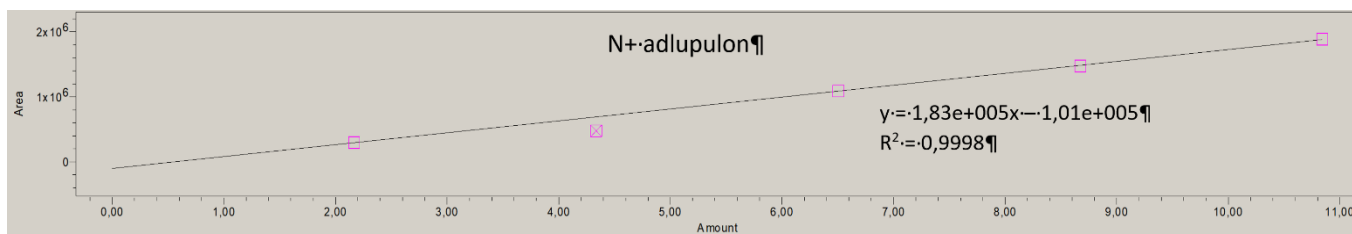
$$R^2 = 0,9997$$



Graf č. 4: Kalibrační přímka kolupulonů

$$Y = 1,71e + 005x - 3,64e + 004$$

$$R^2 = 0,9997$$



Graf č. 5: Kalibrační přímka lupulonů + adlupulonů

$$Y = 1,83e + 005x - 1,01e + 005$$

$$R^2 = 0,9998$$

Grafy č. 2 – 5 znázorňují kalibrační přímky jednotlivých analogů hořkých kyselin s příslušnými regresními rovnicemi a koeficientem determinace R^2 , který byl ve všech případech větší než 0,999. Pro každou koncentrační úroveň byla provedena dvě paralelní HPLC měření. Po statistickém vyhodnocení naměřené kalibrační přímky, byl jeden z pěti kalibračních bodů vyloučen jako odlehlý. Kalibrační přímky č. 3 a 5 znázorňují koeluci dvou analogů, které metoda HPLC nebyla schopna rozdělit.

4.2.2 Metoda spektrofotometrická UV/VIS

Princip metody

Pryskyřice z chmelových pelet byly extrahovány toluenem. Extrakt byl následně naředěn v alkalickém methanolu. Absorbance zředěného extraktu byla proměřeny ve spektrofotometru při vlnových délkách 275, 325 a 355 nm. Určení množství alfa a beta kyselin bylo provedeno dosazením hodnot absorbcí do níže uvedených regresních rovnic.

Laboratorní vybavení

Mlýnek na chmel, třepačka, analytické váhy, skleněné láhve se šroubovacím a těsně uzavíratelným víčkem o objemu 250 ml, odměrný válec o objemu 100 ml, odměrné pipety, odměrné baňky o objemu 50 ml a 100 ml, skleněné kyvety, UV-VIS spektrofotometr.

Chemikálie

- toluen p. a.,
- methanol p. a.,
- alkalický methanol.

Příprava roztoku alkalického methanolu

Do 100 ml methanolu bylo dělenou skleněnou pipetou s použitím nasávacího balonku odměřeno 0,2 ml roztoku NaOH ($c = 6,0 \text{ mol/l}$). Tento roztok musel být v den analýzy vždy čerstvý. Zásobní roztok hydroxidu sodného p. a. ($c = 6,0 \text{ mol/l}$) byl připraven smícháním 24 g NaOH se 100 ml destilované vody.

Pracovní postup

Do skleněné láhve bylo odváženo 5 g jemně namletého čerstvého vzorku a bylo přidáno 100 ml toluenu. Láhev byla uzavřena a vložena na třepačku, kde byla po dobu 30 min. třepána. Po vytřepání byl ponechán obsah láhve po dobu 5 minut ustát. Poté bylo odpipetováno 5 ml

vyčreňného toluenového extraktu do 100ml odměrné baňky, doplněno po rysku methanolem a důkladně promícháno (roztok A). Následně bylo odpipetováno 5 ml roztoku A do 50ml odměrné baňky a doplněno po rysku alkalickým methanolem (roztok B). Absorbance roztoku B byla proměřena při vlnových délkách 275, 325 a 355 nm proti slepému vzorku, který byl připraven ředěním 5 ml toluenu stejným způsobem jako vzorek chmele.

