



Chmelařský institut s. r. o.

Karel Krofta

Hodnocení kvality chmele



Metodika pro praxi

4/08



Chmelařský institut s. r. o.



HODNOCENÍ KVALITY CHMELE

Metodika pro praxi

Karel Krofta

Výstup z výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy
MSM1486434701 „Výzkum a regulace stresových faktorů chmele“

2008

Hodnocení kvality chmele

Metodika pro praxi 4/2008

Autor: Karel Krofta

Vydal: Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

Fotografie: Karel Krofta

Jazyková úprava: Patricie Buchtová, Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Grafická úprava a sazba: Digon s.r.o., Louny

Tisk: Digon s.r.o., Louny

Počet kopií: 500

ISBN 978-80-86836-84-3

Metodika hodnocení kvality chmele

Autor

Ing. Karel Krofta, Ph.D.

Recenzenti

- Ing. Vladimír Barborka* Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ)
Brno, odbor trvalých kultur, vedoucí oddělení chmele
a registru chmelnic
- Ing. Jaroslav Urban* Chmelařství, družstvo Žatec, závod Žatecký chmel,
vedoucí provozu
- Ing. Alexandr Mikyška* Výzkumný ústav pivovarský a sladařský (VÚPS) Praha,
vědecký sekretář

Jazyková úprava

Patricie Buchtová

Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Metodika je schválena Ministerstvem zemědělství, Odborem vědy a výzkumu pod číslem jednacím čj. 44218/2008-18020 ze dne 19.12.2008.

Metodika pro praxi

„Hodnocení kvality chmele“

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| I. | CÍL METODIKY A DEDIKACE | 5 |
| II. | VLASTNÍ POPIS METODIKY | 6 |
| 1. | OBECNÁ ČÁST | 6 |
| 1.1 | Certifikace chmele | 6 |
| 1.2 | Tržní řád chmele | 8 |
| 2. | ANALYTICKÁ ČÁST | 11 |
| 2.1 | Vzorkování chmele | 11 |
| 2.2 | Mechanické zkoušky chmele | 13 |
| 2.2.1 | Stanovení obsahu cizích a chmelových příměsí | 14 |
| 2.2.2 | Stanovení obsahu semen v hlávkovém chmelu | 15 |
| 2.2.3 | Rozplevení hlávek | 17 |
| 2.3 | Stanovení vlhkosti chmele | 18 |
| 2.4 | Alfa kyseliny a jejich analytické stanovení | 19 |
| 2.4.1 | Stanovení konduktometrické hodnoty chmele dle ČSN 462520-15 | 23 |
| 2.4.2 | Stanovení konduktometrické hodnoty chmele dle EBC 7.4 | 24 |
| 2.4.3 | Stanovení konduktometrické hodnoty chmele dle EBC 7.5 | 26 |
| 2.4.4 | Stanovení alfa a beta kyselin kapalinovou chromatografií dle EBC 7.7 | 28 |
| 2.4.5 | Stanovení alfa a beta kyselin spektrofotometricky dle ASBC Hops-6 | 32 |
| 2.4.6 | Index skladování chmele | 33 |
| 2.4.7 | Porovnání metod stanovení alfa kyselin | 34 |
| 2.5 | Stanovení obsahu a složení chmelových silic | 35 |
| 2.6 | Nežádoucí a cizorodé složky chmele | 42 |
| 2.6.1 | Stanovení obsahu dusičnanů ve chmelu kapalinovou chromatografií | 42 |
| 2.6.2 | Stanovení obsahu reziduí pesticidů | 45 |
| III. | ZDŮVODNĚNÍ NOVÝCH METODICKÝCH POSTUPŮ | 47 |
| IV. | ZÁVĚR A POPIS UPLATNĚNÍ | 47 |
| V. | SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY | 48 |
| VI. | PUBLIKACE, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE | 50 |
| VII. | ABSTRAKT, ABSTRACT | 50 |

Metodika pro praxi

„HODNOCENÍ KVALITY CHMELE“

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE

Hodnocení kvality zemědělských produktů, jako základních surovin pro výrobu potravin, je trvale věnována velká pozornost. To v plné míře platí i pro chmel, přestože se nejedná o přímou potravinářskou surovinu. Kvalita chmele se hodnotí již při sklizni, při zpracování suroviny na chmelové výrobky i bezprostředně před dodáním k odběratelům, kterými jsou převážně domácí i zahraniční pivovary. V každé fázi hodnotícího systému je kladen důraz na jiné parametry. Při sklizni a zpracování jsou nejdůležitějšími ukazateli vlhkost, obsah příměsí a alfa kyselin. Pivovary, které mají kvalitativní parametry chmele uvedeny v systémech jakosti, požadují kromě obsahu alfa kyselin deklaraci obsahu řady nežádoucích a cizorodých látek, jako jsou například dusičnany, rezidua pesticidů, těžké kovy a v poslední době i mykotoxiny. Pro deklaraci odrůdové čistoty chmele lze použít další kvalitativní ukazatele, jako jsou obsah a složení chmelových silic, prenylflavonoidů a polyfenolů. Uvedená hlediska se také používají pro hodnocení vlastností a kvality novošlechtěných chmelů. V metodice jsou popsány nejdůležitější analytické metody používané k hodnocení kvality chmele, uvedeny jejich přednosti, nedostatky a omezení. Důraz je kladen zejména na hodnocení obsahu alfa kyselin, nejdůležitějšího kvalitativního parametru chmele, který lze stanovit několika způsoby s odlišným výsledkem.

Cílem předložené metodiky je uceleným způsobem specifikovat principy, postupy a metody hodnocení kvality chmele a chmelových výrobků v několika fázích od sklizně do zpracování na chmelové výrobky a prodej zákazníkům v návaznosti na platné právní předpisy. Metodika byla vypracována jako součást řešení výzkumného záměru MSM1486434701 „Výzkum a regulace stresových faktorů chmele“

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Obecná část

1.1 CERTIFIKACE CHMELE

Chmel je komoditou, která podléhá certifikaci. Certifikací, tj. označováním a ověřováním chmele, je v České republice pověřen Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně (dále ÚKZÚZ), který má zřízena tři certifikační centra – známkovny chmele v Žatci, Úštěku a Tršicích (Barborka, 2008). Prováděcí pravidla pro certifikaci chmele a chmelových produktů stanovují tyto právní normy:

- Nařízení Komise (ES) č.1850/2006, kterým se stanoví prováděcí pravidla pro certifikaci chmele a chmelových produktů, platné od 1. dubna 2007
- Nařízení Rady (ES) č. 1234/2007, kterým se stanoví společná organizace zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty
- Zákon č. 97/1996 Sb., o ochraně chmele ve znění zákona č. 322/2004 Sb., s účinností od 28.5.2004
- Prováděcí vyhláška č.325/2004 Sb. k zákonu o ochraně chmele, platná od 28.5.2004

Chmelové hlávky musí splňovat minimální úroveň znaků jakosti již od první fáze uvádění na trh. Minimální kvalitativní požadavky hlávkového chmele dle Nařízení Komise (ES) č. 1850/2006 jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Minimální požadavky pro uvádění chmelových hlávek na trh

| Vlastnosti | Popis | Maximální obsah (% hm.) | |
|-------------------|--|-------------------------|------------------|
| | | Upravený chmel | Neupravený chmel |
| a) Vlhkost | Obsah vody | 12 | 14 |
| b) Listy a stopky | Části listů z úponků, stopky listů nebo hlávek; za stopku se považují stopky hlávek dlouhé nejméně 2,5 cm. | 6 | 6 |
| c) Chmelový odpad | Malé částičky tmavě zelené až černé barvy vzniklé při strojové sklizni, které obvykle nepocházejí z hlávky; částičky jiných odrůd chmele než jsou odrůdy, pro které se vydají ověřovací listiny původu, mohou představovat až 2 % hmotnosti. | 3 | 4 |
| d) Obsah pecek | Zralé plody hlávek | 2 | 2 |

Zdroj: Nařízení Komise (ES) č. 1850/2006

Certifikaci chmele dělíme do dvou stupňů:

1. **Označování** chmele se provádí přímo u pěstitelů na jednotlivých farmách. Pěstitel je povinen zvážit každý obal s chmelem a zapsat jej do „Prohlášení producenta“ o počtu a hmotnosti označených obalů. Jejich seznam pěstitel vede odděleně podle katastrálních území a odrůd chmele. Označovací materiál a formuláře jsou dodávány jednotně všem pěstitelům chmele v ČR. Na základě těchto údajů se provádí sumarizace množství sklizeného chmele v ČR.

2. **Ověřování** chmele a chmelových produktů většinou probíhá ve zpracovatelských zařízeních pro chmel, pod dohledem pracovníků ÚKZÚZ, kontrolorů chmele. Kontrolor neustále dohlíží na celý proces - prvotní evidenci, vysypání chmele do zpracovatelského zařízení, úpravu a konečné zabalení hotového produktu (granule, lisovaný chmel). Konečné balení opatří ověřovací značkou, evidenčním číslem a zaplombuje nebo zapečetí. Část chmele se ověřuje tzv. v originále, protože tento chmel jde na zpracování do zahraničí. Zůstává v obalech od pěstitelů, na kterých se uvedou potřebné údaje. Na takto ověřený chmel pracovníci příslušné Známkovny chmele vydají ověřovací listinu – certifikát (obr. 1).



Obr. 1 Ověřovací listina chmele

1.2 TRŽNÍ ŘÁD CHMELE

Z každé jednotlivé dodávky chmele (partie) je u pěstitele odebrán průměrný vzorek hlávek. Partii se rozumí počet balení chmele nebo chmelových výrobků stejné kvality, které ve stejnou dobu předkládá producent za účelem ověřování. Jeho kvalita se posuzuje mechanickým a chemickým rozbořem ve specializované laboratoři a dále subjektivním hodnocením. Základní kvalitativní parametry chmele určeného ke zpracování a prodeji určuje Tržní řád chmele. Tržní řád chmele je smlouva mezi Svazem pěstitelů chmele ČR a Unii obchodníků a zpracovatelů chmele, kterou se řídí veškerý nákup chmele v České republice s cílem:

- docílení vyrovnaných tržních podmínek domácího trhu v nákupu chmele
- zajistit českému chmelu dlouhodobý odbyt za rentabilní ceny
- dostat trh s chmelem do stavu blízkého rovnováže mezi nabídkou a poptávkou

Kromě dalších ustanovení určuje i kvalitativní znaky všech obchodovaných odrůd chmele ve vztahu pěstitel-obchodník. Tyto parametry, které jsou uvedeny v tabulce 2, jsou stanoveny tak, aby byl dodáván pouze chmel dobré kvality, konkurenceschopný na náročných trzích. Dle ustanovení Tržního řádu je prodávající dále povinen písemně kupujícímu potvrdit termín a sortiment chemické ochrany chmele u daných partií chmele.

Tabulka 2: Kvalitativní parametry chmele stanovené Tržním řádem

| Jakostní znak | | Standardní jakost |
|---------------|-----------------------------------|--|
| 1. | Konduktometrická hodnota v orig.* | 2,6 % a více – Žatecký poloraný červeňák 4,0 % a více – Sládek 6,5 % a více – Bor 7,0 % a více – Premiant |
| 2. | Rozplevení | do 30 % |
| 3. | Otluky | do 15 % |
| 4. | Poškození škůdci a chorobami | do 15 % (nepřipouští se zbytky mšice) |
| 5. | Barva hlávek | zlato až žlutozelená |
| 6. | Barva lupulinu | světle žlutá až žlutá, lesklá |
| 7. | Biologický vzrůst hlávek | hlávky dobře vzrostlé, vyrovnané, vyzrálé |
| 8. | Vlhkost | do 12 % |
| 9. | Chmelové příměsi | do 3 % |
| 10. | Cizí příměsi | bez cizích příměsí |

* konduktometrická hodnota chmele se stanoví dle metody ČSN 46 2520-15 (viz kapitola 2.4.1)

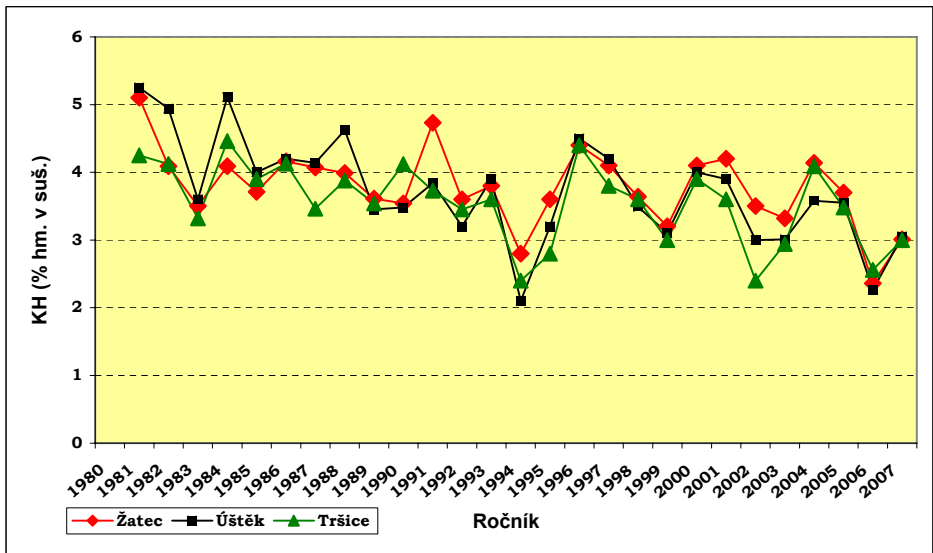
Dřívější systém nákupu chmele dle tzv. „typových vzorků“ se v dnešní době již nepoužívá. Typový vzorek byl vzorek hlávek chmele vykazující znaky příslušné jakostní třídy. Při subjektivním hodnocení se za přítomnosti pěstitele provedlo zařazení vzorku do odpovídající jakostní třídy (tzv. bonitace chmele) a v této třídě byla pak vykoupena celá dodaná partie. Chmel se zpravidla vykupoval ve 3 jakostních třídách. Namísto systému „typových vzorků“ si v současné době jednotlivé obchodní organizace stanovují interní kvalitativní kritéria pro nákup chmele od pěstitelů. Příklad kvalitativních parametrů chmele pro účely nákupu a dalšího zpracování je uveden v tabulce 3. Podrobné podmínky hodnocení kvality chmele při nákupu jsou uvedeny ve „Smlouvě o dodávce chmele“ mezi pěstitelem a odběratelem pro daný ročník sklizně. Součástí smlouvy jsou jakostní parametry, cenové příplatky a srážky (například za vysoký/nízký obsah alfa kyselin či naopak nízký/vysoký obsah biologických příměsí), hmotnostní srážky. Hlávky, které nesplňují kvalitativní požadavky, jsou považovány za „nestandard“. Takový chmel se vykoupí na základě dohody obou stran za smluvní cenu.

Tabulka 3: Příklad kvalitativních parametrů chmele v jakostních třídách pro Žatecký poloraný červeňák

| Jakostní znak | Výběrová a standardní jakost | Příplatky a srážky |
|--------------------------------------|--|--|
| Konduktometrická hodnota (KH)v orig. | KH 3,1 % a více – výběrová jakost KH 2,6-3,09 % - standardní jakost | KH < 2,6 %, nestandard |
| Vlhkost | do 12,0 % hm. | vlhkost > 12,0 % - nestandard |
| Chmelové příměsi | do 3,0 % hm. | 3,1-6,0 % - srážky > 6,0 % - nestandard |
| Obsah semen | bez semen | obsah semen do 5 % tolerován, při vyšším obsahu - nestandard |
| Poškození chorobami a škůdci | do 15 % počtu hlávek (nepřipouští se zbytky mšice) | při větší míře poškození se chmel hodnotí jako nestandard |
| Otluky | do 15 % | v rozmezí 15 až 30 % srážky, při vyšším poškození - nestandard |
| Rozplevení | do 30 % | v rozmezí 30 až 50 % srážky, při vyšším poškození - nestandard |
| Barva hlávek | zlatozelená až žlutozelená | při neodpovídající barvě hlávek nebo lupulinu se provádí srážky |
| Barva lupulinu | světle žlutá až žlutá, zrna lesklá | |
| Biologický vzrůst hlávek | hlávky vzrostlé, vyzrálé, vyrovnané | |
| Vůně | pravá jemná chmelová vůně | |

* konduktometrická hodnota chmele se stanoví dle metody ČSN 46 2520-15 (viz kapitola 2.4.1)

Jedním z kvalitativních parametrů nakupovaného chmele je i obsah alfa kyselin vyjádřený jako jeho konduktometrické hodnota. Obsah alfa kyselin ve chmelu je ročníkově značně proměnlivý, závislý do značné míry na průběhu povětrnostních podmínek v průběhu vegetační sezóny. Pěstitel nemá prakticky možnost výši obsahu alfa kyselin podstatným způsobem ovlivnit. Na obr. 2 jsou uvedeny průměrné sklizňové obsahy alfa kyselin v Žateckém poloraném červeňáku v období 1981 až 2007, ze kterých je patrné, že v některých ročnících by do kategorie „nestandard“ z pohledu obsahu alfa kyselin spadala velká část sklizně, jako tomu bylo například v letech 1994 a 2006 (Krofta, 2007). V takových případech se stanovují mimořádné nákupní parametry chmele platné pouze pro daný ročník.



