	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b>  50247.1 – Stanovení podílu myrcenu a $\beta$ -farnesenu v chmelové silici metodou kapilární plynové chromatografie	Vydání	1
		Revize	0

## STANOVENÍ PODÍLU MYRCENU A $\beta$ -FARNESENU V CHMELOVÉ SILICI METODOU KAPILÁRNÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

### 1 Účel a rozsah

Uvedeným postupem se stanoví podíl myrcenu a  $\beta$ -farnesenu v chmelových silicích a jejich složení v sušeném hlávkovém chmelu a dalších chmelových produktech ve formě pelet a granulí.

### 2 Princip

Silice vytěkají v průběhu destilace vzorku chmele vodní parou. Z destilační aparatury se získají pomocí směsi diethylether-hexan a zakoncentrují pod proudem dusíku na příslušný objem. V takto připraveném vzorku se hledané látky stanoví metodou kapilární plynové chromatografie s využitím plamenově-ionizačního detektoru.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Hexan,  $C_6H_{14}$ .
- 3 Diethylether,  $C_4H_{10}O$ .
- 4 Směs diethylether – hexan (1 : 1).

Příprava: V 1000ml odměrném válci se odměří 500 ml hexanu (2) a do 1000 ml se doplní diethyletherem (3). Připravená směs se přeleje do litrové tmavé lahve a skladuje se v temnu.

- 5 Síran sodný bezvodý,  $Na_2SO_4$  anhydrous.
- 6 Myrcen, analytický standard,  $C_{10}H_{16}$ .
- 7 Farnesen, trans-beta, analytický standard,  $C_{15}H_{24}$ .

### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Aparatura na destilaci silic.
- 2 Topné hnízdo.
- 3 Plynový chromatograf s detektorem FID.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b>  50247.1 – Stanovení podílu myrcenu a $\beta$ -farnesenu v chmelové silici metodou kapilární plynové chromatografie	Vydání	1
		Revize	0

- 4 Nepolární kapilární kolona s 5 % phenyl polydimethylsiloxanu ve stacionární fázi (např. ZB-5), 30 m  $\times$  0,25 mm, tloušťka filmu 0,25  $\mu$ m.
- 5 Varné baňky, 2000 ml
- 6 Injekční stříkačka, 10  $\mu$ l.
- 7 Vialky se šroubovacím uzávěrem, tmavé, 2 ml.
- 8 Laboratorní odstředivý mlýnek s délkou oka síta 1 mm.
- 9 Laboratorní váhy s přesností 1 g.
- 10 Odměrný válec, 1000 ml.


## 5 Postup

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

Do 2000ml varné baňky se zábrusem se naváží přibližně 50 g čerstvě pomletého vzorku chmele. Odměrným válcem se přidá 1000 ml vody (1). Baňka se umístí do topného hnízda, připojí k aparatuře na destilaci silice a začne se zahřívat. Od počátku varu se pokračuje v destilaci 15 až 30 min. Po ukončení destilace se vypne topné hnízdo a varná baňka se nechá zchladnout. Voda z aparatury se odpustí a vydestilovaná silice se zachytí do 50ml kádinky. Aparatura se vypláchne směsí diethyléter-hexan (4) do téže kádinky. Silice v kádince se zakoncentrují odpařením pod proudem dusíku na objem přibližně 2 ml. Zakoncentrovaný vzorek silic se přelije do vialky a uzavře se víčkem s teflonovým septem. Takto připravený vzorek se používá přímo k nástřiku do plynového chromatografu.

## 6 Měření

Vlastní analýza se provádí na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Pro separaci jednotlivých složek chmelové silice se použije kapilární kolona s nepolární stacionární fází na bázi dimethylpolysiloxanu s 5 % fenylu. Příklad nastavení chromatografických podmínek je uveden v tabulce č. 1. Uvedené podmínky jsou doporučeny, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3	
	<b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b>		Vydání	1
	50247.1 – Stanovení podílu myrcenu a $\beta$ -farnesenu v chmelové silici metodou kapilární plynové chromatografie		Revize	0

**Tabulka č. 1. Chromatografické podmínky – příklad.**

<b>Plynový chromatograf</b>	GC Agilent 6890N
<b>Kapilární kolona</b>	ZB-5 (30 m $\times$ 0,25 mm, film 0,25 $\mu$ m)
<b>Nosný plyn</b>	Dusík
<b>Průtok nosného plynu</b>	1 ml/min
<b>Teplota injektoru</b>	220 °C
<b>Teplota detektoru</b>	220 °C
<b>Teplotní program</b>	60 °C, 5 min (izotermie) 2 °C/min na 150 °C (gradient) 5 °C/min na 220 °C (gradient) 220°C, 15 min (izotermie)
<b>Objem nástřiku, dávkování</b>	1 $\mu$ l, split 1 : 50

**Tabulka 2. Retenční časy hlavních složek chmelové silice žateckého poloraného červeňáku za chromatografických podmínek uvedených v tabulce 1.**


Analyt	$t_R$ (min)
myrcen	13,5
karyofylen	40,9
$\beta$ -farnesen	43,0
$\alpha$ -humulen	43,3
$\alpha$ -selinen	45,0
$\beta$ -selinen	45,5