Spektrofotometrické stanovení

K analýze byl využit jednopaprskový spektrofotometr Helios Gamma s rozsahem vlnové délky 190 – 1 100 nm. Přístroj byl uveden do chodu, po chvíli byla nastavena vlnová délka 275 nm a přístroj byl vynulován oproti slepému vzorku. Následně byl proměřen vzorek. Obdobně byl též vzorek proměřen ještě při zbývajících dvou vlnových délkách. V prvních analýzách byly využity plastové kyvety. Vzhledem k tomu, že naměřené hodnoty neustále kolísaly, byly kyvety plastové nahrazeny kyvetami skleněnými, které vykazovaly lepší stálost měření. (Hodnoty naměřené na plastových kyvetách byly z dalšího zpracování výsledků vyloučeny.) Skleněné kyvety byly před měřením vždy 3x vypláchnuty měřeným vzorkem.



Obrázek č. 7: Spektrofotometr Helios Gamma U

Vyhodnocení výsledků Spektrofotometrie

Obsah alfa a beta kyselin byl stanoven dosazením změřených absorbancí do uvedených regresních rovnic:

$$\text{alfa kys.} = d * (-51,56 * A_{355} + 73,79 * A_{325} - 19,07 * A_{275})$$

$$\text{beta kys.} = d * (55,57 * A_{355} - 47,59 * A_{325} + 5,10 * A_{275})$$

(*d* je ředící faktor a rovná se 0,40).

Statistické vyhodnocení

K porovnání obou metod byl využit program Excel. V tomto programu byl vytvořen vzorec podle předlohy od autorů Eckschlager et al. (1980). Jednalo se o statistické šetření:

Studentův test t při zjišťování shodnosti výsledků na jednom analyzovaném vzorku

Hodnota Studentova kritéria pro $n_A = n_B = n$ je

$$t = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B| \sqrt{(n-1)}}{\sqrt{(s_A^2 + s_B^2)}}$$

Výsledná hodnota byla porovnána s kritickou hodnotou t_α , která byla nalezena v tabulce studentova t-rozdělení pro počet stupňů volnosti $v = 2(n-1) = 2n - 2$, kde n představuje počet paralelních stanovení provedených každou z obou metod na témže vzorku. Pokud bylo $t \geq t_\alpha$, mezi analýzami existoval statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Pokud bylo $t < t_\alpha$, mezi vzorky neexistoval statisticky významný rozdíl.

5 Výsledky

U všech jedenácti vzorků chmele, lišícími se rokem sklizně a typem chmelového přípravku (v deseti případech se jednalo o pelety a v jednom případě o chmelové hlávky), byly za pomoci metody spektrofotometrické a HPLC stanoveny alfa a beta hořké kyseliny. Zároveň byly obě metody statisticky porovnány.

Výsledky stanovení obsahu alfa a beta kyselin ve vybraném souboru odrůd chmele dvěma analytickými metodami jsou uvedeny v Tabulkách č. 5 a 6.

Tabulka č. 5: Stanovení alfa kyselin metodou spektrofotometrickou a HPLC se statistickým porovnáním

Vzorek	Rok sklizně	č. analýzy	Spektrofotometrie			HPLC			t $\alpha = 0,05$ t $\alpha = 2,132$	Statisticky významný rozdíl
			%	Průměr	RSD	%	Průměr	RSD		
Agnus	2016	1	7,077			11,243			22,412	ANO
		2	6,901	6,980	1,283	11,388	11,465	2,342		
		3	6,960			11,763				
Cascade	2016	1	4,556			5,310			8,078	ANO
		2	4,389	4,536	3,048	5,356	5,338	0,460		
		3	4,663			5,350				
Citra	2016	1	11,058			11,151			0,049	NE
		2	10,903	11,078	1,679	11,061	11,085	0,521		
		3	11,273			11,042				
Galaxy	2015	1	-0,644			1,181			112,503	ANO
		2	-0,658	-0,639	-3,349	1,165	1,173	0,663		
		3	-0,616			1,173				
Harmony	2017	1	4,968			5,333			8,431	ANO
		2	5,055	5,019	0,899	5,309	5,312	0,370		
		3	5,033			5,294				
Northern Brewer	2016	1	2,891			3,453			22,619	ANO
		2	2,911	2,887	0,895	3,453	3,467	0,734		
		3	2,860			3,497				
Sládek	2016	1	6,125			6,447			8,522	ANO
		2	6,101	6,099	0,435	6,534	6,518	0,985		
		3	6,072			6,572				
Triskel	2016	1	1,595			2,125			19,502	ANO
		2	1,532	1,568	2,071	2,164	2,156	1,284		
		3	1,577			2,179				
Žatecký poloraný červeňák	2016	1	1,060			1,669			18,329	ANO
		2	1,130	1,086	3,518	1,629	1,647	1,231		
		3	1,069			1,643				
Žatecký poloraný červeňák	2017	1	2,482			2,510			2,692	ANO
		2	2,373	2,413	2,497	2,562	2,560	1,881		
		3	2,383			2,606				
Žatecký poloraný červeňák (hlávky)	2018	1	2,668			2,708			1,778	NE
		2	2,646	2,673	1,135	2,731	2,715	0,497		
		3	2,706			2,707				