Obr. 2 Průměrné sklizňové obsahy alfa kyselin v Žateckém poloraném červeňáku v období 1981 až 2007

2. ANALYTICKÁ ČÁST

Nejvýznamnějším evropským předpisem, který obsahuje analytické metody pro chmel, je Analytica EBC (European Brewery Convention), část 7 – Chmel a chmelové výrobky (Analytica EBC, 1998). EBC je mezinárodní vědecko-technická organizace založená v roce 1947 s cílem podporovat a propagovat zájmy pivovarského průmyslu zejména v oblasti rozvoje technologií, surovin a aplikace nejnovějších vědecko-technických poznatků. Významnou součástí aktivit EBC je činnost odborných komisí a pracovních skupin, které řeší konkrétní odborné problémy. Analytické komise zpracovávají metody nejen pro chmel, ale také ječmen, slad, pivo aj. Obdobnou funkci plní v USA organizace ASBC (American Society of Brewing Chemists), která zpracovala soubor analytických metod pro chmel a chmelové výrobky pod názvem „Methods of Analysis of the ASBC“ (ASBC Methods of Analysis, 1992). V České republice jsou analytické postupy pro chmel obsaženy v normě ČSN 46 2520 „Zkoušení chmele“, jejíž nejnovější verze byla zpracována v letech 1994 až 1997. Norma má více než 20 položek. Jednotlivé metody jsou specifikovány indexem za číslem normy. Většina metod z metodik EBC a ASBC je v normě zahrnuta, navíc obsahuje řadu mechanických zkoušek (otluky, jemnost vřetenka, těžkost hlávek), které v zahraničních předpisech chybí. Hodnocení kvality chmele se mnoho let provádělo výhradně smyslovým posouzením hlávek, kdy se například hodnotily barva, lesk a vyrovnanost hlávek, vůně chmele, množství a barva lupulinu, jemnost vřetenka, stupeň poškození škůdci či chorobami aj. Pokroky v analytické chemii umožnily od druhé poloviny 20. století postupně zavést do hodnocení kvality chmele exaktní analytické postupy. V této souvislosti se nejčastěji jedná o řadu metod stanovujících množství alfa kyselin a obsah chmelových silic. I přes značnou míru subjektivity má vizuální a smyslové hodnocení chmele v systému posuzování kvality stále své místo.

2.1 VZORKOVÁNÍ CHMELE

Vzorkováním se obecně rozumí proces přenosu informace mezi vzorkovaným celkem a vstupní částí analytického systému, jehož nositelem je vzorek. Cílem tohoto procesu, který tvoří nedílnou součást analytického postupu, je poskytnout celkovou informaci a provést posouzení jakosti materiálu všeho druhu.

Hlávkový chmel je z hlediska vzorkování hmota poměrně nehomogenní. Kvalita chmele z pohledu obsahu alfa kyselin závisí nejen na lokalitě a poloze chmelnice, ale obecně známá je i výrazná výšková diferenciací kvality hlávek na chmelové rostlině. Veškeré manipulace s hlávkovým chmelem, počínaje sklizňovou úpravou a konče výrobou chmelových pelet či extraktů, vedou k postupné homogenizaci primární suroviny. Naproti tomu lze u hlávkového chmele pozorovat tendenci k uvolňování lupulinových zrn během mechanického zpracování vlivem otřesů nebo vibrací. Tato sekundární nehomogenita se projevuje nejen u chmele skladovaného v hromadách, popř. zocích, ale je nutné s ní počítat i při zpracování již odebraných vzorků hlávkového chmele k vlastní chemické analýze, kde může být zdrojem hrubých chyb, zejména při stanovení obsahu

alfa kyselin (Krofta, 1994). Metodika vzorkování chmele je podrobně popsána v Analytice EBC i ASBC. Vzorkování se v praxi provádí z nelisovaného chmele v hromadách i žocích, z lisovaného chmele v pěstitelských hranolech, z mletého chmele, z chmelových granulí i extraktů. Každá forma vyžaduje specifický postup tak, aby odebraný vzorek kvalitativně reprezentoval hmotu chmele, ze které byl odebrán. Počet odebíraných vzorků závisí zejména na stupni heterogenity materiálu a dále na míře přesnosti a spolehlivosti, jakou požadujeme u sledovaného znaku ve vzorkovaném celku. V praxi se často setkáváme s tím, že se připravují různé směsné vzorky. Pokud je směsný vzorek chmele určen například pro stanovení obsahu alfa kyselin, je tento postup namístě. V případě stanovení stopových množství reziduí pesticidů může tento postup vést až ke ztrátě analytické informace.

Vzorkování hlávkového chmele z hromad

Při vzorkování nezpracovaného hlávkového chmele na hromadách se odebírá směsný vzorek o hmotnosti 200 gramů, sestávající z 5 až 10 dílčích vzorků přibližně stejné hmotnosti, které jsou odebírány jak z povrchu, tak z různých hloubek hromady.

Vzorkování hlávkového chmele ze žoků a hranolů

Z namátkově vybraného žoku se odebere 200 g vzorek chmele. Vzorky se odebírají po rozparání bočního švu žoku, a to střídavě ze spodní, střední a horní části. Počet vzorkovaných žoků je dán dvojnásobkem druhé odmocniny počtu žoků, zaokrouhleným na celé číslo. V případě hranolů je počet vzorkovaných obalů poloviční. Zařízení pro odběr vzorků chmele z hranolů je na obr. 3.

Vzorkování granulovaného chmele (Chmelařství, družstvo Žatec)

Vzorkování chmele při výrobě chmelových pelet na linkách Chmelařství, družstvo Žatec je založeno na časovém schématu následovně:

| Vzorkovací místo | Četnost vzorkování |
|---|--------------------|
| <i>Granule typu 90</i> | |
| Násyp hlávek | 3 x za směnu |
| Granule (za chladičem) | 6 x za směnu |
| <i>Granule typu 45</i> | |
| Násyp hlávek | 3 x za směnu |
| Odpadní chmel | 3 x za směnu |
| Prášek v silu po homogenizaci (cca 2 t) | 1 x |
| Granulát (cca 2 t) | 2 x |



Obr. 3 Zařízení pro odběr vzorků chmele z hranolů

Násyp hlávkového chmele na vstupu do linky na výrobu chmelových granulí se provádí na základě tzv. „míchací tabulky“ zpracované počítačem, která stanoví pořadí násypu hranolů (balotů) dle obsahu alfa kyselin z jednotlivých partií chmele určených ke zpracování. Tento postup představuje důležitý homogenizační krok. Způsob vzorkování je mnohdy nutné přizpůsobit okamžité situaci a počet vzorků operativně upravit. Například při naskladňování pěstitelských obalů do balíren Chmelařství, družstvo Žatec se namátkou kontroluje jejich hmotnost a odebírají vzorky chmele na stanovení vlhkosti z důvodu prevence samovznícení. Je-li zjištěna vyšší vlhkost než 12 %, kontroluje se každý obal podezřelé partie. Z každé partie se odebírá směsný vzorek o hmotnosti cca 200 g, který se rozdělí na tři díly. První je určen pro laboratoř k provedení chemických a mechanických rozborů, druhou část obdrží obchodní firma, třetí slouží k bonitaci a určení nákupní ceny. Vzorkování chmele není jednoduché a je třeba mu věnovat patřičnou pozornost, protože chybu vnesenou do sebepreciznějšího analytického systému špatným vzorkem nelze v laboratoři odhalit a tím méně napravit.

2.2 MECHANICKÉ ZKOUŠKY CHMELE

Anatomická stavba chmelových hlávek umožňuje hodnocení několika parametrů, které charakterizují jejich velikost, hmotnost a tvar (absolutní hmotnost 100 hlávek, podíl větének na hmotnosti hlávek, průměrná délka věténka, těžkost chmele, hustota hlávky, pravidelnost věténka aj.). Uvedené zkoušky se používají takřka výhradně k charakterizaci novošlechtěných chmelů. V praxi se k hodnocení kvality chmele nejčastěji používají tři mechanické zkoušky, obsah cizích a biologických příměsí, obsah semen a míra rozplevení hlávek. Společným znakem mechanických zkoušek chmele je skutečnost, že jsou ve smyslu chemometrických požadavků prakticky neopakovatelné.

2.2.1 STANOVENÍ CIZÍCH A CHMELOVÝCH PŘÍMĚSÍ V HLÁVKOVÉM CHMELU METODOU ČSN 46 2520-4, ČSN 46 2520-5

a) Podstata zkoušky

Hmotnost cizích (zbytky drátku, kameny, provázky apod.) a chmelových příměsí (tj. všech částí chmelové révy, listů, řapíků listů) zjistíme ve vzorku chmelových hlávek ručním vytříděním. Výsledek se vyjadřuje jako hmotnostní podíl v původním množství zkoumaného vzorku v procentech.

b) Laboratorní zařízení

analytické váhy s přesností 0,1 g

plastová miska

pinzeta

měřítka s dělením na 1 mm

c) Pracovní postup

Nejprve se odváží vzorek chmele, nejlépe o hmotnosti 100 gramů. Z laboratorního vzorku se nejdříve odstraní cizí příměsí (drátek, kameny, hlína atp.). Poté se vzorek převáží s přesností na 0,1 g a rozprostře na modrý papír. Postupně se vybírají pomocí pinzety všechny chmelové příměsí i části stopek hlávek delší než 25 mm. Vybrané chmelové příměsí se nakonec zváží a stanoví se jejich hmotnostní podíl.

d) Výpočet

Obsah cizích příměsí se vypočte ze vztahu /1/.

$$CP (\% \text{ hm.}) = 100 \cdot m_2 / m_1 \quad /1/$$

CP = obsah cizích příměsí ve chmelu (% hm.)

m_2 = hmotnost cizích příměsí ve vzorku (g)

m_1 = hmotnost původního vzorku (g)

Obsah biologických příměsí se vypočte ze vztahu /1.1/.

$$BP (\% \text{ hm.}) = 100 \cdot m_3 / m_4 \quad /1.1/$$

BP = obsah biologických příměsí ve chmelu (% hm.)

m_3 = hmotnost biologických příměsí ve vzorku (g)

m_4 = hmotnost vzorku (g) po odstranění cizích příměsí

Poznámka:

Cizí příměsí se běžně ve chmelu nevyskytují na rozdíl od biologických příměsí, kterých v nekvalitně očesaném chmelu může být 5 a více procent (obr. 4). Většina chmelů obsahuje chmelové příměsí v množství do 3,0 % hm.



Obr. 4 Biologické příměsi chmele

2.2.2 STANOVENÍ OBSAHU SEMEN V HLÁVKOVÉM CHMELU METODOU ČSN 46 2520-10

a) Podstata zkoušky

V případě opylení se ve chmelových hlávkách tvoří semena (obr. 5). Z pivovarského hlediska se jedná o nežádoucí jev, neboť lipidické látky, které semena obsahují, zhoršují sensorické vlastnosti piva. Podstatou zkoušky je stanovení hmotnostního podílu semen v hodnoceném vzorku chmele.

b) Laboratorní zařízení

analytické váhy s přesností 0,1 g

laboratorní sušárna

pinzeta

c) Pracovní postup

Do kovové schránky s víkem se umístí 100 g vzorku a schránka se v sušárně zahřívá po dobu 2 hodin na teplotu 115 °C, aby se odstranil lepivý charakter chmelových pryskyřic. Usušený vzorek se zabalí do hrubé bavlněné látky a silně se tře nebo mechanicky rozmělní, aby se oddělila chmelová semena. Sušený a nejmenno rozmělněný chmel se od pecek oddělí například na kovovém sítu o velikosti otvorů 1 mm. Zbylá vřeténka se od pecek oddělí buď pomocí nakloněné roviny, pokryté smirkovým papírem, nebo jinými postupy, jejichž cílem je zadržet vřeténka a ostatní částičky a oddělit semena. Semena se zváží a stanoví se jejich hmotnostní podíl v původním vzorku.

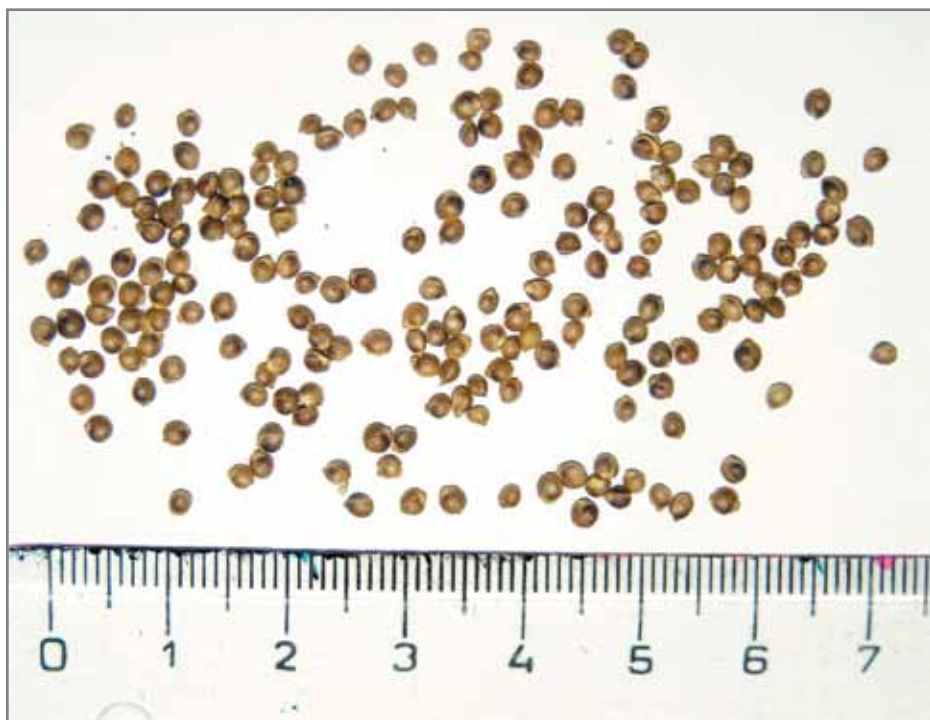
d) Výpočet

$$S (\% \text{ hm.}) = 100 \cdot m_2 / m_1 \quad /2/$$

S = obsah semen ve chmelu (% hm.)

m_2 = hmotnost semen ve vzorku (g)

m_1 = hmotnost původního vzorku (g)



Obr. 5 Semena chmele

2.2.3 ROZPLEVENÍ HLÁVEK DLE ČSN 46 2520-6

a) Podstata zkoušky

Rozplevené části hlávek jsou volné pravé i krycí listeny, vřetenka a stopky, které při prosévání sítem s definovanou velikostí ok propadnou. K rozplevování chmele dochází nejčastěji při přesušení, kdy se hlávky stávají křehkými a při mechanickém namáhání se snadno rozpadají. K přesušení malých hlávek dochází například při nevyrovnané velikosti chmele. Optimální vlhkost při posuzování rozplevení hlávek je 10 až 12 %. Podstatou zkoušky je stanovení hmotnostního podílu volných součástí hlávky na sítu s velikostí ok 10 x 10 mm.

b) Laboratorní zařízení

analytické váhy s přesností 0,1 g

kruhové síto o průměru cca 500 mm, velikost čtvercových ok 10 x 10 mm

kovová miska na vážení

tmavomodrý papír o ploše 0,5 m²

c) Pracovní postup

Laboratorní vzorek o hmotnosti 100g, z něhož byly odstraněny cizí a chmelové příměsi, se zváží s přesností na 0,1 gramu. Po zvážení se odvážený chmel vysype na síto podložené papírem. Jemným rotačním pohybem se prosévají volné části hlávek. Doba prosévání je závislá na obsahu volných částí hlávek na sítu. Po skončení prosévání se z podílu pod sítem vyberou neporušené hlávky, které propadly při prosévání a vrátí se k podílu na sítu. Část vzorku pod sítem se zváží s přesností na 0,1 g.

d) Výpočet

Hmotnostní podíl rozplevených hlávek v hmotnostních procentech se vypočte ze vztahu /3/.

$$R (\% \text{ hm.}) = 100 \cdot m_2 / m_1 - 5 \quad /3/$$

R = hmotnostní podíl rozplevených hlávek (% hm.)

m₂ = hmotnostní podíl vzorku pod sítem (g)

m₁ = hmotnost původního vzorku před proséváním (g)

Poznámka

Od výsledného podílu se odečte 5 procent jako korekce na rozplevení způsobené odběrem vzorku a vzniklé v průběhu analýzy.

