 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd 50246.1 – Stanovení obsahu alfa a beta hořkých kyselin v chmelu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU ALFA A BETA HOŘKÝCH KYSELIN V CHMELU METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení alfa a beta chmelových hořkých kyselin metodou HPLC v hlávkovém i mletém chmelu, chmelových peletách a běžných chmelových extraktech.

2 Princip

Alfa a beta hořké kyseliny se extrahují z chmele a chmelových produktů směsí diethylether-methanol a kyseliny chlorovodíkové. Hořké kyseliny (chmelové pryskyřice) vyextrahované do organické fáze, se dělí na chromatografické HPLC koloně s reverzní fází a detekují se spektrofotometricky při vlnové délce 314 nm.

3 Chemikálie

Používají se pouze chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Diethylether bez peroxidů.
- 2 Methanol.
- 3 Methanol, HPLC grade.
- 4 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , 85%, $\rho(H_3PO_4) = 1,71$ g/ml.
- 5 Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok, $c(HCl) = 0,1$ mol/l.
- 6 Mobilní fáze.

Příprava: Smíchá se methanol (3), voda (8) a kyselina fosforečná (4) v poměru 85 : 17 : 0,25 (v/v/v). Podle počtu vzorků se připravuje objem mobilní fáze zpravidla 500 ml až 1000 ml.

- 7 Chmelový extrakt o standardním složení jako vnější standard se známým obsahem alfa a beta hořkých kyselin, od komerčně ověřeného výrobce, např. standard ICE-4, Labor Veritas, Švýcarsko.
- 8 Voda, čistota HPLC.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Laboratorní odstředivý mlýnek s délkou oka síta 1 mm.
- 2 Laboratorní třepačka.
- 3 Laboratorní váhy s přesností 1 mg.
- 4 Skleněné tmavé láhve se šroubovacím uzávěrem, 250 ml.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd 50246.1 – Stanovení obsahu alfa a beta hořkých kyselin v chmelu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

- 5 Kapalinový chromatograf s UV nebo DAD detektorem.
- 6 HPLC analytická kolona s RP18 plněná oktadecylsilikagelem, (125 × 4) mm nebo (250 × 4) mm, zrnitost (3 – 5) μm, např. Nucleosil nebo Nucleodur 5 C18 Macherey-Nagel, Purospher STAR Merck, Zorbax Extend Agilent apod.
- 7 HPLC předkolona k ochraně analytické kolony. Náplň předkolony musí být totožná s náplní analytické kolony.
- 8 Ultrazvuková lázeň.
- 9 Odstředivka laboratorní.
- 10 Suchý skládaný filtr střední hustoty.

5 Postup

5.1 Příprava standardního roztoku extraktu pro kalibraci

Certifikovaný chmelový extrakt (7) se nejprve zhomogenizuje (promíchá špachtlí) a pak se odváží takové množství, které obsahuje zhruba 0,5 g všech hořkých kyselin.

Odvážený certifikovaný chmelový extrakt (7) se vloží do 50ml kádinky, přidá se 30 ml methanolu (2) a v ultrazvukové lázni se extrakt rozpustí. Roztok se kvantitativně převede do 100ml odměrné baňky a doplní methanolem (2) po značku. Obsah baňky se dokonale promíchá. Pak se z tohoto roztoku odpipetuje 10 ml do 50ml odměrné baňky, doplní methanolem (2) po značku a znovu důkladně promíchá, následně se přefiltruje nebo odstředí. Při uchování v temnu a chladu (v ledničce) je roztok stabilní 24 h.

5.2 Příprava vzorku


Chmel, výrobky z mletého chmele a chmelový extrakt

Chmel se upraví mletím tak, aby prošel sítím s velikostí ok 1 mm.

Odváží se 10 g jemně mletého vzorku s přesností na 0,1 g (m_s), chmel se přenese do 250ml tmavé skleněné láhve (4). Přidá se 20 ml methanolu (2) a 100 ml ethyletheru (1). Láhev (4) se pevně uzavře a intenzivně 30 min třepe. Poté se láhev opatrně otevře a přidá se 40 ml kyseliny chlorovodíkové (5). Poté se opět 10 min intenzivně třepe. Po vytřepávání se nechá baňka asi 10 min stát v klidu, aby se oddělily vodná a organická fáze. Do 50ml odměrné baňky se odpipetuje 5 ml z horní organické fáze a doplní methanolem (2) po značku. Obsah odměrné baňky se opatrně promíchá a poté opět zfiltruje nebo odstředí. Takto připravený roztok lze použít na chromatografické stanovení. Při skladování v temnu a chladu (v ledničce) je roztok stabilní 24 h. Chmelový extrakt se připravuje stejným způsobem jako kalibrační extrakt (podle bodu 5.1).