(t – vypočtená hodnota Studentova kritéria, t_{α} – kritická hodnota tabulková pro stupeň volnosti 4, α – hladina významnosti, RSD – relativní směrodatná odchylka)

Nejvyšší relativní směrodatná odchylka vzorků měřených spektrofotometrickou metodou byla u alfa kyselin 3,518 % a to u vzorku ŽPČ 2016. U beta kyselin byla nejvyšší relativní směrodatná odchylka 4,306 % u vzorku Citra. Nejvyšší relativní směrodatná odchylka vzorků měřených metodou HPLC byla u alfa kyselin 2,343 u vzorku Agnus. U beta kyselin byla nejvyšší relativní směrodatná odchylka 3,221 u vzorku Agnus. U statistického porovnání byla stanovena nulová hypotéza takto: průměry obsahů alfa, resp. beta kyselin u obou metod jsou shodné. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$, tj. pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy, i přestože platí. Tabulková hodnota t_α pro stupeň volnosti $\nu = 4$ tj. $(2n-2)$ byla 2,132. Vypočtené hodnoty t byly porovnány s t_α a následně bylo stanoveno, zda existuje či neexistuje statisticky významný rozdíl mezi oběma metodami. Z Tabulky č. 5 je patrné, že metoda HPLC vykazovala ve většině případů vyšší obsahy alfa kyselin než metoda spektrofotometrická. U vzorku Galaxy, který byl sklizen v roce 2015, vykazovala metoda spektrofotometrická záporné hodnoty po dosazení naměřených hodnot absorbancí do regresních rovnic. Jelikož vzorek chmele vykazoval záporné hodnoty, byl analyzován znovu se třemi opakováními a se shodným výsledkem jako u první analýzy. V tomto případě se tedy metoda spektrofotometrická ukázala jako nevhodná. U dvou odrůd nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. U vzorku ŽPČ (hlávky) sklizené roku 2018 nebyly obsahy alfa kyselin u obou metod statisticky rozdílné. To samé platí i u vzorku Citra sklizeného roku 2016.

V Tabulce č. 6 je patrné, že obsahy beta kyselin stanovené metodou spektrofotometrickou jsou ve většině případů vyšší než metodou HPLC. Vypočtené hodnoty t byly porovnány s t_α a následně bylo stanoveno, zda existuje či neexistuje statisticky významný rozdíl mezi oběma metodami. Pouze u jednoho vzorku nebyl statisticky významný rozdíl mezi oběma metodami, a to u vzorku Galaxy, sklizeného roku 2015. U nejčerstvější odrůdy ŽPČ (hlávky) sklizené roku 2018 byl rozdíl v obsahu beta kyselin mezi oběma metodami statisticky významný, na rozdíl od alfa kyselin, kde rozdíl statisticky významný nebyl.

Tabulka č. 6: Stanovení beta kyselin metodou spektrofotometrickou a HPLC
se statistickým porovnáním