2.3 STANOVENÍ VLHKOSTI CHMELE DLE ČSN 46 2520-3

Stanovení obsahu vody ve chmelu je jedním ze základních analytických parametrů chmele. Při vysokém obsahu vody (více než 15 %) vzniká nebezpečí znehodnocení chmele zapařením, ve větších objemech dokonce hrozí samovznícení, které bylo příčinou několika velkých požárů chmelových skladů v USA v nedávných letech. Při nízkém obsahu vody (méně než 6 %) se stává chmelová hlávka křehkou a snadno se při mechanických manipulacích rozpadá, což je nežádoucí. Za optimální obsah vody v sušeném chmelu lze považovat interval 10 až 11 % hm. Z výše uvedených důvodů pěstitelé před lisováním suchého chmele do žoků nebo hranolů kontrolují vlhkost chmele, která nesmí překročit povolenou mez 12 % hm.

a) Podstata zkoušky

Obsah vody ve vzorku chmele (vlhkost) se stanoví sušením určitého množství mletého chmele v sušárně za přesně definovaných podmínek. Z rozdílu hmotnosti chmele před a po sušení se stanoví vlhkost vzorku.

b) Laboratorní zařízení

mlýnek na chmel, např. Retsch ZM1, síto 1,5 mm

analytické váhy s přesností 0,01 g

elektrická sušárna s termostatem a nuceným oběhem vzduchu

exikátor se silikagelem

hliníková miska o průměru 5-7 cm a výšce 3 cm s dobře přiléhajícím víčkem

c) Pracovní postup

Do hliníkové misky se odváží 5 až 10 gramů mletého chmele. Miska s odváženým vzorkem se poté vloží (bez víčka) do sušárny, předem vytemperované na 105 °C. Vzorek se suší po dobu 1 hodiny při teplotě 105 °C. Po uplynutí této doby se miska s vysušenou chmelovou drtí uzavře víčkem a vloží do exikátoru. Po vychladnutí se miska zváží.

d) Výpočet

Obsah vody ve vzorku chmele se vypočte ze vztahu /4/.

$$W (\% \text{ hm.}) = 100 \cdot (m_1 - m_2) / m_1 \quad /4/$$

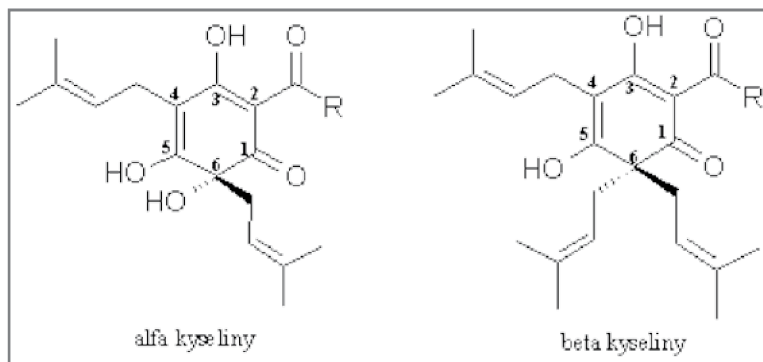
W = vlhkost chmele v % hm.

m_1 = hmotnost vzorku před sušením (g)

m_2 = hmotnost vzorku chmele po usušení (g)

2.4 ALFA KYSELINY A JEJICH ANALYTICKÉ STANOVENÍ

Alfa kyseliny, které společně s beta kyselinami patří ke specifickým složkám chmelových pryskyřic, jsou z pivovarského hlediska nejdůležitější složkou chmele. Sensoricky jsou alfa kyseliny v čistém stavu bez chuti a vůně. Při výrobě piva se ve fázi chmelovaru izomerují na tzv. iso-alfa kyseliny, které jsou hlavním nositelem hořkosti piva. Alfa kyseliny jsou tvořeny směsí několika analogů humulonů. V přirozených směsích alfa kyselin převládají kohumulon, humulon a adhumulon. Beta kyseliny se od alfa kyselin strukturálně liší přítomností dalšího isopentenylového postranního řetězce na 6. uhlíku aromatického jádra. Podobně jako alfa kyseliny se i beta kyseliny vyskytují ve směsi několika analogů, z nichž nejvíce jsou zastoupeny kolupulon, lupulon a adlupulon (obr. 6). Analytické metody stanovení alfa kyselin lze obecně rozdělit na skupinové a specifické. Struktura alfa kyselin poskytuje fyzikální základ řadě metod jejich analytického stanovení. Například dvojné vazby v šestičlenném cyklickém jádru způsobují silnou absorpci UV záření. Spektrofotometrické stanovení se výhodně spojuje s předseparací složek (např. hořkých kyselin) metodou kapalinové chromatografie nebo kapilární elektroforézy. Určitá skupina měkkých pryskyřic se sráží solemi dvojmocného olova za vzniku žluté sraženiny. Tato srážecí reakce je podstatou titračních metod stanovení alfa kyselin (Krofta, 2002).

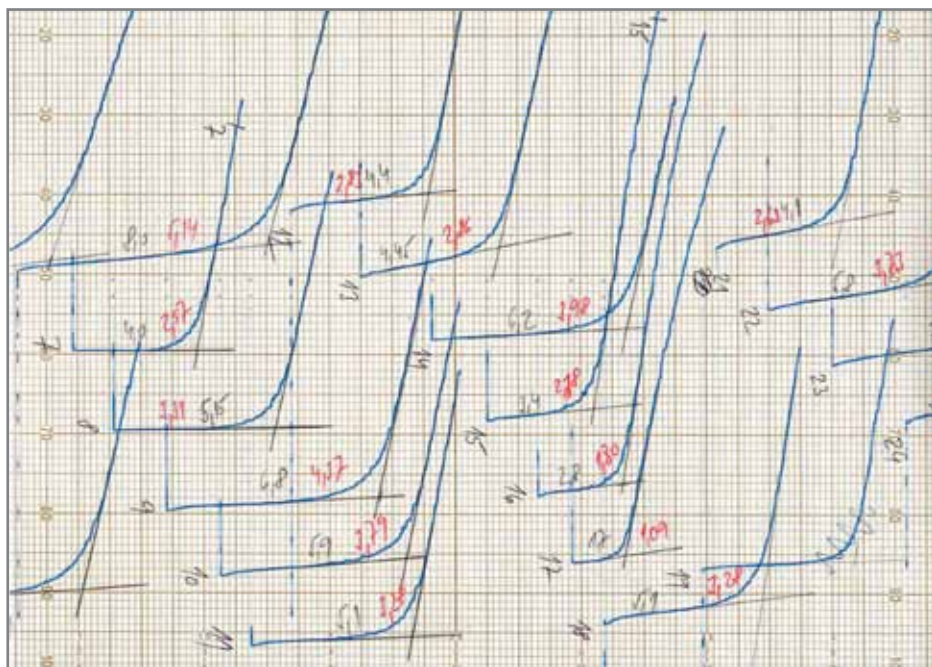


Obr. 6 Struktura alfa a beta kyselin

Titrační a gravimetrické metody

Princip titračních a gravimetrických metod je založen na srážecí reakci alfa kyselin s ionty dvojmocného olova ve formě methanolického roztoku octanu olovnatého, při níž se tvoří žlutá sraženina humulonátu olovnatého. Původně se množství sraženiny stanovovalo vázkově. Později byl tento zdoluhavý a pracný způsob nahrazen konduktometrickou titrací. Výsledek titračního stanovení, označovaný jako konduktometrická hodnota chmele (KH), se vyjadřuje v % hmotnostních. Typický průběh titrační křivky je uveden na obr. 7. Délka vodorovné větve je úměrná obsahu alfa

kyselin ve zkoumaném vzorku. Přestože princip stanovení je poměrně jednoduchý, má celý analytický postup několik kritických operací, které významně ovlivňují výsledek analýzy. Klíčovou operací je extrakce chmelových pryskyřic. Převedení hořkých látek do roztoku se provádí extrakcí vhodným rozpouštědlem za mechanického míchání. Z organických rozpouštědel se nejčastěji používají methanol, diethyleter, dichlormethan, toluen a isopropylalkohol, dávkované samostatně nebo v kombinaci s vodnými roztoky kyselin, zásad nebo pufrů (Ganzlin, 1975; Green, 1993; Schur, 2000). Dalším úskalím titračních metod je selektivita srážecí reakce. Octanem olovnatým se sráží nejen alfa kyseliny, ale i některé minoritní složky chmelových pryskyřic (např. deoxy-alfa kyseliny, humulinony). Olovnaté ionty mohou rovněž reagovat i s jinými složkami rostlinného extraktu. Hlavním motivem pro existenci různých titračních metod jsou pokusy najít optimální kompromis mezi kvantitativním rozpouštěním alfa kyselin na jedné straně a omezením extrakce balastních látek na straně druhé. Přes zatížení řadou systematických chyb jsou titrační metody pro svou jednoduchost a rychlost v praxi velmi rozšířené (Forster, 1987; Verzele, 1971, 1980).



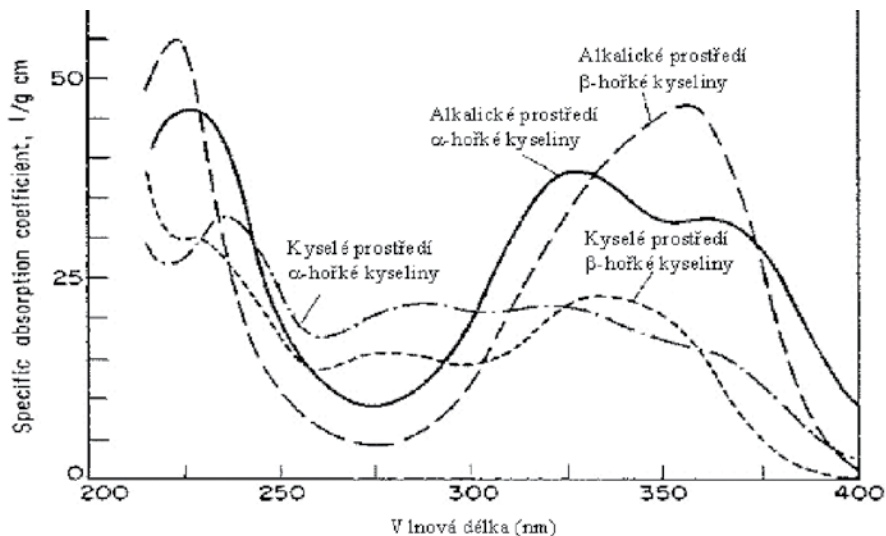
Obr. 7 Tvar titračních křivek při konduktometrickém stanovení alfa kyselin ve chmelu

Spektrofotometrické metody

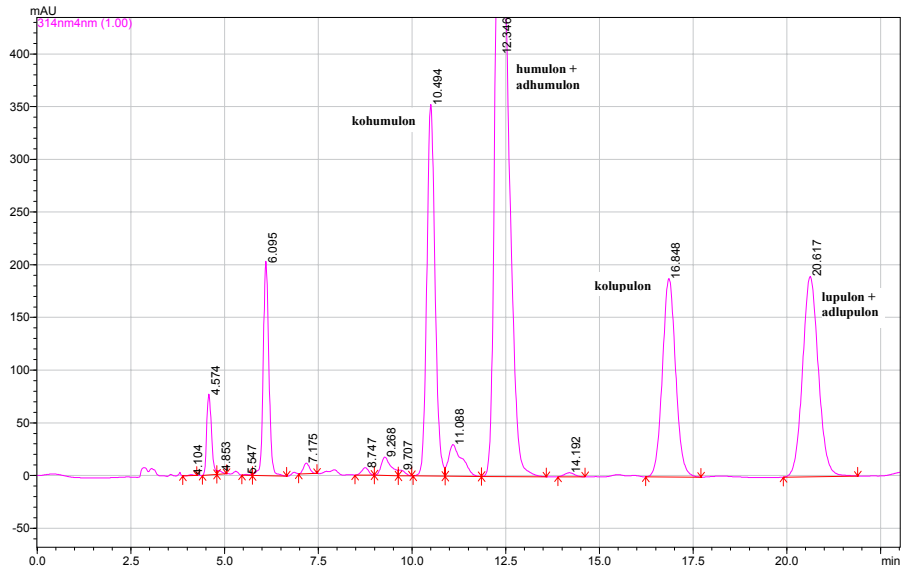
Základem spektrofotometrického stanovení hořkých kyselin je schopnost chmelových pryskyřic absorbovat světlo v UV oblasti. Absorpce světla chmelovými pryskyřicemi je silně závislá na použitém rozpouštědle a pH roztoku. Z tohoto důvodu je nutné spektrofotometrická měření provádět za přesně definovaných podmínek pH v kyselé nebo alkalické oblasti. Absorpční spektra alfa a beta kyselin v kyselém a alkalickém prostředí jsou uvedena na obr. 8. Z obrázku je patrné, že absorpční spektra alfa a beta kyselin jsou natolik rozdílná, že je možné stanovit obě skupiny látek vedle sebe. Při vlastním stanovení se proměřují absorbance toluenového extraktu při vlnových délkách 325 nm (λ_{\max} . pro alfa kyseliny), 355 nm (λ_{\max} . pro beta kyseliny) a 275 nm (λ_{\min} . pro alfa a beta kyseliny). Naměřené hodnoty se dosazují do regresních rovnic. Tato metoda se v Evropě příliš nepoužívá, běžnější je v USA, kde byla vypracována. Je obsažena výhradně v metodice ASBC pod označením Hops-6. Metoda je vhodná především pro čerstvé chmele. U starších chmelů přesnost stanovení klesá, protože se mění tvar absorpčních spekter chmelových pryskyřic.

Kapalinová chromatografie

Měření obsahu alfa kyselin kapalinovou chromatografií (HPLC) je jednou ze specifických metod stanovení těchto látek ve chmelu a chmelových výrobcích. Na rozdíl od jiných metod však umožňuje přesné stanovení těchto látek i ve starších chmelech. Principem metody je chromatografické dělení chmelových pryskyřic získaných vhodnou extrakcí chmele na analytické koloně a následná detekce jednotlivých složek na principu absorpce UV světla. Jedná se v podstatě o metodu spektrofotometrickou. Při analýze se kromě obsahu alfa kyselin stanoví i obsah beta kyselin a zastoupení hlavních analogů. Volbou experimentálních podmínek lze dosáhnout rozdělení alfa a beta kyselin na čtyři až šest analogů. Při dělení na čtyři analogy se u alfa kyselin separuje kohumulon, kdežto humulon a adhumulon se eluují jako jeden chromatografický pás (obr. 9). Stejným způsobem se separují i beta kyseliny. Podobně jako u titračních metod, i u metod chromatografických lze v literatuře nalézt řadu modifikací, které se liší způsobem přípravy vzorku a parametry chromatografického stanovení (typ a rozměry analytické kolony, složení mobilní fáze, způsob eluce, vlnová délka detekce). Mobilní fáze se převážně skládá ze směsi methanol-voda nebo acetonitril-voda, doplněné fosfátovým pufrům nebo vhodným iontopárovým činidlem. Jako separační materiály se dnes výhradně používají sorbenty na bázi silikagelu s reverzní fází (RP C₁₈) s dodatečnou deaktivací zbytkových silanolových skupin, tzv. end-capping (Ono, 1984; Hermans-Lokkerbol, 1994).