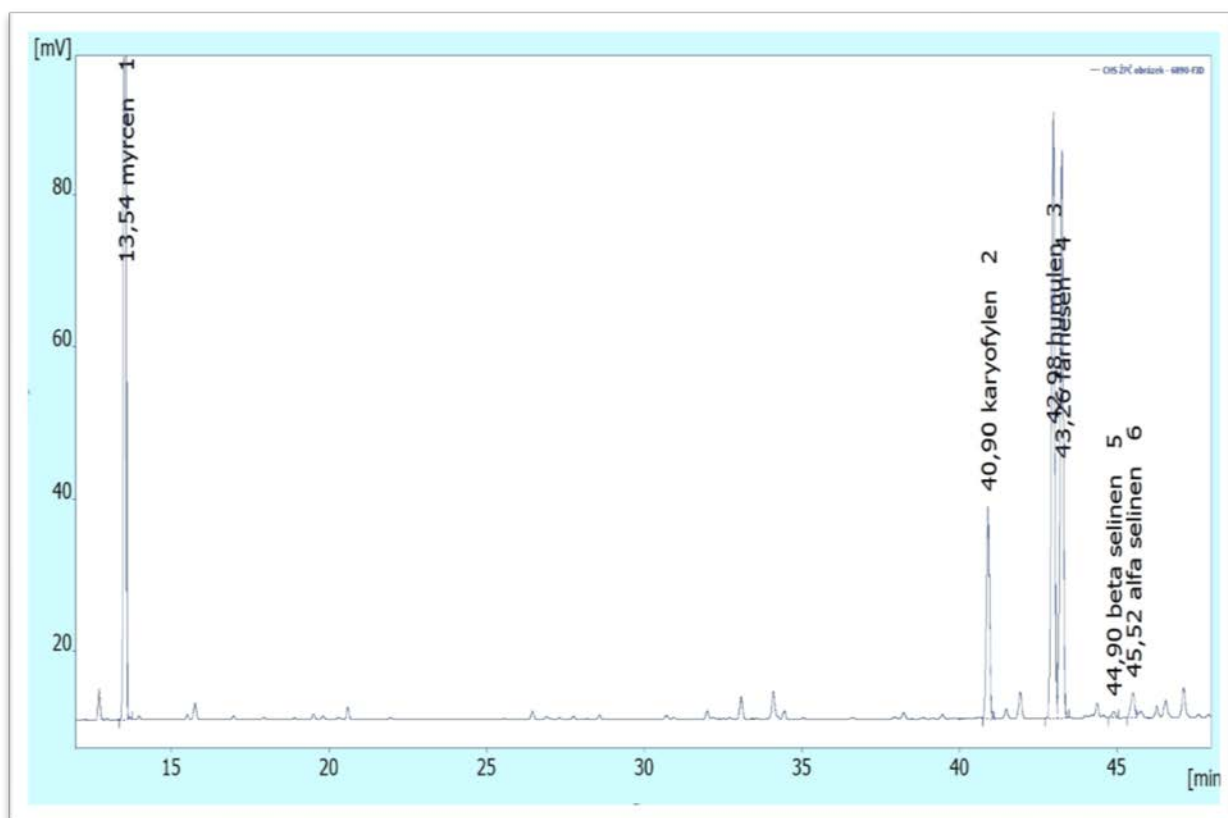
## 7 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Píky myrcenu,  $\beta$ -farnesenu, případně dalších látek obsažených v chmelové silici ( $\alpha$ -humulen,  $\alpha$  +  $\beta$  selinen,  $\beta$ -karyofylen atd.), se identifikují na základě jejich retenčních časů porovnáním s retenčními časy píků standardních látek.

Pro kvantitativní vyhodnocení se používá metoda vnitřní normalizace, tj. za předpokladu, že všechny složky vzorku jsou zaznamenány na chromatogramu, představuje celková plocha píků 100 % (celková eluce). Podíl myrcenu a  $\beta$ -farnesenu podle obsahu jejich píků vypočítá řídicí chromatografický software.

Příklad chromatogramu získaného při analýze vzorku chmelové silice je na obrázku č. 1.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b>	Vydání	1
		50247.1 – Stanovení podílu myrcenu a $\beta$ -farnesenu v chmelové silici metodou kapilární plynové chromatografie	Revize



**Obrázek č. 1. Chromatogram reálného vzorku chmelové silice Žateckého poloraného červeňáku.**

## 8 Literatura

- 1 Nesvadba, V., Polončíková, Z., Henychová, A., Krofta, K., Patzak J., 2012. Atlas českých odrůd chmele. CHI Žatec. ISBN 978-80-87357-11-8.
- 2 Pokorná, T.: Diplomová práce: Chmelové silice a možnosti jejich využití, MU Brno-Fakulta agronomická, 2015.
- 3 Zlochová, T.: Bakalářská práce: Stanovení senzoryicky aktivních látek ve chmelu metodou GC-MS, UK Praha, Přírodovědecká fakulta, 2017.
- 4 Centner, V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0.
- 5 ČSN 46 2520, část 12 – Zkoušení chmele. Stanovení chmelových silic a z toho farnesenu.
- 6 Krofta, K., Patzak, J.: Zjišťování autenticity českých odrůd chmele pomocí chemických a molekulárně genetických analýz. Kvasný průmysl 57/2011 (7-8).