Vzorek	Rok sklizně	č. analýzy	Spektrofotometrie			HPLC			t $\alpha = 0,05$ t $\alpha = 2,132$	Statistický významný rozdíl
			%	Průměr	RSD	%	Průměr	RSD		
Agnus	2016	1	4,903			6,397			9,840	ANO
		2	5,055	4,942	2,025	6,497	6,565	3,211		
		3	4,867			6,801				
Cascade	2016	1	6,647			5,778			28,540	ANO
		2	6,708	6,665	0,562	5,819	5,801	0,358		
		3	6,640			5,804				
Citra	2016	1	2,908			3,229			3,333	ANO
		2	3,021	2,900	4,306	3,186	3,200	0,776		
		3	2,772			3,187				
Galaxy	2015	1	5,024			5,038			1,278	NE
		2	5,016	5,032	0,410	4,916	4,973	1,239		
		3	5,055			4,965				
Harmony	2017	1	6,503			5,768			32,689	ANO
		2	6,513	6,510	0,092	5,725	5,731	0,578		
		3	6,514			5,702				
Northern Brewer	2016	1	3,226			2,713			7,129	ANO
		2	3,399	3,277	3,230	2,706	2,726	1,020		
		3	3,207			2,757				
Sládek	2016	1	4,968			4,480			6,533	ANO
		2	5,097	5,088	2,279	4,525	4,522	0,881		
		3	5,200			4,560				
Triskel	2016	1	5,556			4,795			16,151	ANO
		2	5,584	5,556	0,509	4,846	4,849	1,136		
		3	5,527			4,905				
Žatecký poloraný červeňák	2016	1	3,777			3,225			15,140	ANO
		2	3,725	3,739	0,908	3,150	3,180	1,247		
		3	3,714			3,164				
Žatecký poloraný červeňák	2017	1	4,427			3,663			9,136	ANO
		2	4,473	4,439	0,693	3,854	3,772	2,610		
		3	4,415			3,799				
Žatecký poloraný červeňák (hlávky)	2018	1	2,768			2,566			3,864	ANO
		2	2,885	2,794	2,897	2,584	2,571	0,428		
		3	2,730			2,563				

(t – vypočtená hodnota Studentova kritéria, t_{α} – kritická hodnota tabulková pro stupeň volnosti 4, α – hladina významnosti, RSD – relativní směrodatná odchylka)

6 Diskuze

Analytickým metodám pro stanovení obsahu alfa kyselin ve chmelu a chmelových produktech je v odborné veřejnosti věnována značná pozornost. V pivovarském průmyslu je znalost o obsahu alfa kyselin zásadní informací při zajišťování hořkých látek pro plánování výstavu piva. Také při kontraktačních jednáních, před zpracováním chmele na pelety nebo extrakty je vždy nutné přesně specifikovat metodu, kterou bude obsah alfa hořkých kyselin ve chmelu stanoven. Rovněž i pěstitele chmele zajímá hladina alfa kyselin, a to z cenových důvodů, protože nízký nebo naopak vysoký obsah alfa kyselin je spojen s cenovou srážkou nebo bonusem, neboť obsah alfa kyselin v chmelových hlávkách určité odrůdy závisí nejen na počasí, ale také na stáří porostů (Krofta et al. 2017c).

Nejdůležitější kvalitativní parametr chmele, obsah α -kyselin, lze stanovit několika způsoby s odlišným výsledkem. Hodnocení obsahu α -kyselin v českých chmelech se provádí trojfázově s postupně rostoucí hladinou exaktnosti. Chmelařský institut v Žatci dělá předsklizňové prognózy pro ŽPČ. Analytickou metodou pro stanovení předsklizňových odhadů je dle ČSN 46 2520-15 konduktometrická hodnota chmele. Naopak Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Praze provádí sklizňové prognózy jak pro ŽPČ, tak i hybridní odrůdy, které ale též provádí na jiném souboru vzorků Chmelařský institut Žatec. Tyto prognózy jsou zpracovávány z výsledků analýz metodou kapalínové chromatografie podle EBC 7.7. Hodnocení skutečných obsahů po skončeném nakupování chmele provádí společně Chmelařské družstvo a Chmelařský institut Žatec v měsíci listopadu, na základě analýzy veškerých nákupních vzorků chmele z celé sklizně metodou konduktometrickou dle ČSN. Farmářské vzorky od jednotlivých pěstitelů se analyzují metodou HPLC (Krofta et al. 2012; Krofta et al. 2017c).

Je zcela legitimní, že určení obsahu α -kyselin několika metodami ve shodných vzorcích, díky rozdílnému způsobu přípravy těchto vzorků (rozdílná rozpouštědla, způsob vyluhování a míchání, analytické stanovení), poskytuje odlišné výsledky. Krofta (2008) dále uvádí, že naprosto přesný obsah alfa kyselin lze zjistit pouze HPLC metodou EBC 7.7 a zhruba shodné výsledky, ale pouze u čerstvých chmelů, poskytují také metody ČSN 46 2520-15, EBC 7.7 a metoda spektrofotometrická. Opět to ale nemusí platit pro všechny odrůdy. Pro starší chmele shodnost ve výše uvedených metodách již neplatí, protože stárnutím chmele se rozdílly výsledků mezi dílčími metodami prohlubují.