Obr. 8 Absorpční spektra alfa a beta kyselin v kyselém a alkalickém prostředí (Claus, 1978)



Obr. 9 Chromatografický záznam analýzy alfa a beta kyselin ve chmelu a chmelových výrobních kapalinovou chromatografií

Standardizovanou HPLC metodou je v analytice EBC metoda s označením 7.7. Ke kvantitativnímu stanovení alfa a beta kyselin se používá certifikovaný chmelový extrakt s deklarovaným obsahem hořkých kyselin. Jeho stabilita je pravidelně kontrolována mezinárodními kruhovými testy.

2.4.1 STANOVENÍ KONDUKTOMETRICKÉ HODNOTY CHMELE METODOU ČSN 46 2520-15

a) Podstata zkoušky

Hlávkový nebo granulovaný chmel se rozemelou na vhodném zařízení. Hořké látky jsou ze chmele extrahovány toluenem po dobu 90 minut mechanickým třepáním v třepačce. Obsah alfa kyselin, nazývaný jako konduktometrická hodnota chmele, se stanoví konduktometrickou titrací roztokem octanu olovnatého.

b) Chemikálie, laboratorní zařízení

| | |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| mlýnek na chmel | toluen, p.a |
| analytické váhy s přesností 0,01 g | methanol, p.a. |
| třepačka | kyselina octová, p.a. c = 99% |
| konduktometr | octan olovnatý, p.a. |
| vývěva | kyselina sírová, p.a. (c = 0,1 mol/l) |
| skleněné láhve, 250ml | hydroxid sodný, p.a. (c = 0,2 mol/l) |
| | Chelaton III, p.a. |

Příprava methanolického roztoku octanu olovnatého:

V odměrné baňce o objemu 1000 ml se rozpustí 20 gramů octanu olovnatého v methanolu, v průběhu rozpouštění se přidá 0,5 ml ledové kyseliny octové. Objem baňky se po rozpouštění doplní methanolem po rysku.

Čistící roztok 1 pro elektrodu se žlutým povlakem:

Směs koncentrované kyseliny octové a methanolu v poměru 50:50 % obj.

Čistící roztok 2 pro elektrodu s bílým povlakem:

V odměrné baňce o objemu 100 ml se ve vodě rozpustí 0,8 g hydroxidu sodného a 2 gramy Chelatonu III (sodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové dihydrátu). Objem baňky se po rozpouštění doplní vodou po rysku. Tento roztok je stabilní pouze několik dní.

c) Pracovní postup

I) Příprava vzorku

Do 200 ml skleněné láhve se naváží přesně 7,5 gramu mletého chmele a přidá se z automatického dávkovače 50 ml toluenu. Láhev se uzavře a vloží do třepačky. Chmel se extrahuje po dobu 90 minut. Pak se vyjme z třepačky a nechá se 5 až 10 minut stát, aby se pevný podíl usadil u dna.

II) Konduktometrická titrace

Koncem pipety omotaným kouskem vaty se odpipetuje 5 ml čirého toluenového extraktu do vysoké 100 ml kádinky a přidá se 70 ml methanolu. Obsah kádinky se důkladně promíchá, poté je roztok připraven k titraci. Před provedením vlastní titrace je nutné se přesvědčit, zda jsou elektrody ponořeny do roztoku a míchadélko je seřízeno tak, aby se mezi elektrody nedostávaly bublinky vzduchu. Pokud nejsou elektrody ponořeny, přidá se methanol. Vlastní titrace se provádí přidávkem methanolového roztoku octanu olovnatého. Titruje se nejméně 1 ml za bod ekvivalence, aby se získalo rovné rameno křivky pro vyhodnocení spotřeby titračního činidla. Titrační křivka, tj. závislost vodivosti titrovaného roztoku na objemu přidaného titračního činidla, se vyhodnotí tím způsobem, že oběma rameny titrační křivky se proloží přímkou. Průsečík obou přímek je bod ekvivalence, kterému odpovídá určitý objem spotřebovaného titračního činidla (obr. 7).

d) Vyhodnocení výsledků

Konduktometrická hodnota chmele se vyjadřuje v procentech hmotnostních na jedno až dvě desetinná místa a vypočte se ze vztahu /5/.

$$\text{KH (\% hm.)} = 2,52 \cdot V \cdot T \quad /5/$$

V = objem titračního činidla v bodě ekvivalence (ml)

T = titr octanu olovnatého

2,52 = stechiometrická konstanta

Titř octanu olovnatého (T) se přesně stanoví konduktometrickou titrací 4 ml zředěného roztoku kyseliny sírové ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) v cca 40 ml toluenu roztokem octanu olovnatého. Titr octanu olovnatého se vypočte ze vztahu /6/.

$$T = 2 \cdot 1,897 / S \quad /6/$$

S = objem titračního činidla v bodě ekvivalence (ml)

1,897 = stechiometrická konstanta

2.4.2 STANOVENÍ KONDUKTOMETRICKÉ HODNOTY CHMELE METODOU EBC 7.4

a) Podstata zkoušky

Hlávkový chmel nebo granule se rozemelou. Hořké látky jsou ze chmele extrahovány toluenem v laboratorním extraktoru. Konduktometrická hodnota chmele se stanoví konduktometrickou titrací roztokem octanu olovnatého.

b) Chemikálie, laboratorní zařízení

| | |
|--|---------------------------------------|
| mlýnek na chmel | toluen, p.a. |
| analytické váhy s přesností 0,01 g | methanol, p.a. |
| laboratorní extraktor, např. Ultra Turax (IKA) | kyselina octová, p.a. c = 99 % |
| konduktometr | octan olovnatý, p.a. |
| vývěva | kyselina sírová, p.a. (c = 0,1 mol/l) |
| skleněné láhve, 250ml | hydroxid sodný, p.a. (c = 0,2 mol/l) |
| odměrné baňky o objemu 100 a 1000 ml | Chelaton III, p.a. |

Methanolický roztok octanu olovnatého:

V odměrné baňce o objemu 1000 ml se rozpustí 20 gramů octanu olovnatého v methanolu, v průběhu rozpouštění se přidá 0,5 ml ledové kyseliny octové. Objem baňky se po rozpouštění doplní methanolem po rysku.

Čistící roztok 1 pro elektrodu se žlutým povlakem:

Směs koncentrované kyseliny octové a methanolu v poměru 50:50 % obj.

Čistící roztok 2 pro elektrodu s bílým povlakem:

V odměrné baňce o objemu 100 ml se ve vodě rozpustí 0,8 g hydroxidu sodného a 2 gramy Chelatonu III (sodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové dihydrátu). Objem baňky se po rozpouštění doplní vodou po rysku. Tento roztok je stabilní pouze několik dní.

c) Pracovní postup

I) Příprava vzorku

Do 200 ml skleněné láhve se naváží přesně 10 gramů mletého chmele a přidá se z automatického dávkovače (Brand, Hirschmann) 100 ml toluenu. Láhev se uzavře a 8 minut extrahuje v laboratorním extraktoru při otáčkách 6 až 10 tisíc ot/min dle typu extraktoru. Po ukončení extrakce se obsah baňky nechá v klidu stát 10 až 15 minut, aby se pevný podíl usadil u dna.

II) Konduktometrická titrace

Koncem pipety omotaným kouskem vaty se odpipetuje 15 ml čirého toluenového extraktu do vysoké 100 ml kádinky a přidá se 50 ml methanolu. Obsah kádinky se důkladně promíchá, poté je roztok připraven k titraci. Před provedením vlastní titrace je nutné se přesvědčit, zda jsou elektrody ponořeny do roztoku a míchadélko je seřízeno tak, aby se mezi elektrody nedostávaly bublinky vzduchu. Pokud nejsou elektrody ponořeny, přidá se methanol. Vlastní titrace se provádí přidáváním methanolvého roztoku octanu olovnatého. Titruje se nejméně 1 ml za inflexní titrace, aby se získalo rovné rameno křivky pro vyhodnocení spotřeby titračního činidla. Titrační křivka, tj. závislost vodivosti titrovaného roztoku na objemu přidaného titračního činidla, se vyhodnotí tím způsobem, že oběma rameny titrační křivky se proloží přímkou. Průsečík obou přímek je bod ekvivalence, kterému odpovídá určitý objem spotřebovaného titračního činidla.

d) Vyhodnocení výsledků

Konduktometrická hodnota chmele se vyjadřuje v procentech hmotnostních na jedno až dvě desetinná místa a vypočte se ze vztahu /7/.

$$KH (\% \text{ hm.}) = 12,60 \cdot V \cdot T / W \quad /7/$$

V = objem titračního činidla v bodě ekvivalence (ml)

T = titr octanu olovnatého

W = navážka vzorku (g)

12,60 = stechiometrická konstanta

Titř octanu olovnatého (T) se přesně stanoví konduktometrickou titrací 4 ml zředěného roztoku kyseliny sírové ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) v cca 40 ml toluenu roztokem octanu olovnatého. Titr octanu olovnatého se vypočte ze vztahu /8/.

$$T = 2 \cdot 1,897 / S \quad /8/$$

S = objem titračního činidla v bodě ekvivalence (ml)

1,897 = stechiometrická konstanta

2.4.3 STANOVENÍ KONDUKTOMETRICKÉ HODNOTY CHMELE METODOU BC 7.5

a) Podstata zkoušky

Hořké látky jsou z hlávkového chmele nebo chmelových granulí extrahovány směsí diethyléther-methanol, okyselenou přidávkem roztoku kyseliny chlorovodíkové. Konduktometrická hodnota chmele se stanoví titrací alikvotního podílu základního roztoku octanem olovnatým.

b) Chemikálie, laboratorní zařízení

mlýnek na chmel

analytické váhy s přesností 0,01 g

třepačka

konduktometr

ultrazvuková lázeň

rotační vakuová odparka s vodní lázní (RVO)

odměrné baňky o objemu 25, 50, 250, 500

a 1000 ml

odstředivka

další laboratorní sklo a pomůcky

(pipety, kádinky)

octan olovnatý, p.a.

ethanol, p.a.

kyselina chlorovodíková ($c = 0,1 \text{ mol/l}$)

dichlormethan, p.a.

hydroxid sodný, p.a. ($c = 0,2 \text{ mol/l}$)

dimethylsulfoxid (DMSO), p.a.

kyselina sírová, p.a. ($c = 96 \%$)

diethyléther, p.a.

methanol, p.a.

Chelaton III, p.a.

destilovaná voda

c) Pracovní postup

I) Příprava roztoků

Směs ethanol-dimethylsulfoxid 94:6 (obj/obj) se připraví smícháním příslušných objemů obou složek ve 100 ml odměrné baňce.

Methanolický roztok octanu olovnatého:

V odměrné baňce o objemu 1000 ml se rozpustí 20 gramů octanu olovnatého v methanolu, v průběhu rozpouštění se přidá 0,5 ml ledové kyseliny octové. Objem baňky se po rozpouštění doplní methanolem po rysku.

Čistící roztok 1 pro elektrodu se žlutým povlakem:

Směs koncentrované kyseliny octové a methanolu v poměru 50:50 % obj.

Čistící roztok 2 pro elektrodu s bílým povlakem:

V odměrné baňce o objemu 100 ml se ve vodě rozpustí 0,8 g hydroxidu sodného a 2 gramy Chelatonu III (sodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové dihydrátu). Objem baňky se po rozpouštění doplní vodou po rysku. Tento roztok je stabilní pouze několik dní.

II) Příprava základního roztoku

Do skleněné láhve o objemu 250 ml se odváží 10 gramů chmele. K navážce se přidá 100 ml diethylétheru, 20 ml methanolu a 40 ml zředěné HCl ($c=0,1$ mol/l). Směs se vloží na 40 minut do třepačky. Po vytřepání se obsah láhve převede do děličky a fáze se nechají dostatečně dlouhou dobu rozsadit. Pipetou, jejíž konec je omotán kouskem vaty, se odpipetuje 40 ml horní étherové fáze do 100 ml destilační zábrusové baňky. Přidá se 20 ml dichlormethanu a směs se na rotační vakuové odparce odpaří dosucha. Dichlormethan zajišťuje, že veškerá voda se z étherové fáze odstraní. Po oddestilování rozpouštědel se do destilační baňky přidá 5 ml methanolu. Opatrným mícháním se na stěnách ulpělé pryskyřice rozpustí a převedou kvantitativně do 50 ml odměrné baňky přidávkem methanolu. Takto získaný roztok se doplní methanolem po rysku při teplotě 20 °C. Odměrná baňka se uzavře a vloží do mrazicího boxu na dobu 1 hodiny. Podchlazením se z roztoku vyloučí vosky. Podchlazený methanolický roztok se přes skládaný filtrační papír zfiltruje do připravené 50 ml odměrné baňky. Během filtrace se nálevka zakryje hodinovým sklem. Filtrát se vytemperuje na 20 °C. Objem se nedoplňuje po rysku. Vytemperovaný objem baňky představuje základní roztok pro stanovení konduktometrické hodnoty chmele.

III) Stanovení konduktometrické hodnoty

Do vysoké kádinky o objemu 100 ml se odpipetuje 10 ml základního roztoku a přidá 40 ml směsi ethanol-DMSO. Proveďte se konduktometrická titrace. Před titrací se ujistíte, že elektrody jsou plně ponořeny, míchadélko seřízeno tak, aby se mezi elektrody nedostávaly bubliny vzduchu. Konec dávkovací kapiláry octanu olovnatého je ponořen 3 až 4 cm do titrovaného roztoku. Titruje se nejméně 1 ml za bod ekvivalence,

abychom získali druhou větev titrační křivky. Z titrační křivky vyhodnotíme spotřebu titračního činidla v bodě ekvivalence tak, že oběma větvemi titrační křivky proložíme přímkou. Průsečík přímek je bodem ekvivalence, kterému odpovídá určitý objem titračního roztoku.

d) Vyhodnocení výsledků

Konduktometrická hodnota chmele se vypočte ze vztahu /9/, do kterého se dosazuje spotřeba titračního činidla v bodě ekvivalence, určená z titrační křivky (obr. 7).

Konduktometrická hodnota (KH)

$$KH (\% \text{ hm.}) = V.T. 23,58 / m_1 \quad /9/$$

| | |
|---------|--|
| KH = | konduktometrická hodnota |
| V = | spotřeba octanu olovnatého v bodě ekvivalence (ml) |
| m_1 = | navážka vzorku (g) |
| T = | titr octanu olovnatého |
| 23,58 = | stechiometrická konstanta |

Titr octanu olovnatého T se stanoví konduktometrickou titrací 4 ml ředěné kyseliny sírové ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) v cca 70 ml směsi ethanol-DMSO roztokem octanu olovnatého.

$$T = 2 \cdot 1,897 / S \quad /10/$$

| | |
|---------|--|
| T = | titr octanu olovnatého |
| 1,897 = | stechiometrická konstanta |
| S = | spotřeba octanu olovnatého v bodě ekvivalence (ml) |

2.4.4 STANOVENÍ ALFA A BETA KYSELIN VE CHMELU A CHMELOVÝCH EXTRAKTECH METODOU HPLC (EBC 7.7)

a) Podstata zkoušky a oblast použití

Metoda specifikuje podmínky stanovení chmelových pryskyřic vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC, high pressure liquid chromatography) v hlávkovém i mletém chmelu, chmelových peletách a běžných chmelových extraktech.

Chmel a výrobky z mletého chmele

Alfa a beta kyseliny jsou ze chmele a chmelových produktů extrahovány směsí diethyl-éter-methanol a zředěným roztokem kyseliny chlorovodíkové. Chmelové pryskyřice, vyextrahované do éterové fáze, se dělí na chromatografické HPLC koloně s reverzní fází a jsou spektrometricky detekovány při vlnové délce 314 nm.