5.3 Chromatografické stanovení

Kalibrační roztoky i extrakty kalibračních roztoků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému. Uvedené podmínky jsou doporučeny, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky:

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd 50246.1 – Stanovení obsahu alfa a beta hořkých kyselin v chmelu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

Průtok mobilní fáze se nastaví na 0,8 ml/min, UV detektor na 314 nm. HPLC kolonu i předkolonu je nutné před prvním nástřikem kondicionovat průtokem mobilní fáze po dobu minimálně 30 min. Objem nástřiku je 10 µl. Příklad chromatogramu chmelových pryskyřic je na obrázku 1.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Metoda výpočtu s vnějším standardem

Koncentrace jednotlivých složek C_i ve vzorku v % (m/m) – kohumulon, n-humulon a adhumulon, kolupulon, n-lupulon a adlupulon, se vypočítá podle vztahu

$$C_i = \frac{DF \times m_{cs} \times C_{ic} \times A_i}{m_s \times A_{ic}}$$

kde DF je faktor ředění, DF = 1 pro chmelové extrakty, DF = 2 pro chmel a produkty z mletého chmele,

m_{cs} navážka kalibračního extraktu v g,

C_{ic} koncentrace složky i v kalibračním roztoku v % (m/m),

A_i plocha píku složky i ve vzorku (průměrná hodnota),

m_s navážka vzorku v g,

A_{ic} plocha píku složky i v kalibračním roztoku (průměrná hodnota).

6.2 Obsah alfa a beta hořkých kyselin


Obsah alfa hořkých kyselin ve vzorku (C_α) se vyjádří jako součet hmotnosti celkového obsahu jednotlivých analogů alfa hořkých kyselin (viz C_i v bodě 6.1) – kohumulonu (C_{c-h}) a n-humulonu + adhumulon (C_{n+ad-h})

$$C_\alpha = C_{c-h} + C_{n+ad-h}$$

Stejným způsobem se vyjádří i celkový obsah hořkých kyselin (C_β) jako celkový obsah kolupulon (C_{c-1}) a n-lupulon + adlupulon (C_{n+ad-1}).

$$C_\beta = C_{c-1} + C_{n+ad-1}$$

Obsah alfa a beta hořkých kyselin se vyjadřuje v % (m/m) s přesností na jedno desetinné místo.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd	Vydání	1
	50246.1 – Stanovení obsahu alfa a beta hořkých kyselin v chmelu metodou HPLC	Revize	0

Poznámky

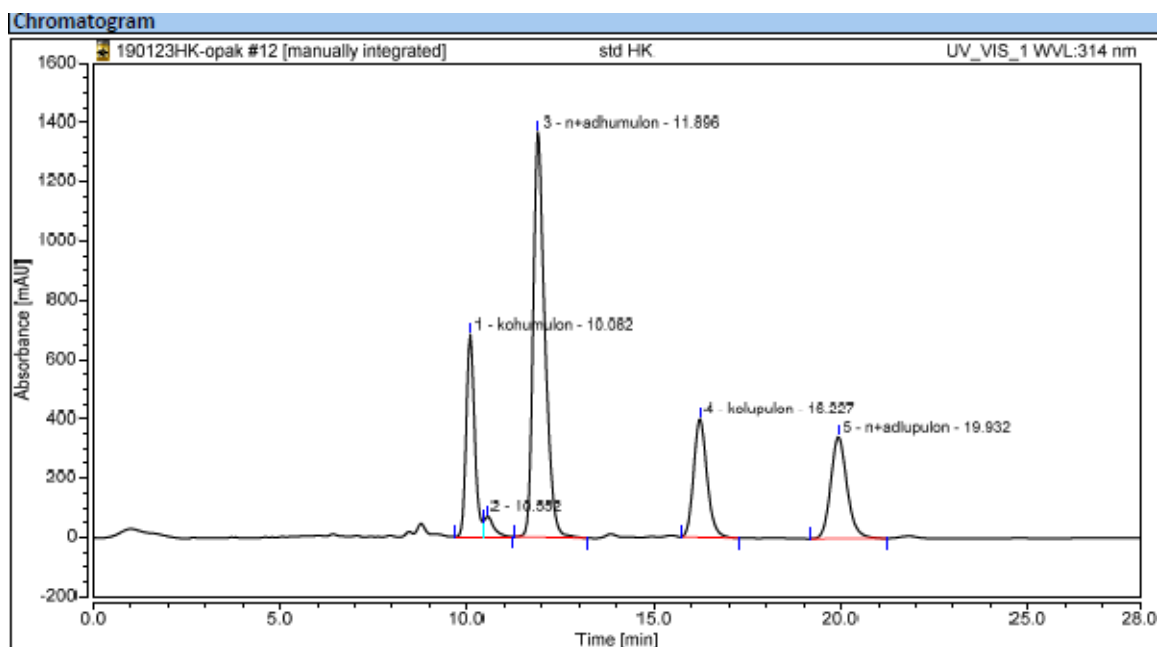
- 1 Za píkem kohumulonu se na chromatogramu objevuje malý pík, který je důležitý pro ověření správného a dostačujícího dělení jednotlivých složek alfa kyselin. Tento malý pík musí být od kohumulonu oddělen. Nedostatečné dělení se nejvíce projeví právě u těchto dvou píků. Účinnost dělení lze zlepšit změnou podílu vody v mobilní fázi.
- 2 Kohumulon má retenční čas přibližně 10 min, n-humulon a adhumulon 12 min. Kolupulon má retenční čas okolo 16 min, n-lupulon a adlupulon přibližně 20 min (obr. 1).

7 Opakovatelnost

	Alfa hořké kyseliny	Beta hořké kyseliny
Chmel a mleté chmelové produkty	3 % abs.	4 % abs.
Chmelové extrakty	2 % abs.	3 % abs.

8 Literatura

- 1 ČSN 46 2520, část 17 – Zkoušení chmele. Stanovení alfa a beta hořkých kyselin metodou HPLC.



Obr. 1. Příklad chromatogramu chmelových pryskyřic.