Experimentální část této diplomové práce byla zaměřena na porovnání dvou základních analytických metod pro stanovení alfa- a beta-hořkých kyselin v chmelových peletách, resp. hlávkách, a to metody HPLC (podle EBC 7.7) a metody spektrofotometrické (podle ASBC, Hops-6). Obě metody byly testovány na deseti vzorcích přesně specifikovaných chmelových pelet (9 odrůd) a na jednom vzorku chmelových hlávek (Žatecký poloraný červeňák 2018).

Hlavním cílem práce bylo prokázat, zda metody vykazují shodných výsledků.

Shodnost výsledků obou metod u stanovení alfa kyselin se podařilo prokázat u dvou vzorků a to vzorek Citra (2016) a ŽPČ (2018) hlávky. U ostatních analyzovaných vzorků nebyla shodnost výsledků statisticky prokázána.

U beta kyselin se shodnost výsledků obou metod prokázala pouze u jednoho vzorku Galaxy (2015). Zde je třeba připomenout, že obsah a složení jednotlivých pryskyřic se postupem času mění. Změny jsou provázeny výrazným růstem absorbancí methanolového extraktu chmele při vlnové délce 275 nm (α a β -kyseliny) a změnou poměru absorbancí měřených při 275 a 325 nm (β -kyseliny) na spektrofotometru (Krofta 2008). Je tedy možné, vzhledem k tomu, že alfa kyseliny u tohoto vzorku vyšly záporně, že u beta kyselin se pouhou shodou náhod výsledky shodovaly s HPLC. U ostatních vzorků ani u těch nejčerstvějších se výsledky obou metod statisticky neshodovaly.

Pokud se ale podíváme na vybrané vypočtené hodnoty t , které se porovnávají s tabulkovou hodnotou, a následně se vyhodnocuje, zda existuje či neexistuje statisticky významný rozdíl mezi oběma metodami, je u určitých vzorků tato hodnota překročena jen mírně, na rozdíl od ostatních vzorků. U alfa kyselin se jedná o vzorek chmele ŽPČ sklizený roku 2017, kde rozdíl mezi hodnotou $t = 2,692$ a hodnotou $t_{\alpha} = 2,132$ není příliš značný.

U beta kyselin se jedná o vzorky chmelů Citra a ŽPČ (hlávky), kde hodnota t také není příliš rozdílná od hodnoty tabulkové. Vzorky ŽPČ sklizené roku 2017 a 2018 jsou nejčerstvější analyzované vzorky. To značí jistý trend u metody spektrofotometrické, která je využívána pro analýzu čerstvých chmelů po sklizni. Na druhou stranu vzorek chmele Citra je sice sklizený roku 2016, ale jedná se o odrůdu, která má vysoký obsah alfa kyselin. Je tedy možné, že metoda spektrofotometrická je schopná vykazovat podobné výsledky s metodou HPLC, pokud se jedná o odrůdy s vysokým obsahem alfa kyselin.

Z dostupných internetových zdrojů nebylo možné dohledat články zabývající se porovnáním metody HPLC a metody spektrofotometrické pro stanovení obsahu alfa hořkých kyselin v chmelech. Proto nebylo možné, porovnat dosažené výsledky s výsledky jiných autorů.

Pro stanovení obsahu hořkých kyselin v chmelových produktech a pro porovnání analytických metod, autoři používají ve většině případů rutinní metodu HPLC, výkonnější UHPLC a metody konduktometrické.

Mikyška & Jurková (2018) uvádějí, že analýzy celého souboru vzorku jsou prováděny vysoce specifickým stanovením alfa a beta hořkých kyselin a jejich analogů metodou HPLC podle EBC. K dispozici jsou výsledky sledování kvality chmele touto metodou v České republice za dvacet pět let, protože probíhají od roku 1994. Hodnoty stanovené různými metodami nejsou zcela srovnatelné. Výsledky konduktometrického stanovení bývají zpravidla vyšší než výsledky analýz metodou HPLC, protože při konduktometrickém stanovení jsou uplatňovány i další složky chmelových pryskyřic.

Jurková et al. (2012) konstatují, že požití metody UHPLC dává při zachování způsobu detekce, kalibrace a kvantifikace srovnatelné výsledky s metodou HPLC, a proto lze tyto dvě techniky používat, aniž by byla ohrožena správnost výsledků.

Pokud porovnáme výsledky chmelové sklizně v roce 2016 odrůdy ŽPČ, Mikyška et al. (2017) uvádějí, že odebrané vzorky čerstvě sklizeného usušeného chmele ŽPČ byly analyzovány na obsah alfa hořkých kyselin metodou HPLC a průměrný obsah byl 3,35 % hmotnostních v sušině. Mnou analyzovaný vzorek stejnou metodou vykazoval obsah podstatně nižší, a to 1,647 %. Stejná odrůda sklizená o rok později vykazovala obsah 2,81 % hmotnostních v sušině. Mnou analyzovaný vzorek obsahoval 2,560 % hmotnostních. Zde již nebyl rozdíl tak markantní. K rozdílným hodnotám došlo vlivem délky skladování a způsobem skladování.