Chmelové extrakty

Chmelové extrakty se rozpouštějí v methanolu. Alfa a beta kyseliny jsou děleny na HPLC koloně s reverzní fází a spektrofotometricky detekovány při vlnové délce 314 nm.

b) Chemikálie, laboratorní zařízení

mlýnek na chmel
analytické váhy, přesnost 0,1 mg
třepačka
skleněné láhve, 250 ml s těsným šroubovacím uzávěrem
ultrazvuková lázeň
analytická HPLC kolona - doporučuje se Nucleosil 250 x 4 mm, RP C18, 5 μ m, Macherey-Nagel, Germany, No. 720014, Hops.
kapalinový chromatograf, vybavený UV nebo DAD detektorem a počítačovou datastanicí

diethyléter, prostý peroxidů, p.a.
methanol, p.a.
kyselina fosforečná, p.a. (c = 85 %)
mobilní fáze: methanol:voda:kyselina fosforečná 900:180:5 (obj/obj/obj)
odměrné baňky o objemu 50 a 100 ml
chmelový extrakt o standardním složení jako vnější standard se známým obsahem hořkých kyselin

c) Pracovní postup

I) Příprava kalibračního roztoku chmelového extraktu

Kalibrační extrakt pro stanovení alfa a beta kyselin kapalinovou chromatografií pod označením ICE 2 lze zakoupit u Labor Veritas, Engimattstrasse 11, CH-8059 Zürich, Švýcarsko (www.laborveritas.ch). Vzorek extraktu se nejprve zhomogenizuje. Odváží se takové množství extraktu, které obsahuje přibližně 0,5 g veškerých pryskyřic. Odvážený extrakt (m_{ce}) se vloží do 50 ml kádinky, přidá 30 ml methanolu a v ultrazvukové lázni rozpustí. Roztok se kvantitativně převede do 100 ml odměrné baňky a doplní methanolem po rysku. Obsah baňky se důkladně promíchá. Do odměrné baňky o objemu 50 ml se odpipetuje 10 ml tohoto roztoku a doplní methanolem po rysku. Obsah baňky se znovu důkladně promíchá. Vzorek je tak připraven pro chromatografické stanovení. Roztok kalibračního standardu je stabilní minimálně po dobu jednoho měsíce, pokud je skladován v mrazícím boxu při teplotě -18 °C. Kalibrace musí být provedena alespoň dvakrát, a to před a po měření souboru vzorků.

II) Chmel a výrobky z mletého chmele (granule)

Hlávkový chmel nebo chmelové pelety se rozemelou na vhodném mlýnku. Odváží se přesně 10 gramů jemně mletého vzorku (m_s) do 250 ml skleněné láhve. Přidá se 20 ml methanolu, 100 ml diethyléteru a 40 ml kyseliny chlorovodíkové (c = 0,1 mol/l). Láhev se pevně uzavře a obsah se intenzivně třepá na třepačce po dobu 40 minut.

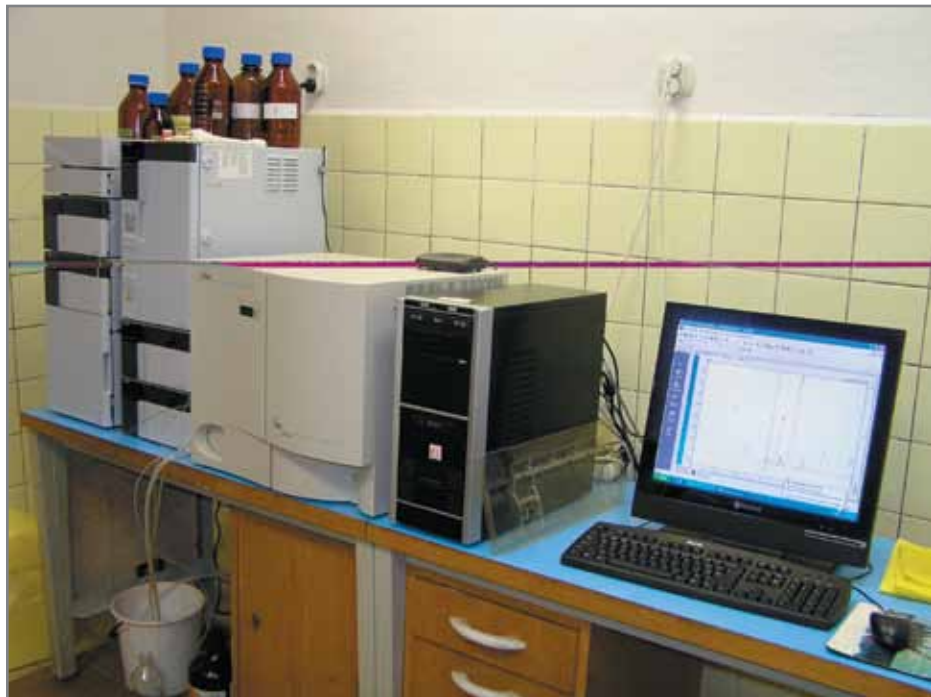
Po vytřepání se nechá láhev stát v klidu alespoň 10 minut, aby se fáze oddělily. Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 5 ml horní vyčerené étherové fáze a obsah baňky se doplní methanolem po rysku. Obsah baňky se opatrně promíchá a zfiltruje přes vhodný filtr. Roztok je poté připraven k chromatografické analýze. Vzorky musí být uchovávány při nízkých teplotách a chráněny před světlem. Jsou stabilní po dobu 24 hodin.

III) Chmelový extrakt

Vzorek chmelového extraktu se připravuje stejně jako kalibrační extrakt. Hmotnost vzorku se vyjadřuje ve výpočtech jako m_s .

IV) Chromatografické stanovení

Uvede se do chodu kapalinový chromatograf (obr. 10). Průtok mobilní fáze o složení methanol:voda:kyselina fosforečná 900:180:5 (obj:obj:obj) se nastaví na 0,8 ml/minutu. UV detektor se nastaví na 314 nm, teplota termostatu na 40 °C. Zkontroluje se správná funkce celého systému (těsnost spojení, únik mobilní fáze, teplota termostatu kolony, nastavení vlnové délky detektoru, stabilita tlaku mobilní fáze v systému). Objem nástřiku vzorku je 10 μ l. Chromatografická kolona se před nástřikem prvního vzorku kondicionuje průtokem mobilní fáze až do ustálení linie základní čáry, tj. přibližně 30 minut. Pokud je zařízení připraveno, provede se nástřik prvního vzorku. Analýza hořkých kyselin trvá přibližně 20 minut. Typický chromatogram



Obr. 10 Kapalinový chromatograf

analýzy alfa a beta kyselin v hlávkovém či granulovaném chmelu je uveden na obr. 5. Eluční systém rozděluje hořké kyseliny na 4 složky: kohumulon, humulon a adhumulon, kolupulon, lupulon a adlupulon. V uvedeném pořadí se postupně eluují v přibližných časech od 8. do 20. minuty.

d) Vyhodnocení výsledků

Obsah jednotlivých složek kohumulonu, humulon, adhumulon, kolupulon, lupulon a adlupulon se vypočte z ploch elučních pásů jednotlivých analogů hořkých kyselin ve vzorku kalibračního extraktu a vzorku chmele z následujícího vztahu /11/.

$$c_i = F \cdot m_{CS} \cdot c_{iC} \cdot A_i / m_S \cdot A_{iC} \quad /11/$$

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

F = faktor ředění, $F = 1$ pro chmelové extrakty,
 $F = 2$ pro hlávkový a granulovaný chmel

m_{CS} = hmotnost kalibračního extraktu (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 složky i v kalibračním roztoku

Celkový obsah alfa kyselin se vyjádří jako hmotnostní podíl součtu obsahu jednotlivých analogů alfa kyselin, kohumulonu, humulon a adhumulon. Stejným způsobem se vyjádří i celkový obsah beta kyselin jako součet obsahu kolupulon, lupulon a adlupulon. Obsah alfa a beta kyselin se vyjadřuje v hmotnostních procentech na jedno či dvě desetinná místa.

e) Poznámky

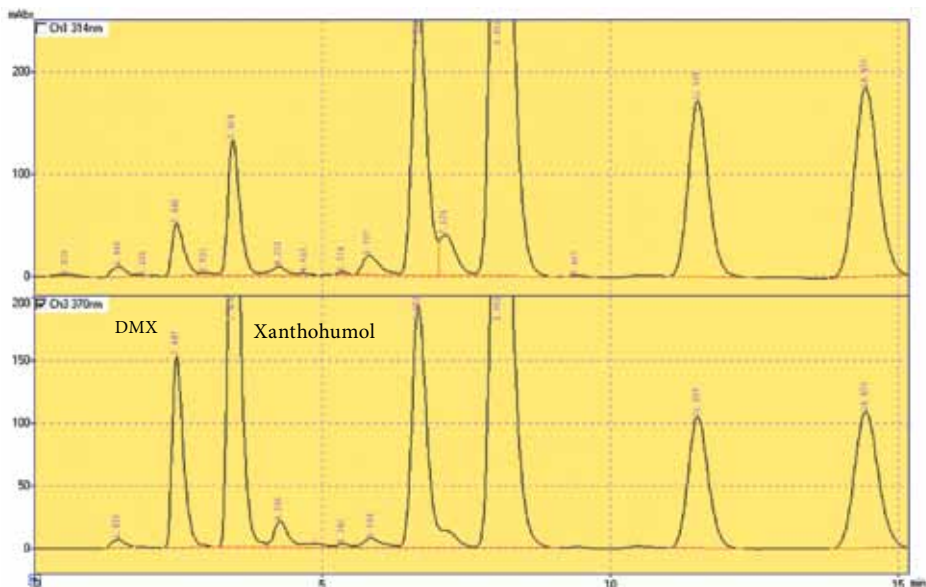
a) Za elučním pásem kohumulonu se objevuje malý pík (deoxyhumulon), který je důležitý jako test správného a postačujícího dělení jednotlivých složek alfa kyselin chmele. Tento malý eluční pás musí být od elučního pásu kohumulonu oddělen. Nedostatečná separační účinnost chromatografického systému se nejvíce projevuje právě u těchto dvou složek.

b) Rychlost eluce alfa a beta kyselin lze podstatně ovlivnit přidávkem methanolu či vody do mobilní fáze. Přídavek methanolu eluci zkracuje, přídavek vody eluci zpomaluje.

c) Simultánně s obsahem alfa a beta kyselin lze stanovit rovněž obsah xanthohumolu a desmethylxanthohumolu ve chmelu. Obě jmenované látky patří do skupiny chmelových polyfenolů ze skupiny prenylflavonoidů (Stevens, 1997). Mají tu vlastnost, že se společně s pryskyřicemi a silicemi akumuluje v lupulinových zrnech, což značně zjednodušuje jejich analytické stanovení. Analytický signál je nutné snímat při vlnové

délce 370 nm, při které prenylflavonoidy nejvíce absorbují UV světlo. Chromatogram simultánní analýzy alfa a beta kyselin, xanthohumolu a DMX ve chmelu kapalinovou chromatografií je znázorněn na obr. 11. Obsah xanthohumolu se kvantitativně vyhodnotí pomocí analytického standardu, který je komerčně dostupný (Krofta, 2003).

d) Podíl kohumulonu v alfa kyselinách je odrůdovým parametrem. Ve většině komerčních odrůd chmele se podíl kohumulonu pohybuje v rozmezí 15 až 40 % rel. Vzhledem k tomu, že intervaly podílu kohumulonu se mezi odrůdami překrývají, nelze tímto způsobem odrůdu určit jednoznačně, ale lze provést skupinové zařazení. Velmi užitečným identifikačním parametrem odrůd je obsah xanthohumolu a odvozený podílový ukazatel obsahu xanthohumolu a alfa kyselin (viz tabulka 4).



Obr. 11 Simultánní analýza alfa a beta kyselin, xanthohumolu a DMX ve chmelu kapalinovou chromatografií

2.4.5 STANOVENÍ ALFA A BETA KYSELIN VE CHMELU SPEKTROFOTOMETRICKOU METODOU PODLE ASBC, HOPS-6

a) Princip metody a oblast použití

Alfa a beta kyseliny se ze chmele extrahují toluenem. Obsah hořkých kyselin se stanoví spektrofotometricky přímo z primárního extraktu naředěného v alkalickém methanolu. Absorbance zředěného extraktu se proměřují při vlnových délkách 275, 325 a 355 nm. Kvantifikace se provádí dosazením hodnot absorbancí do regresních rovnic. Metoda je nevhodnější pro čerstvé chmele po sklizni.

b) Přístroje, chemikálie, pomůcky

| | |
|---|--|
| toluen, p.a. | analytické váhy, přesnost 1 mg |
| methanol, p.a. | UV-VIS spektrofotometr |
| roztok hydroxidu sodného, p.a., (c = 6,0 mol/l) | mlýnek na chmel |
| alkalický methanol | třepačka |
| odměrné baňky o objemu 50 a 100 ml | skleněné láhve, 250 ml s těsným šroubovacím uzávěrem |

c) Pracovní postup

Do skleněné láhve o objemu 250 ml se naváží 5 gramů čerstvě mletého chmele a přidá se 100 ml toluenu. Láhev se uzavře a třepe v třepačce po dobu 30 minut. Po vytřepání se obsah láhve nechá usadit. Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 5 ml vyčereného toluenového extraktu a doplní methanolem po rysku (roztok A). Z roztoku A se odpipetuje 5 ml do 50 ml odměrné baňky a doplní alkalickým methanolem po rysku (roztok B). Absorbance roztoku B se proměří při vlnových délkách 275, 325 a 355 nm proti slepému vzorku, který se připraví ředěním 5 ml toluenu stejným způsobem jako vzorky chmele.

Příprava roztoku alkalického methanolu:

do 100 ml methanolu se přidá 0,2 ml roztoku NaOH (c=6 mol/l). Roztok se musí připravovat denně čerstvý.

d) Vyhodnocení výsledků

Obsah alfa a beta kyselin se stanoví dosazením změřených absorbancí do níže uvedených regresních rovnic:

$$\text{alfa kyseliny} = d \cdot (-51,56 A_{355} + 73,79A_{325} - 19,07A_{275}) \quad /12/$$

$$\text{beta kyseliny} = d \cdot (55,57 A_{355} - 47,59A_{325} + 5,10A_{275}) \quad /13/$$

$d = \text{faktor ředění}$: použije-li se pro přípravu roztoku B 5 ml roztoku A, pak ředící faktor je roven hodnotě $d = (100 \times 50)/(500 \times 5 \times 5) = 0,40$

2.4.6 STANOVENÍ INDEXU SKLADOVÁNÍ CHMELE SPEKTROFOTOMETRICKOU METODOU PODLE ASBC, HOPS-6

a) Princip metody a oblast použití

Chmel je principiálně velmi nestabilní surovina. Obsah a složení chmelových pryskyřic, silic a dalších látek se s časem mění v závislosti na podmínkách skladování (teplota, přístup světla), době a odrůdě. Nejzávažnějším vnějším projevem je úbytek obsahu alfa kyselin. Změna obsahu a složení chmelových pryskyřic je provázena výrazným růstem

absorbance methanolového extraktu chmele při 275 nm (A_{275}) a poměru absorban-
cí měřených při 275 a 325 nm na UV-VIS spektrofotometru. Tento poměr se nazý-
vá „index skladování chmele“ a označuje se běžně zkratkou HSI z anglického překla-
du „Hop Storage Index“. Přístroje, chemikálie, pomůcky a pracovní postup jsou stejné
jako u spektrofotometrického stanovení alfa a beta kyselin (kapitola 2.4.5).

b) Vyhodnocení výsledků

Index skladování chmele se vypočte ze vztahu:

$$HSI = A_{275} / A_{325} \quad /14/$$

Index skladování chmele je bezrozměrné číslo. Jeho hodnoty se u chmelů bezpro-
středně po sklizni pohybují v intervalu 0,23 až 0,28 (bez ohledu na odrůdu). Pak jeho
hodnota nevratně vzrůstá v závislosti na podmínkách skladování, způsobu zpraco-
vání a odrůdě. U špatně skladovaných chmelů může být jeho hodnota vyšší než 1,00
(Likens, 1970).

2.4.7 POROVNÁNÍ METOD STANOVENÍ ALFA KYSELIN

Vzhledem k rozdílnému způsobu přípravy vzorků (rozpouštědla, extrakce, způsob
míchání, analytické stanovení) je zcela zákonité, že stanovení obsahu alfa kyselin ně-
kolika metodami ve stejném vzorku poskytuje odlišné výsledky. Zcela přesný obsah
alfa kyselin dává pouze HPLC metoda EBC 7.7. Přibližně shodné výsledky v čerstvých
chmelech poskytují metody ČSN 46 2520-15, EBC 7.7 a ASBC. Nemusí to však platit
u všech odrůd. Podstatně vyšší hodnoty obsahu alfa kyselin poskytuje metoda EBC
7.5 díky použití účinnějšího rozpouštědla (diethylether) a nespecifické konduktome-
trické titraci. Výsledek může být vyšší o 10 až 15 %. Mezi oběma krajními hodnotami
se pohybuje výsledek stanovení metodou EBC 7.4 díky intenzivní extrakci chmele v la-
boratorním extraktoru. Toluén, který se používá k extrakci chmele v metodách ČSN
a EBC 7.4, je považován za měkké rozpouštědlo. U starších chmelů přibližná shodnost
výše uvedených metod neplatí. Stárnutím chmele se rozdíly výsledků mezi jednotlivými
metodami prohlubují. Konduktometrická hodnota chmele neklesá tak rychle jako
obsah alfa kyselin, protože některé rozkladné produkty chmelových pryskyřic se octa-
nem olovnatým titrují. Mezi výsledky obsahu alfa kyselin získanými různými metoda-
mi neexistují pevné přepočítávací indexy.

V praxi se všechny výše uvedené metody používají. Při nákupu chmele se mnoho let
osvědčuje použití metody ČSN 46 2520-15, protože umožňuje proměření více než 100
vzorků za směnu. Při zpracování chmele na pelety se používá metoda EBC 7.4 díky re-
lativně krátké době analýzy, kterou lze zvládnout do 45 minut. Protože na laborator-
ním extraktoru lze současně extrahovat pouze jediný vzorek, metoda není vhodná pro
měření velkého počtu vzorků. Metoda HPLC se používá pro stanovení obsahu alfa

kyselin ve chmelových extraktech a vysokoobsažných odrůdách chmele. Doba přípravy vzorku a vlastní analýza trvají přibližně 2,5 hodiny. Nevýhodou je vysoká investice do nákupu kapalinového chromatografu. Metoda EBC 7.5 se používá nejčastěji při prodeji chmele do pivovarů a je vhodná i pro starší chmele, protože nejlépe charakterizuje jejich hořící vydatnost. Její provedení však zabere 3 až 4 hodiny.

2.5. STANOVENÍ OBSAHU A SLOŽENÍ CHMELOVÝCH SILIC VE CHMELU A CHMELOVÝCH EXTRAKTECH

Chmelové silice jsou nejdůležitější skupinou obsahových látek chmele odpovědných za aroma chmele a piva. Chmel obsahuje 0,5 až 3,0 % hmotnostních silic, které jsou obsaženy v lupulinových žlázách chmelové hlávky. Chmelové silice jsou složitou směsí několika set přírodních látek různého chemického složení, těkavosti a polarity. Některé z nich jsou zastoupeny řádově v desítkách procent (myrcen, α -humulen), řada dalších se vyskytuje v malém až stopovém množství. Všechny se však společně podílí na vzniku charakteristického chmelového aroma. Složky chmelových silic je možné rozdělit do tří skupin látek. Největší podíl připadá na uhlovodíkovou frakci, která tvoří 70 až 80 % celkové hmotnosti silic. Zbývající podíl tvoří kyslíkaté a sirné látky. Sirná frakce chmelových silic představuje přibližně pouze 1,0 % celkové hmotnosti, ale vzhledem k tomu, že se jedná o látky sensoricky velmi aktivní, jejich vliv na celkovém aroma chmele není zanedbatelný (Sharpe, 1981). Z kyslíkatých látek obsahují chmelové silice terpenické alkoholy linalool, geraniol a nerol, dále methylketony v homologické řadě od 2-heptanonu po 2-heptadekanon. Kromě toho se ve chmelových silicích nachází řada dalších ketonů s větveným řetězcem, a to jak nasyceným, tak nenasyčeným. Nejdůležitějšími zástupci látek ze skupiny epoxidů jsou epoxidy, které vznikají oxidací terpenických uhlovodíků v průběhu stárnutí chmele (karyofylepoxid a humulene-poxidy). Jejich obsah ve chmelu s časem podstatně stoupá. Estery přítomné ve chmelových silicích jsou jednou z nejdůležitějších složek z pohledu formování charakteru aroma. Doposud bylo identifikováno více než 70 různých esterů. Homologická řada methylesterů nasycených alifatických kyselin od hexanoátu po dodekanoát patří k nejvíce zastoupeným (Katsiotis, 1989; Kralj, 1991).

a) Podstata zkoušky

Kvantitativní obsah chmelových silic ve chmelu, chmelových peletách i extraktech se stanoví jako podíl, který vytéká s vodní párou v průběhu varu chmele v časovém intervalu 1,5 hodiny. Alternativní způsob izolace silic z hlávek je metoda mikroextrakce na pevnou fázi (SPME), kterou lze použít v případech, kdy je k dispozici malé množství vzorku (prakticky postačuje jediná hlávka chmele). Složení chmelové silice se stanoví kapilární plynovou chromatografií.

b) Chemikálie, laboratorní zařízení

| | |
|---|--|
| mlýnek na chmel (ZM 1, Retsch) se sítím o velikosti 3,0 mm | analytické váhy s přesností 0,001 g |
| aparatura na destilaci silic (zábrusová varná baňka s kulatým dnem o objemu 4000 ml, topné hnízdo, kolimátor s vodním chlazením, viz obr. 12) | bezvodý síran sodný |
| srdcovité baňky o objemu 100 ml | kapilární kolona pro plynovou chromatografii, například DB 5, délka kolony 30 až 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm; tloušťka filmu 0,25 μm (nebo ekvivalent) |
| rotační vakuová odparka s vodní lázní | tlaková láhev s héliem (5,0) |
| plynový chromatograf s hmotnostním detektorem | skleněná mikrostříkačka 0,5 μm |
| další laboratorní sklo a pomůcky (pipety, kádinky) | destilovaná voda |
| | n-pentan |

c) Pracovní postup

1) Stanovení obsahu silic ve chmelu a chmelových výrobcích

Do zábrusové varné baňky o objemu 4 l se nalijí 2 l destilované vody, přidá se 100 g chmelové drti a několik varných kamínků. Příprava vzorků chmelů (mletí) pro izolaci silice se provádí až těsně před analýzou. Je nutné se vyvarovat skladování rozemletých vzorků v lednici, neboť velmi rychle dochází k úniku těkavějších složek a tím i změně složení silice. Baňka se umístí do topného hnízda. Na varnou baňku se nasadí kolimátor s dvoukruhovým vodním chlazením. Do kolimátoru se nalije destilovaná voda tak, aby vyplňovala obě trubice separačního ramene. Schéma destilační aparatury je na obr. 12. Uvede se do chodu chlazení kolimátoru a současně zapne topení hnízda. Za začátek varu se považuje okamžik, kdy zkondenzovaná voda začne separační trubicí přetékat zpět do varné baňky. Doba varu je 90 minut. Po jeho ukončení se topné hnízdo vypne. Z kolimátoru se nejprve odpustí destilovaná voda. Izolovaná silice, která se udržuje na hladině vodního sloupce, se odpustí do předem zvažované špičaté zkumavky. Injekční stříkačkou se odsaje zbytek vody a zkumavka opět zvaží. Z rozdílů hmotností se určí první podíl silice (podíl A). Pokud je silice zakalená, přidá se 0,05 až 0,1 g bezvodého síranu sodného. Vysušená silice musí být čirá. Podíl A je určen chromatografickou analýzou silice. Kolimátor se propláchne 20 ml n-pentanem. Proplach se kvantitativně jímá do 100 ml zábrusové baňky. Přidá se 1 kávová lžička bezvodého síranu sodného a baňka umístí na 30 minut do lednice. Po vysušení se obsah baňky přefiltruje do předem zvažované baňky a filtr promyje dalšími 20 ml n-pentanem. Rozpouštědlo se oddestiluje na rotačním vakuovém odpařováku při teplotě lázně 37 až 38 °C a absolutním tlaku 60 kPa po dobu 5 minut.

Po odpaření rozpouštědla se baňka opět zvaží a z rozdílů hmotností se stanoví druhý podíl silice (podíl B). Celková hmotnost silice je dána součtem podílů A + B. Výsledek se uvádí s přesností na dvě desetinná místa.

Výtěžnost izolačního postupu: limonen98,5 %, linalool104,1 %.



Obr. 12 Aparatura na izolaci chmelových silic destilační metodou

II) Pracovní postup izolace silic ze chmele metodou mikroextrakce tuhou fází (SPME, Solid Phase Microextraction)

Do vzorkovnice o objemu 4 ml se naváží 0,2 g chmele. Po uzavření pomocí speciálního septa, pokrytého na vnitřní straně hliníkovou fólií, se vzorkovnice vloží do vyhřívaného bloku. Poté se přes septum vysune do plynného prostoru nad vzorkem SPME vlákno a exponuje při teplotě 50 °C po dobu 60 minut. K extrakci složek chmelových silic se používá speciální manuální držák (SUPELCO) a vlákno o délce 10 mm pokryté vrstvou polydimethylsiloxanu (PDMS) s tloušťkou filmu 30 µm. Pro starší chmele lze použít stejný typ vlákna s tloušťkou filmu 100 µm nebo vlákno PDMS/DVD 65 µm. Po ukončení sorpce se vlákno zatáhne do duté jehly, vyjme ze vzorkovnice a okamžitě desorbuje v nástřikovém prostoru plynového chromatografu (Krofta, 2000).

III) Chromatografická analýza chmelových silic

Vysušená chmelová silice se injikuje na kolonu plynového chromatografu v neřaděném stavu v množství 0,1 až 0,2 µl. Chromatografická analýza chmelových silic za níže uvedených teplotních podmínek trvá přibližně 70 minut.

Kolona: kapilární kolona DB 5 (J&W) 30 m; 0,25 mm; 0,25 µm

| Teplotní program: | I. | II. |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 60 °C - 5 min. izotermicky | 40 °C - 3 min. izotermicky |
| | 60 až 150 °C - 2 °C/min | 40 až 60 °C - 10 °C/min |
| | 150 až 225 °C - 5 °C/min | 60 až 150 °C - 2 °C/min |
| | 225 až 250 °C - 25 °C/min | 150 až 225 °C - 5 °C/min |
| | 250 °C - 5 min. izotermicky | 225 až 250 °C - 25 °C/min |
| | | 250 °C - 5 min. izotermicky |

Teplotní program I se používá pro dělení silic kapalných vzorků získaných destilačním postupem, teplotní program II pro silice izolované metodou mikroextrakce tuhou fází. Nižší počáteční teplota kolony je nezbytná z důvodu lepší fokusace analytů na začátku kolony.

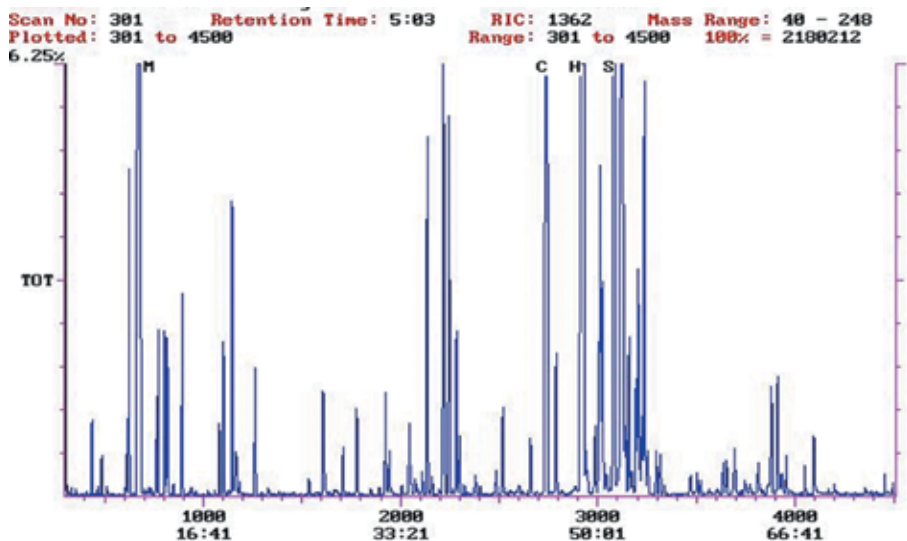
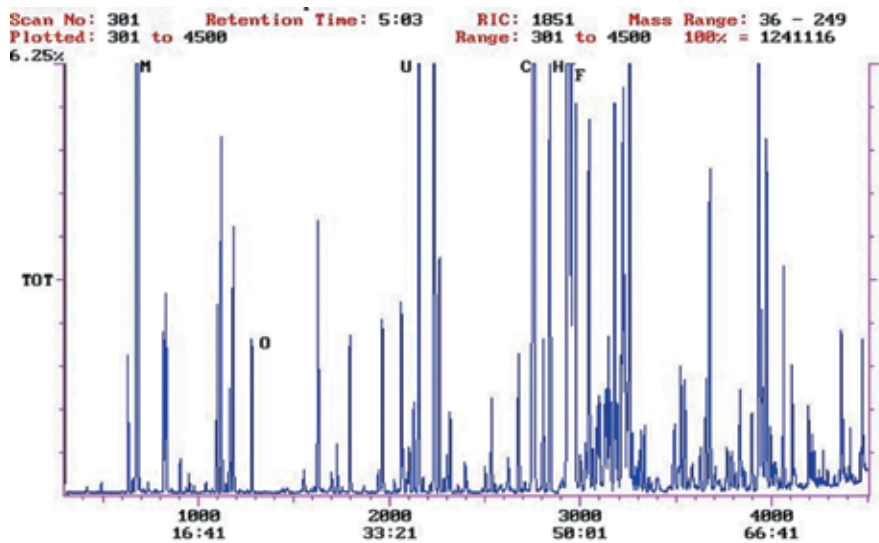
| | |
|--------------------|--|
| Přístroj: | plynový chromatograf |
| Teplota injektoru: | 270 °C |
| Detektor: | hmotnostní detektor |
| Teplota detektoru: | 200 °C (elektronový náraz) |
| Nástřík: | split poměr 1 : 50; 0,1 µl koncentrované silice splitless 90 sekund při analýze SPME |
| Nosný plyn: | hélium 4,8; průtok 1 ml/min |

d) Vyhodnocení výsledků

Semikvantitativní hodnocení složení silice se vyjadřuje v relativních procentech jako podíl integrované plochy složky k celkové integrované ploše všech složek silice. Obsah složek je vyjádřen v relativních procentech na jedno desetinné místo u složek s obsahem nad 10 % rel., na dvě desetinná místa u složek s obsahem pod 10 % rel. Největší podíl chmelových silic připadá na terpenické uhlovodíky myrcen, β -karyofylen, α -humulen, β -farnesen a selineny, které tvoří 60 až 80 % hmotnosti silic. K identifikaci neznámých látek se používá plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem. U řady látek je možné získat analytický standard. K identifikaci složek se používají dva parametry: eluční čas a hmotnostní spektrum. Hmotnostní spektra se porovnávají s knihovními a literárními údaji. Při změně kolony od jiného výrobce nebo i záměnou 60 m kolony za 30 m se eluční časy i pořadí eluce jednotlivých složek mohou podstatně lišit. Na obr. 13 jsou uvedeny chromatogramy chmelových silic českých odrůd Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ) a Harmonie.

Složení chmelových silic je významným chemotaxonomickým parametrem chmelových odrůd. Přítomnost či absence některých složek silic jsou pro některé odrůdy či skupiny odrůd charakteristické. Například velké množství farnesenu (tj. více než 10 %) je typické pro Žatecký poloraný červeňák a další geneticky příbuzné odrůdy. Jiným příkladem je vysoký obsah alfa a beta selinenu (více než 10 %), kterým se z českých chmelů vyznačují odrůdy Harmonie, Rubín a Vital.