7 Závěr

Cíl diplomové práce, porovnat dvě základní analytické metody pro stanovení alfa- a beta-hořkých kyselin v chmelových peletách, a to metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie a metodou spektrofotometrickou, byl splněn. Testovány byly jak vzorky chmelových pelet definovaného původu, tak i vzorek chmelových hlávek. Je nutné podotknout, že bylo zkoumáno 11 vzorků chmele ve třech opakováních. Z dosažených výsledků vyplývá, že metoda HPLC je ke stanovení hořkých kyselin v chmelu vhodnější než metoda spektrofotometrická. U metody spektrofotometrické bylo prokázáno, že není vhodná pro měření obsahu hořkých kyselin u starších chmelů, protože se stářím chmele se mění tvar absorpčních spekter chmelových pryskyřic. U čerstvě sklizeného chmele vykazovala tato metoda podobné výsledky jako metoda HPLC, ale pouze u α -kyselin. Obsahy β -kyselin se u čerstvě sklizeného chmele rovněž lišily.

Hypotéza, že testované analytické metody poskytují srovnatelné výsledky, nebyla u většiny vzorků prokázána, protože v celé řadě případů existoval statisticky významný rozdíl v obsahu hořkých kyselin.

V literární rešerši byly zmíněny starší i další nově vyvinuté metody pro stanovení obsahu alfa a beta hořkých kyselin ve chmelech. Metodu HPLC lze tedy i nadále považovat za prioritní analytickou metodu pro stanovení hořkých kyselin v chmelových produktech.

I přesto, že obsah alfa hořkých kyselin není jediným měřítkem pro posuzování kvality chmelových extraktů, je významným ukazatelem rozhodujícím o jejich technologickém využití a značně ovlivňuje zejména jejich cenu.

8 Seznam literatury

- Almaguer C, Schonberger C, Gastl M, Arendt EK, Becker T. 2014. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing* **120**(4):289-314.
- Altová M. 2018. Situační a výhledová zpráva Chmel, pivo. Ministerstvo zemědělství, Praha. ISBN 978-80-7434-486-2.
- Barborka V. 2017. České chmelařství v přehledech ÚKZÚZ. Pages 260-275 in Kovařík M, editor. *Chmelařská ročenka 2017*. VÚPS, Praha. ISBN 978-80-86576-75-6.
- Barth S, Schönberger C (Eds.) 2014. *The Hop Aroma Compendium. A Flavour Guide Volume 1-3*. Fachverlag Hans Carl. Nuremberg.
- Basařová G, Šavel J, Basař P, Lejsek T. 2010. *Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva*. VŠCHT, Praha. 904 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
- Bertelli D, Brighenti V, Marchetti L, Reik A, Pellati F. 2018. Nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography techniques for the characterization of bioactive compounds from *Humulus lupulus* L. (hop) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **410**(15):3521–3531.
- Česlová L, Holčapek M, Fidler M, Drštičková J, Lísa M. 2009. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**:7249-7257.
- ČESKO. Zákon č. 97/1996 Sb. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2019 [cit. 9. 4. 2019]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1996-97>
- Eckschlager K, Horsák I, Kodejš Z. 1980. *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. SNTL Praha.
- Farag MA, Porzel A, Schmidt J, Wessjohann LA. 2012. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics* **8**:492-507.
- Forejtová M. 2007. Tisková zpráva Svazu pěstitelů chmele České republiky ze dne 20. 8. 2007: Informace o českých chmelařských oblastech. ÚZEI. Available from <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=118&ch=1&typ=1&val=62697> (accessed October 2018).

- Franiou R, Mussche R. 1974. Quantitative determination of hop bitter substances and their derivatives in hop extracts by thin layer chromatography. *Journal of the Institute of the Brewing* **80**:59-67
- Glendinning P. 2009. Současný stav pěstování chmele na nízké konstrukci ve Velké Británii. *Chmelařství* 5-6/**2009**:46-47.
- Chmelařský institut s.r.o. 2012. Atlas českých odrůd chmele Czech hops varieties. Chmelařský institut s.r.o., Žatec. ISBN 978-80-87357-11-8.
- Jurková M, Čejka P, Olšovská J. 2012. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 3. Porovnání HPLC a UHPLC stanovení α - a β -hořkých kyselin. *Kvasný průmysl* **58**(6):166-170.
- Karabín M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P. 2015. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances* **33**(6): 1063–1090.
- Kořen J, Ciniburk V, Podsedník J, Rybka A, Veselý F. 2008. Sušení chmele na pásových sušárnách. *Metodika pro praxi. Časopis Chmelařství. Petr Svoboda.* ISBN 978-80-86836-54-6.
- Krofta K. 2008. Hodnocení kvality chmele. *Metodika pro praxi. Chmelařský institut, s.r.o. Žatec.* ISBN 978-80-86836-84-3.
- Krofta K, Mikyška A. 2014. Beta kyseliny chmele, význam a využití. *Kvasný průmysl* **60**(4):96-105.
- Krofta K, et al. 2017a. Hodnocení kvalitativních parametrů chmele při sušení a stárnutí. *Certifikovaná metodika. Chmelařský institut, s.r.o. Žatec a ČZU.* ISBN 978-80-86836-16-4.
- Krofta K, Mikyška A, Jurková M, Mravcová L, Vondráčková P. 2017b. Stanovení hořkých látek v chmelu – vliv ročníku a stáří chmele. *Kvasný průmysl* **63**(5):241–247.
- Krofta K, Mikyška A, Jurková M, Klapal I, Mravcová L, Vondráčková P. 2017c. Hodnocení obsahu hořkých látek v českých chmelech z ročníkové sklizně. *Certifikovaná metodika. Chmelařský institut s. r. o. Žatec a Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha.* ISBN 978–80–86836–15-7.
- Krofta K, Mikyška A, Tichá J. 2012. Ročníkové prognózy obsahu alfa kyselin v českých chmelech. *Kvasný průmysl* **58**(9):256–263.
- Krofta K, Tichá J. 1997. K problematice analytického stanovení obsahu α -hořkých kyselin ve chmelu. *Kvasný průmysl* **43**(7-8):196-199.

- Kroupa, F. 2017. Chmelařská ročenka. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha. ISBN 978-80-86576-75-6.
- Mellors JS, Jorgenson J. 2004. Use of 1.5- μm Porous Ethyl-Bridged Hybrid Particles as a Stationary-Phase Support for Reversed-Phase Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **76**(18): 5441-5450.
- Mikyška a, Dušek M, Jurková M. 2017. Hodnocení obsahu α - a β -hořkých kyselin ve sklizni českých chmelů v roce 2016. *Kvasný průmysl* **63**(4):190-198.
- Mikyška A, Jurková M. 2018. Hodnocení obsahu α - a β -hořkých kyselin ve sklizni českých chmelů v roce 2017. *Kvasný průmysl* **64**(3):122–130.
- Mikyška A, Jurková M. 2019. Analysis and prognosis of bitter acids content in Czech hop varieties – year 2018 and long-term comparisons and trends. *Kvasný průmysl* **65**(1):23-31.
- Mikyška A, Krofta K, Hašková D, Čulík J, Čejka, P. 2012. Vliv skladování chmelových pelet na kvalitu piva. *Kvasný průmysl* **58**(5):148-154.
- Ministerstvo zemědělství. 2017. Situační a výhledová zpráva Chmel, pivo – prosinec 2017. Ministerstvo zemědělství, Praha. ISBN 978-80-7434-409-1.
- Moco S, Bino RJ, De Vos RCH, Vervoort J. 2007. Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **26**:855–866.
- Nesvadba V, et al. 2013. Vývoj a tradice českých odrůd chmele. Chmelařský institut s.r.o. Žatec. ISBN 978-80-87357-11-8.
- Nesvadba V. 2016. Tvorba nových odrůd chmele zakrslého typu. *Kvasný průmysl* **62**(6):166–172.
- Nešpor J, Hanko J, Karabín M, Jelínek L, Dostálek P. 2017. Prenylované flavonoidy jako cenné biologicky aktivní látky chmele. *Kvasný průmysl* **63**(4):164-172.
- Neve, RA. 1991. Hops. Chapman and Hall, London. ISBN 978-94010.
- Olšovská J, Jurková M. 2012. Nové trendy v kapalinové chromatogramii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. *Kvasný průmysl* **58**(2):30-35.
- Olšovská J, Krofta K, Jandovská V, Patzak J, Štěrba K. 2016. Metody pro ověřování autenticity odrůd chmele – účinný nástroj proti falzifikaci. *Kvasný průmysl* **62**(10):294–305.
- Ottův slovník naučný ilustrovaná encyklopedie obecných vědomostí. 12. díl, CH – Sv. Jan.: J. Otto. Praha, 1897.