V tabulce 4 jsou uvedeny charakteristické hodnoty obsahu a složení nejvýznamnějších sekundárních metabolitů chmele (alfa a beta kyseliny, kohumulon, kolupulon, obsah a složení silic, xanthohumol aj.) všech českých odrůd chmele, které mohou sloužit jako vodítko při určování jejich identity (Atlas českých odrůd chmele, 2007).



Obr. 13 Chromatografické záznamy analýzy chmelových silic odrůd Žatecký poloraný červeňák (horní) a Harmonie (M=myrcen, O=ocimen, U=2-undekanon, C=karyofylen, H=humulen, F=farnesen, S=selineny)

Tabulka 4: Charakteristické hodnoty obsahu a složení nejdůležitějších sekundárních metabolitů českých odrůd chmele

| Odrůda | ŽPČ* | Sládek | Harmonie | Bor | Premiant | Agnus | Rubin | Kazbek | Vital |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Chmelové pryskyřice | | | | | | | | | |
| celkové pryskyřice (% hm.) | 13-20 | 17-24 | 22-26 | 18-25 | 19-25 | 26-32 | 22-27 | 17-22 | 25-30 |
| alfa kyseliny (% hm.) | 2,5-4,0 | 4,5-7,0 | 5,0-8,0 | 6,0-9,0 | 7,0-10,0 | 9,0-12,0 | 9,0-12,0 | 5-8 | 12-16 |
| beta kyseliny (% hm.) | 4,0-6,0 | 4,0-7,0 | 5,0-8,0 | 3,0-5,5 | 3,5-5,5 | 4,0-6,5 | 3,5-5,0 | 4-6 | 6-10 |
| poměr alfa/beta | 0,6-0,9 | 0,7-1,3 | 0,8-1,2 | 1,6-2,3 | 1,7-2,3 | 1,9-2,6 | 2,5-3,2 | 0,9-1,5 | 1,6-2,1 |
| kohumulon (% rel.) | 23-26 | 23-30 | 17-21 | 22-27 | 18-23 | 29-38 | 25-33 | 35-40 | 21-26 |
| kolupulon (% rel.) | 39-43 | 44-50 | 35-40 | 43-48 | 39-44 | 51-59 | 45-52 | 57-62 | 45-50 |
| Polyfenoly | | | | | | | | | |
| celkové polyfenoly (% hm.) | 4,5-5,5 | 2,0-3,0 | 2,7-3,5 | 3,0-4,0 | 2,0-3,0 | 2,5-3,5 | 2,5-3,5 | 2,5-3,5 | 2,5-3,5 |
| xanthohumol (% hm.) | 0,30-0,50 | 0,50-0,75 | 0,40-0,70 | 0,40-0,60 | 0,30-0,50 | 0,70-1,10 | 0,45-0,75 | 0,30-0,45 | 0,70-1,00 |
| DMX (% hm.)** | 0,05-0,12 | 0,10-0,20 | 0,10-0,15 | 0,08-0,16 | 0,07-0,15 | 0,10-0,20 | 0,05-0,10 | 0,10-0,20 | 0,25-0,40 |
| Chmelové silice | | | | | | | | | |
| obsah silic (% hm.) | 0,4-1,0 | 1,0-2,0 | 1,0-2,0 | 1,2-2,0 | 1,0-2,0 | 2,0-3,0 | 1,0-2,0 | 0,9-1,8 | 1,5-2,5 |
| myrcen (% rel.) | 25-40 | 40-50 | 30-40 | 40-55 | 35-45 | 40-55 | 35-45 | 40-50 | 40-55 |
| karyofylen (% rel.) | 6-9 | 8-13 | 6-11 | 7-11 | 7-13 | 9-13 | 7-10 | 10-15 | 5-8 |
| humulen (% rel.) | 15-25 | 20-30 | 10-20 | 25-35 | 25-35 | 15-22 | 13-20 | 20-35 | 2-5 |
| farnesen (% rel.) | 14-20 | < 1,0 | < 1,0 | < 1,0 | 1-3 | < 1,0 | < 1,0 | < 1,0 | 1-4 |
| alfa a beta selenin (% rel.) | 0,5-1,5 | 0,5-1,5 | 10-19 | < 1,0 | 0,5-1,5 | 1-3 | 10-16 | 1-3 | 7-15 |

*ŽPČ - Žatecký polorozný červenák

**DMX - desmethylxanthohumol

2.6 NEŽÁDOUCÍ A CIZORODÉ SLOŽKY CHMELE

Chmel obsahuje řadu nežádoucích a cizorodých složek. K cizorodým látkám řadíme exogenní složky, jako jsou těžké kovy a rezidua pesticidů používaných v chemické ochraně chmele v průběhu vegetace. Chmel představuje z hlediska chemického ošetření velmi náročnou plodinu. Současný způsob pěstování na velkých plochách nevytváří optimální podmínky pro schopnost autoregulace současného agroekosystému, což je způsobeno malou diverzitou hospodářské krajiny. Tento stav vyžaduje používání pesticidů, především insekticidů, akaricidů a fungicidů, v rámci regulace mšice a svlušky chmelové a houbových chorob (peronospora, padlí chmelové). Bez jejich použití by docházelo každoročně k velkým ztrátám na kvalitě i výnosu chmele. Za nežádoucí složku jsou považovány především dusičnany. V nízkých koncentracích a neredukujícím prostředí nejsou pro dospělého člověka škodlivé. V pivovarnictví je negativní působení dusičnanů spojeno s mikrobiální redukcí na dusitany a nebezpečím následné tvorby N-nitrosoaminů s prokazatelně karcinogenními účinky. Chmel dále může obsahovat některé fytopatogenní organismy, jako jsou viry a viroidy, které lze z obecného hlediska rovněž považovat za nežádoucí složky. Viry a viroidy například negativně ovlivňují obsah alfa kyselin.

2.6.1 STANOVENÍ OBSAHU DUSIČNANŮ KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ

a) Podstata zkoušky

Metoda stanoví množství dusičnanových iontů, které přejdou do roztoku v průběhu 15minutového varu chmele s destilovanou vodou. V tomto roztoku se po naředění stanoví koncentrace dusičnanů pomocí kapalinové chromatografie s přímou detekcí při vlnové délce 205 nm.

b) Chemikálie, laboratorní zařízení

| | |
|--|---|
| analytické váhy, přesnost 0,1 mg | acetonitril, HPLC grade |
| kapalinový chromatograf, vybavený UV nebo DAD detektorem | tetrabutylphosphonium chlorid (50 % roztok ve vodě) |
| zábrusová destilační baňka s plochým dnem o objemu 500 ml | dihydrogenfosforečnan sodný, p.a. |
| mlýnek na chmel | dusičnan draselný, p.a. |
| odměrné baňky o objemu 100 a 500 a 1000 ml | zpětný chladič |
| analytická HPLC kolona s reverzní fází: například Nucleodur RP-C ₁₈ , 5 μm, 125 x 4 mm | topná deska nebo vařič |
| (Macherey Nagel, SRN) | filtrační papír |
| | membránové filtry o hustotě 0,45 μm |

c) Pracovní postup

I) Příprava kalibračního roztoku

Do odměrné baňky o objemu 1000 ml se naváží 0,4892 gramů dusičnanu draselného a rozpustí v destilované vodě. Po rozpuštění se obsah baňky doplní vodou po rysku. Připravený roztok má koncentraci 300 mg NO₃⁻ /litr. Z tohoto roztoku se odpipetuje 10 ml do 100 ml odměrné baňky a doplní vodou po rysku. Tento roztok má koncentraci 30 mg NO₃⁻ /litr. Z tohoto roztoku se odpipetuje 10, 20, 30, 40 ml do odměrných baňek o objemu 50 ml. Tak získáme pracovní kalibrační roztoky o koncentracích 6, 12, 18 a 24 mg NO₃⁻ /litr pro konstrukci kalibrační přímky.

II) Postup zpracování chmele

Hlávkový chmel nebo chmelové pelety se rozemelou na vhodném mlýnku. Odváží se přesně 2 gramy jemně mletého vzorku do 500 ml skleněné baňky s plochým dnem, do které přidáme 300 ml destilované vody. Obsah baňky se na topné desce přivede k varu a pod zpětným chladičem se vaří 15 minut. Získaný výluh se ochladí na pokojovou teplotu. Ochlazený výluh se kvantitativně převede do 1000 ml odměrné baňky a doplní destilovanou vodou po rysku. Po promíchání se část ředěného výluhu (50 až 100 ml) přefiltruje přes filtrační papír. Část tohoto filtrátu (cca 5 ml) se dále přefiltruje přes celulózo-
vý membránový filtr o hustotě 0,45 μm (např. Chromafil, 45/25, Macherey-Nagel). Filtrát se poté injikuje na kolonu kapalinového chromatografu. Obdobným způsobem lze připravit i vzorek chmelového extraktu s tím, že navážka je vyšší přibližně 5krát.

III) Chromatografické stanovení

Uvede se do chodu kapalinový chromatograf. Mobilní fáze má složení:

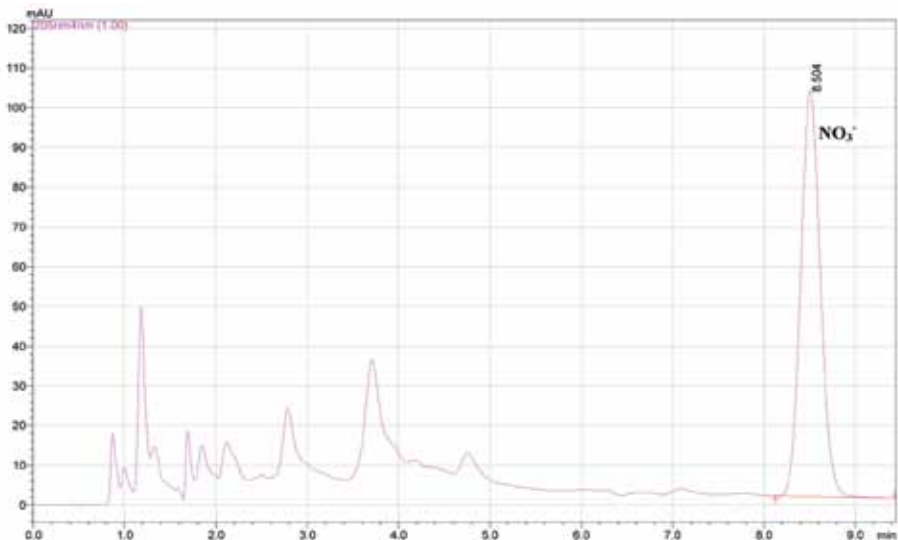
50 ml acetonitril

2 ml tetrabutylphosphonium chlorid (50 % roztok)

0,5 g NaH₂PO₄ · H₂O

destilovaná voda (doplnit na objem 1000 ml)

Průtok mobilní fáze se nastaví na 0,8 ml/minutu. UV detektor se nastaví na 205 nm, teplota termostatu na 40 °C. Zkontroluje se správná funkce celého systému (těsnost spojení, únik mobilní fáze, teplota termostatu kolony, nastavení vlnové délky detektoru, stabilita tlaku mobilní fáze v systému). Objem nástřiku vzorku je 10 μl. Chromatografická kolona se před nástřikem prvního vzorku kondicionuje průtokem mobilní fáze až do ustálení linie základní čáry, tj. přibližně 30 minut. Pokud je zařízení připraveno, provede se nástřik prvního vzorku. Analýza dusičnanů trvá přibližně 8 minut na koloně o délce 125 mm. Typický chromatogram analýzy dusičnanů v hlávkovém chmelu je na obr. 14. Mez detekce je 0,2 mg NO₃⁻/l, mez stanovitelnosti za stejných podmínek 0,8 mg dusičnanů na litr.



Obr. 14 Chromatogram stanovení obsahu dusičnanů ve chmelu kapalinovou chromatografií

d) Výpočet

$$C_{\text{NO}_3} = F \cdot A_v \cdot C_s \cdot 1000 \cdot 0,99 / b \cdot A_s$$

/15/

C_{NO_3} = koncentrace dusičnanů ve vzorku (mg/kg)

F = faktor ředění (např. při ředění filtrátu 1:1 je F = 2)

C_s = koncentrace dusičnanů ve standardu při jednobodové kalibraci (mg/l)

A_v = plocha elučního pásu dusičnanů ve vzorku

A_s = plocha elučního pásu dusičnanů ve standardním roztoku

b = hmotnost vzorku (g)

Poznámka

Na rozdíl od amoniaku a dusitanů nejsou nitráty pro rostliny toxické, a proto se v nich mohou hromadit i ve značném množství. K rostlinám s přirozenou vysokou kumulací dusičnanů patří i chmel, přičemž nejvíce nitrátů obsahují hlávky. Při své velmi dobré rozpustnosti ve vodě přechází dusičnany snadno při chmelovaru do mladiny a posléze i do piva. V závislosti na povětrnostních a půdních podmínkách pěstování se obsah dusičnanů ve chmelových hlávkách pohybuje v rozmezí 0,5 až 1,5 % hm., tj. 5 až 15 tisíc miligramů/kg. Četné analýzy v různých odrůdách chmele ukázaly, že aromatické odrůdy mají tendenci zvýšeného obsahu dusičnanů v porovnání s odrůdami vysokoobsažnými (Krofta et al., 2008). Za zvýšenou hladinu dusičnanů se považují obsahy vyšší než 10 tisíc mg/kg. Uvedenou hranici mají některé pivovary zavedenu jako kvalitativní parametr pro nákup chmele.

2.6.2 STANOVENÍ OBSAHU REZIDUÍ PESTICIDŮ VE CHMELU

Ochrana chmele proti mšici chmelové, svilušce chmelové a houbovým chorobám je již delší dobu řešena téměř výlučně aplikací poměrně úzkého spektra aficidů, akaricidů a fungicidů. Kromě reálné možnosti rychlého vzniku a nárůstu rezistence k těmto přípravkům je celá situace v posledním desetiletí komplikována omezeními, vyplývajícími z importních tolerancí reziduí pesticidů v zemích exportu českého chmele (Bryant, 2001). Aktuální limity reziduí pro suchý chmel platné pro Českou republiku, Německo, USA, Japonsko a EU jsou uvedeny v tabulce 5. Registrace nových přípravků, především v USA a Německu, a stanovení MRL (Maximum Residue Level) je poměrně zdoluhavý a nákladný proces. Limity MRL akceptují i pivovary, které při nákupu chmele vyžadují deklaraci obsahu reziduí vybraného spektra pesticidů. Reziduální limity jsou součástí jejich systému managementu jakosti. Chmelařský institut ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou každoročně vydává „Metodiku ochrany chmele“, ve které jsou pro nadcházející vegetační sezónu specifikovány pesticidy, které je možné použít pro jednotlivé patogenní organismy. Doporučovány jsou pouze takové přípravky, které kromě toho, že splňují požadavky exportu (importní tolerance), také vykazují vysoký stupeň biologické účinnosti na cílové škodlivé organismy. V neposlední řadě se stále více zohledňuje hledisko negativního vlivu používaných pesticidů na užitečné organismy.

Analytické postupy stanovení reziduí pesticidů se liší dle povahy účinné látky. Přestože byla vypracována řada multireziduálních metod, vyžaduje analýza pesticidů ve chmelu v mnoha případech individuální přístup. Chmel z tohoto pohledu patří mezi velmi náročné matrice, protože obsahuje velké množství sekundárních metabolitů, které mohou stanovení rušit, a je proto nezbytné je oddělit. Nutná separace může však vést ke ztrátám analytu, což vede ke zhoršení detekčních limitů celé analýzy. Obecně lze analytický postup stanovení reziduí pesticidů rozdělit na několik fází:

- a) extrakce účinné látky (analytu) z rostlinné hmoty
- b) separace balastních látek, čištění extraktu
- c) analytické stanovení

Analytické stanovení se provádí nejčastěji pomocí plynové a kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostními detektory. Hmotnostní spektrum je vedle elučního času důležitým identifikačním nástrojem stanovované látky. Často používané jsou rovněž selektivní detektory, které detekují přítomnost heteroatomů v molekule účinné látky pesticidu (dusík, fosfor, síra, halogeny).

Tabulka 5: Limity reziduí pro suchý chmel MRL v ppm (mg/kg), stav k 31.12.2008

fungicidy

| Účinná látka | Přípravek | ČR | SRN | USA | Japonsko | EU |
|------------------------|---------------------------|------|------|-------------|----------|----|
| azoxystrobin | Ortiva | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| cymoxanil | Curzate K | 2 | | | 2 | |
| fosetyl-al | Aliette 80 WP | 100 | 100 | 45 | 1440 | |
| měďnaté přípravky (cu) | Přípravky s Cu | 1000 | 1000 | nestanoveno | | |
| metalaxyl | Ridomil Gold Plus 42,5 WP | 10 | 10 | 20 | 10 | 10 |
| quinoxifen | IQ-Crystal | 1 | 1 | 3 | 1 | |
| síra | Síraté přípravky | 50 | | nestanoveno | | |
| tebuconazol | Horizon 250 EW | 30 | 30 | 4 | 30 | |
| triadimenol | Bayfidan 250 EC | 10 | 15 | | 5 | |

aficidy a akaricidy

| | | | | | | |
|--------------------|--------------------|------|------|-----|-------|------|
| acetamiprid | Mospilan 20 SP | 2 | | | | 0,1 |
| alpha-cypermethrin | Vaztak 10 EC,10 SC | 30 | 30 | | 20 | |
| bifenthrin | Talstar | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| fipronil | Regent 800 WG | 0,01 | | | 0,002 | |
| imidacloprid | Confidor 70 WG | 2 | 2 | 6 | 10 | |
| lambda-cyhalothrin | Karate Zeon | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| pymetrozine | Chess 25 WP | 5 | 5 | 6 | 6 | 15 |
| abamectin | Vertimec 1,8 EC | 0,05 | 0,05 | 0,2 | 0,1 | 0,05 |
| fenpyroximate | Ortus 5 SC | 10 | 10 | 10 | 15 | |
| hexythiazox | Nissorun 10 WP | 3 | 3 | 2 | 30 | |
| propargite | Omite 30 W | 30 | 30 | 30 | 100 | |

herbicidy

| | | | | | | |
|-------------------|------------------------------|-----|------|-------------|------|--|
| cyanamid | Alzodef | 0,1 | 0,2 | nestanoveno | | |
| diquat | Reglone | 0,1 | 0,05 | 0,02 | 0,04 | |
| fluazifop-P-butyl | Fusilade Forte 150 EC | 0,1 | 0,1 | | 0,05 | |
| glyphosate | Roundup Biaktiv | 0,1 | 0,1 | 7 | 0,1 | |
| linuron | Afalon 45 SC | 0,1 | 0,1 | | 0,02 | |
| mcpa | Aminex, Agritox, Dicopur aj. | 0,1 | | | | |

Poznámka:

Přípravky, které nejsou uvedeny v japonském seznamu použitelných chemikálií, mají pro tuto zemi stanoven jednotný limit 0,01 ppm. Hodnoty nižší než 0,01 ppm jsou tak nízké, že daný přípravek nelze prakticky bez rizika použít.

III. ZDŮVODNĚNÍ NOVÝCH METODICKÝCH POSTUPŮ

Metodika „Hodnocení kvality chmele“ specifikuje principy, postupy a metody hodnocení kvality chmele a chmelových výrobků v několika fázích od sklizně do zpracování na chmelové výrobky a prodej zákazníkům v návaznosti na platné právní předpisy. Znamé analytické postupy jsou na základě praktických zkušeností doplněny o hodnocení předností, nedostatků a omezení. Metodika je použitelná v podnikových laboratořích jako podrobný nástroj zjišťování nejdůležitějších kvalitativních parametrů chmele. Předkládá aktuální údaje o obsahu a složení nejdůležitějších sekundárních metabolitů v českých odrůdách chmele a přípustné hladiny reziduí účinných látek pesticidů používaných v chemické ochraně. Uživatelům z řad pěstitelů, obchodníků i sládků umožňuje orientovat se v analytických metodách hodnocení chmele a chmelových výrobků a volit nejvhodnější postupy adekvátní účelu. Na základě výsledků chemických analýz lze s vysokou pravděpodobností určit identitu odrůdy a stupeň stárnutí chmele, ke kterému při skladování a zpracování zákonitě dochází.

IV. ZÁVĚR A POPIS UPLATNĚNÍ

Předložená metodika uceleným způsobem specifikuje principy, postupy a základní metody hodnocení kvality chmele a chmelových výrobků od sklizně přes zpracování na chmelové výrobky a prodej zákazníkům. Největší důraz je kladen na stanovení alfa kyselin. Ucelený soubor nejpoužívanějších metod hodnocení chmele nebyl dosud nikde publikován. V metodice jsou uvedeny jejich přednosti, nedostatky a omezení. Metodika najde uplatnění ve chmelářských a pivovarských laboratořích při volbě vhodných metod hodnocení chmele a řešení konkrétních aplikací, jako je například určení identity neznámé odrůdy či zjištění stupně stárnutí chmele. Jednoduché konduktometrické metody stanovení alfa kyselin lze například využít pro výukové účely v odborných školách nebo ke kontrole kvality v zemědělských podnicích. Pomocí metod uvedených v metodice lze s velkou mírou pravděpodobnosti určit identitu všech českých odrůd chmele. Uplatnění metodiky v praxi je garantováno smlouvou mezi řešitelským pracovištěm a Svazem pěstitelů chmele ČR.

V. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ANALYTICA EBC, (1998). 5th edition, European Brewery Convention, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, SRN.
- ASBC Methods of Analysis, (1992). American Society of Brewing Chemists: St. Paul, MN.
- ATLAS ČESKÝCH ODRŮD CHMELE, 2007, Chmelařský institut s.r.o., Žatec, ISBN 978-80-86836-15-7.
- BARBORKA, V., (2008). Testování nového systému certifikace chmele. Chmelařská ročenka 2008, str. 58-59. ISBN 80-86576-27-2.
- BRYANT, B., GEORGE, A.E., (2001). Raising International Coordination to its Next level. Proceedings of the Scientific Commission IHGC, Canterbury, England, 2001. 1-3.
- CLAUS, H., VAN DYCK, J., VERZELE, M., (1978). Photometric constants of hop bitter acids. J. Inst. Brew. Vol. 84, 218-220.
- ČSN 46 2520 „Zkoušení chmele“. Český normalizační institut, Praha, 1994.
- FORSTER, A.,(1987). Conductometric methods for hops and hop products. EBC Monograph XIII, Symposium on Hop. Freising-Weihenstephan, 84-99.
- GANZLIN, G.,(1975). Zur Analyse von Hopfen und Pellets aus Hopfenpräparaten – Vereinfachung der Extraktionsmethode. Brauwissenschaft, 28, 231-239.
- GREEN, C.P., OSBORNE, P., (1993). Effects of solvent quality on the analysis of hops. J. Inst. Brew. Vol. 99, 223-225.
- HERMANS-LOKKERBOL, A.C.J., VERPORTE, R., (1994). Development and validation of a high-performance liquid chromatography system for the analysis of hop bitter acids. J. Chrom. A, 669, 65-73.
- KATSIOTIS, S.T., LANGEZAAL, C.R., SCHEFFER, J.J.C., (1989). Comparative Study of the Essential Oils from Hops of Various Humulus lupulus L. Cultivars. Flavour and Fragrance J. 4, 187-191.
- KRALJ, D., ZUPANEC, J., (1991). Variability of Essential Oils of Hops, Humulus Lupulus L. J. Inst. Brew., 97, 197-206.
- KROFTA, K., KLAPAL, I., KOPECKÝ, J., TICHÁ, J., (2007). Hodnocení kvalitativních ukazatelů českých chmelů ze sklizně 2006. Chmelařství 80, 56-63.

- KROFTA, K., KOPECKÝ, J., JEŽEK, J., (2008). K problematice dusičnanů ve chmelu. Sborník ze semináře „Technologie pěstování chmele“, Chmelařský institut s.r.o., Žatec, str. 4-15. ISBN 978-80-86836-27-0.
- KROFTA, K., (1994). Vzorkování chmele. Chmelařství, 67, 125-129.
- KROFTA, K., (2002). Obsah a složení chmelových pryskyřic žateckých chmelů z pohledu jejich pivovarské hodnoty. Disertační práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- KROFTA, K., (2003). Obsah xanthohumolu v českých chmelech. Kvasný průmysl, 49, 62-69.
- KROFTA, K., ČEPIČKA, J., (2000). Stanovení chmelových silic metodou mikroextrakce na tuhou fázi (SPME). Kvasný průmysl, 46, 235-241.
- LIKENS, S.T., NICKERSON, G.B., ZIMMERMANN, C.E., (1970). An Index of Deterioration in Hops. Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, 68-74.
- ONO, M., KAKUDO, Y., YAMAMOTO, Y., (1984). Quantitative Analysis of Hop Bittering Components, its Application to Hop Evaluation. J. Am. Soc. Brew. Chem., 42, 167-172.
- SCHUR, F., (2000). Qualitätsanforderungen an Hopfen unter besonderer Berücksichtigung der Alphasäuren. Brauwelt, 35, 1394-1400.
- SHARPE, F.R., LAWS, D.R.J., (1981). The essential oil of hops, a review. J. Inst. Brew. 87, 96-107.
- STEVENS, J.F. et al., (1997). Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. Phytochemistry, 44, 1575-1585.
- VERZELE, M., VAN DYCK, J., (1971). Analytical Evaluation of alpha acids in hop extracts and in hops. J. Inst. Brew. Vol. 77, 529-538.
- VERZELE, M., VAN DYCK, J., CLAUS, H., (1980). On the analysis of hop bitter acid. J. Inst. Brew. Vol. 86, 9-14.

VI. PUBLIKACE, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Metodice nepředcházely žádné originální publikace.

VII. ABSTRAKT

Kvalita chmele je posuzována v několika úrovních od sklizně přes zpracování až po dodávku zpracovaného chmele zákazníkům, kterými jsou především domácí a zahraniční pivovary. V metodice jsou popsány nejdůležitější analytické metody, používané k hodnocení kvality chmele, uvedeny jejich přednosti, nedostatky a omezení. Důraz je kladen zejména na stanovení obsahu alfa kyselin, nejdůležitějšího kvalitativního parametru chmele, který lze stanovit několika způsoby s odlišným výsledkem. Důležitou součástí je pojednání o nežádoucích a cizorodých látkách ve chmelu, jejichž obsah je mnohdy limitujícím faktorem prodeje. Uživatelům z řad pěstitelů, obchodníků i sládků umožňuje orientovat se v analytických metodách hodnocení chmele a chmelových výrobků a volit nejvhodnější postupy adekvátní účelu. Na základě výsledků chemických analýz lze s vysokou pravděpodobností určit identitu odrůdy a stupeň stárnutí chmele, ke kterému při skladování a zpracování zákonitě dochází.

ABSTRACT

The quality of hops is assessed in several levels since the crop harvest till the delivery of processed hops to customers, which are predominantly domestic and foreign breweries. In the methodology there are described most important analytical methods used to evaluation of hops quality, discussed their advantages, disadvantages and limitations. The stress is put on determination of alpha acid contents, the most important quality parameter of hops, that can be performed by several ways with different result. An important part of methodology is disquisition about undesirable and heterogeneous substances in hops, that are often limiting factor of the sale. It enables to growers, merchants and brewers to orient in analytical methods of hops and hop products evaluation and use the most suitable procedure corresponding to its purpose. On the basis of chemical analyses results the identity of variety can be determined with high level of probability and degree of hops ageing, that naturally occurs during processing and storage.

CHMELAŘSKÝ INSTITUT s. r. o.

HOP RESEARCH INSTITUTE Co., Ltd.



Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

Tel.: +420 415 732 111 Jednatel: Ing. Jiří Kořen, PhD.

Fax: +420 415 732 150 Tel.: +420 415 732 133

Internet: www.chizatec.cz E-mail: jiri.koren@telecom.cz

Vědeckovýzkumná činnost

- Šlechtění chmele
- Chemie chmele
- Agrotechnika chmele
- Ochrana chmele
- Biotechnologie
- Pokusný pivovárek

Poradenská a školicí činnost

Výroba chmele

Výroba chmelové sadby

- Žatecký poloraný červeňák
- Hybridní odrůdy

Zemědělská výroba

Obchodní činnost



Certifikace dle ČSN EN ISO 9001:2001

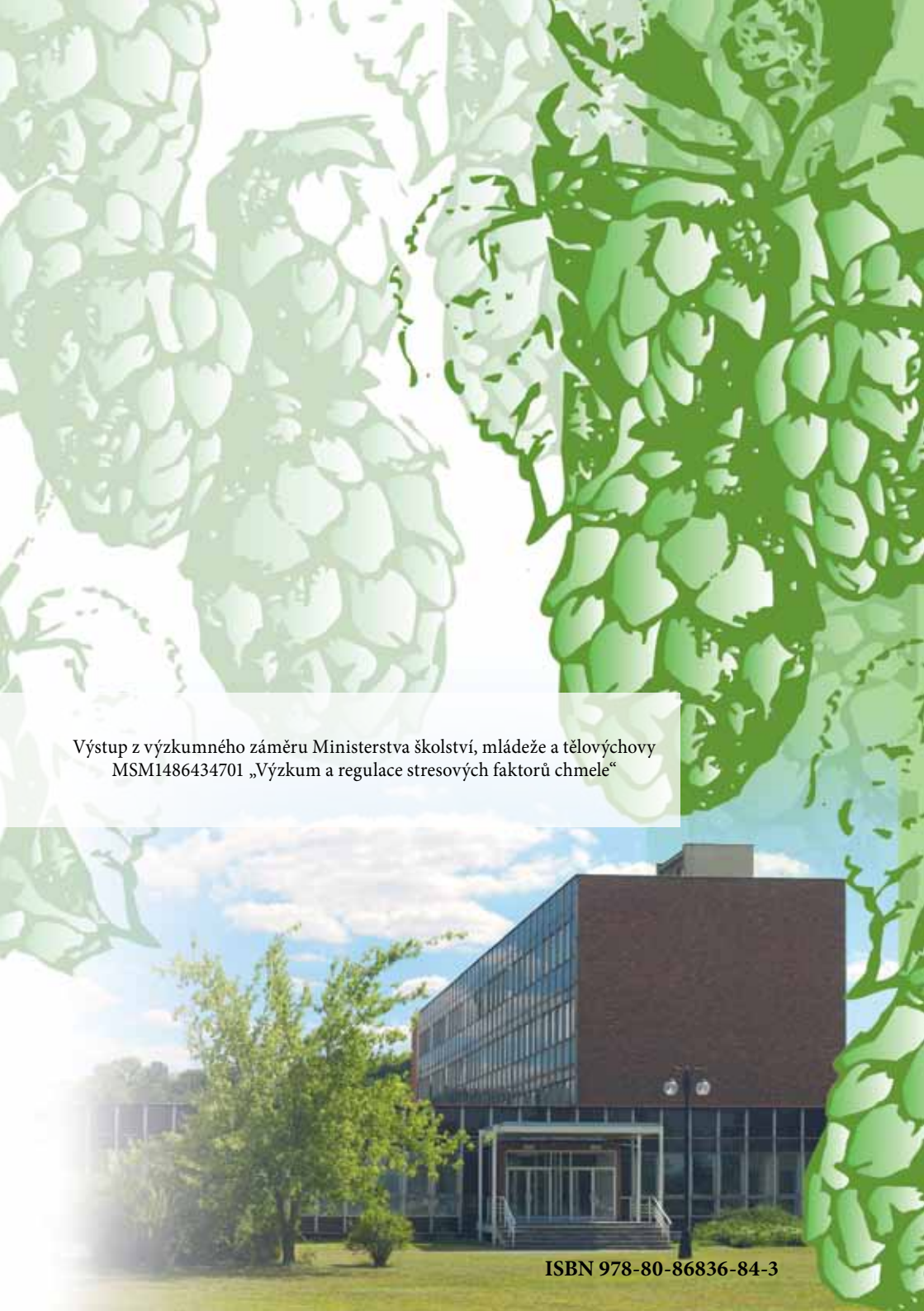
Účelové hospodářství Stekník

Tel.: +420 415 735 861


Fax: +420 415 725 334

Výzkumná stanice Tršice

Tel.: +420 585 957 237



Výstup z výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy
MSM1486434701 „Výzkum a regulace stresových faktorů chmele“



ISBN 978-80-86836-84-3