Patzak J, Krofta K, Nesvadba V, Ježek J, Klapal I. 2017. „4. Kvalita českých chmelů ze sklizně 2016“; „5. Vliv průběhu počasí na růst a vývoj chmele v roce 2016“; „6. Průběh počasí v roce 2017“; „7. Uplatnění závlahy chmelnic v chmelařských oblastech“; „8. Šlechtění chmele v ČR“; „9. Šlechtění chmele pro nízké konstrukce“ a „10. Ekologické pěstování chmele“. Pages 30-45 in Altová M, editor. Situační a výhledová zpráva CHMEL, PIVO – prosinec 2017. Ministerstvo zemědělství, Praha.

Pluháčková H, Ehrenbergerová J, Kretek P, Kocourková B. 2011. Chmelové silice ve vybraných odrůdách z různě starých chmelnic. *Kvasný průmysl* **57**(7-8):266-271.

Prencipe FP, Brighenti V, Rodolfi M, Mongelli A, dall'Asta Ch, Ganino T, Bruni R, Pellati F. 2014. Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus* L. *Journal of Chromatography A* **1349**:50-59.

Prugar J, et al. 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha. ISBN 978-80-86576-28-2.

Rybáček V, et al. 1980. Chmelařství. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. 425 s.

Sommella E, Pagano F, Salviati E, Chieppa M, Bertamino A, Manfra M, Sala M, Novellino E, Campiglia P. 2018. Chemical profiling of bioactive constituents in hop cones and pellets extracts by online comprehensive two-dimensional liquid chromatography with tandem mass spectrometry and direct infusion Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **41**(7):1548 – 1557.

Swartz ME. 2005. UPLC: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography* **28**(7/8):1253-1263.

Szucs R, Vindevogel J, Everaert E, De Cooman L, Sandra P, De Keukeleire D. 1994. Separation and quantification of all main hop acids in different hop cultivars by microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of the Institute of Brewing* **100**(4):293-296.

Šnobl J, Pulkrábek J. 2002. Základy rostlinné produkce. 2. vydání. ČZU, Praha. ISBN 80-213-0924-5.

Štranc P, Štranc J, Holý K, Štranc D, Sklenička P. 2012. Pěstování vzrůstných odrůd chmele v nízké konstrukci. Kurent, České Budějovice. ISBN 978-80-87111-33-8.

Taniguchi Y, Matsukura Y, Taniguchi H, Koizumi H, Katayama M. 2015. Development of preparative and analytical methods of the hop bitter acid oxide fraction and chemical properties of its components. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **79**(10):1684–1694.

Tisková zpráva Svazu pěstitelů chmele České republiky ze dne 9. 8. 2018: Pěstování chmele v roce 2018. Svaz pěstitelů chmele České republiky. Available from http://www.czhops.cz/index.php?option=com_content&view=section&layout=blog&id=1&Itemid=28&lang=cs (accessed Januar 2019).

Tisková zpráva ÚKZÚZ ze dne 22. 8. 2018: Aktuální plochy chmelnic v České republice. eAGRI. Available from http://eagri.cz/public/web/ukzuz/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2018_plochy-chmelnic-v-cr-2018.html (accessed Januar 2019).

Úřední věstník Evropské unie. 2006. Nařízení komise (ES) č. 1850/2006, kterým se stanoví prováděcí pravidla pro vydávání ověřovacích listin původu pro chmel a chmelové výrobky. Komise Evropských společenství. 16 s. Dostupné také z: <http://www.chizatec.cz/download/page5021.pdf>

Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K, Haegeman G, De Keukeleire D, Heyerick A. 2009. Hop (*Humulus lupulus*) – Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *Journal of Natural Products* **72**:1220-1230.

Wain J, Baker CD, Laws DRJ. 1977. Deterioration of pelleted hop powders during long-term storage. *Journal of the Institute of Brewing* **83**:235-240.

Winter GT, Wilhide JA, LaCourse WR. 2016. Molecular Ionization-Desorption Analysis Source (MIDAS) for Mass Spectrometry: Thin-Layer Chromatography. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **27**(2):352-8.

Winter GT, Wilhide JA, LaCourse WR. 2017. Analysis of hop acids by thin-layer chromatography and the Molecular Ionization Desorption Analysis Source (MIDAS) for mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **422**:74-79.