

## OPTIMALIZATION OF METHODS SUITABLE FOR ASSESSMENT OF VOLATILES IN BEER

### OPTIMALIZACE METOD VHODNÝCH PRO STANOVENÍ TĚKAVÝCH LÁTEK V PIVU

**Kleinová J., Klejduš B.**

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: kleinovaja@seznam.cz

---

#### ABSTRACT

The name of this thesis “Optimalization of methods suitable for assessment of volatiles in beer“ expresses the methods and the aims of research. In great detail it determines the optimal method of chromatographic analysis and the most suitable way of preparing sample for analysis by gas chromatography. For assessment of the most suitable stationary phase of gas chromatography was tested column DB WAX and DB5. Next was to determine the most suitable temperature program for effective separation of analysed substance. Detection of analyses was made on flame ionized detector and mass spectrometer. For separation volatiles from matrix and for their preconcentration was tested liquid extraction and headspace solid phase microextraction (SPME), which was also compared with analysis of gaseous phase without using extraction. SPME, which was showed as the most useful, had more attention. Volatiles were isolated with different combination of sorbents, sorption was at various temperatures, they were also examined with the addition of salt in the sample and using ultrasonic bath.

**Key words:** beer, volatiles, solid phase microextraction, gas chromatography,

**Acknowledgments:** This study was supported by the Internal Grant Agency, AF MENDELU, IP 15/2011.

## ÚVOD

Těkavé látky v pivu jsou sloučeniny, které se významně podílí na organoleptických vlastnostech nápoje a kvalitu výrobku tak ovlivňují jak v kladném, tak záporném smyslu. Mezi nejpočetnější skupinu látek s nízkým bodem varu v pivu patří alkoholy, kterých je v pivu stanoveno přibližně 80. Z vedlejších produktů kvašení vznikají v nejvyšších koncentracích. V menším množství jsou v pivu obsaženy estery, které se z alkoholů tvoří. V pivu se jich nachází zhruba 150 a jsou senzoričky aktivnější. Organických kyselin je v pivu obsaženo přibližně 200 a na rozdíl od alkoholů a esterů je řada zejména mastných kyselin přítomna již v mladině před počátkem kvašení. Jejich vyšší koncentrace nejsou vzhledem k jejich nepřijemné chuti a vůni v pivu žádoucí. Mezi další skupinu těkavých látek v pivu, které jsou v současnosti zkoumány, patří aldehydy, ketony, étery, acetal, sírné sloučeniny a další (ŠTĚRBA et al., 2011; SILVA et al., 2008).

Nejvhodnější technikou pro stanovení těkavých látek v pivu je plynová chromatografie. Vzhledem ke komplexní matici piva a velkému koncentračnímu rozpětí mezi stanovovanými látkami však není možné provést přímý nástřik do chromatografické kolony. Stanovované látky se nejprve izolují, případně zakoncentrují. Na přípravu vzorků je možné využít řadu postupů, jako je kapalinová extrakce, destilace, superkritická fluidní extrakce, extrakce tuhou fází, sorpční extrakce na míchací tyčince či headspace techniky. Přívlástek headspace je synonymem pro plynnou fázi nad vzorkem, kdy se využívá těkavosti analyzovaných látek. V uzavřeném prostoru je po čase vytvořena rovnováha mezi fázemi a analyty je možné odebírat nad vzorkem. Pokud je do headspace přiváděn pro zvýšení účinnosti inertní plyn, jedná se o dynamickou headspace. Pokud inertní plyn probublává vzorkem, jedná se o purge and trap analýzu. Těkavé analyty je možné sorbovat na sorbent v termodesorpční trubici, která je po stripovací fázi umístěna do termodesorpčního systému (CAJKA, 2010; KOLB, 1999).

Často využívanou technikou statické headspace je mikroextrakce na pevnou fázi (SPME), která má výhodu především v jednoduché instrumentaci. Při SPME se analyty sorbují malým množstvím extrakční fáze, kterou je potažen povrch křemenného vlákna. Sorpce probíhá do dosažení rovnovážného stavu. Množství extrahovaného analytu závisí na hodnotě rozdělovacího koeficientu analyt – vlákno. Křemenné vlákno je umístěno v duté ocelové jehle, která umožňuje jeho ochranu při manipulaci. Při sorpci je vlákno vysunuto přímo do vzorku nebo do plynné fáze nad vzorkem (headspace), což je pro analýzu těkavých látek v pivu vhodnější. Pokud je vzorek zahříván, je zajištěn dostatečný přestup těkavých látek na vlákno a při headspace nedochází ke znečišťování vlákna (WARDECKI et al., 2003; PAWLISZYN, 2000).

Cílem práce je optimalizovat zvolené metody přípravy vzorků. Vývoj metod umožní stanovit fingerprint těkavých látek v pivu, a tak rozlišit piva jednotlivých druhů a značek. Pomocí obsahu těkavých látek v pivu bude možné objektivně posoudit jeho kvalitu.

## MATERIÁL A METODIKA

Pro optimalizaci metody stanovení těkavých látek v pivu bylo použito lahvované pivo značky Starobrno s označením Starobrno Tradiční. Jedná se o světlé výčepní pivo plzeňského typu o obsahu alkoholu 4 % obj. Pokud není uvedeno jinak, byly vzorky pro analýzu připraveny z 5 ml piva a 2 g soli ve vialkách o objemu 15 ml. Poté se vzorky zahřívaly na topné desce (Labicom, Česká republika) na teplotu 50 °C po dobu 10 min a pak následovala 20 min headspace mikroextrakce na vlákno s 85 µm polydimethylsiloxanu (Supelco, USA). Chromatografická analýza probíhala na plynovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickým detektorem HP-6890 (Hewlett Packard, Německo). Těkavé látky se separovaly při průtoku helia 1 ml/min, teplotě nástřiku 250 °C a teplotním programem:  $T_1 = 40\text{ °C}$ ,  $t_1 = 5\text{ min}$ , 20 °C/min na  $T_2 = 250\text{ °C}$ ,  $t_2 = 5\text{ min}$ . Množství analyzovaného vzorku se neregulovalo děličem toku. Byla použita kolona HP-5MS (5 % difenyl - 95 % dimethylpolysiloxan, 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm) od Agilentu (USA). Každý vzorek byl vyhotoven a změřen třikrát. Identifikace látek probíhala pomocí knihovny spekter hmotnostního spektrometru.

Pro porovnání různých detektorů se vzorky dále analyzovaly na plynovém chromatografu HP-4890D s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID) od stejné firmy. Teplota detektoru byla nastavena na 240 °C. Na chromatografu GC-MS byly testovány další dvě kolony, a to DB WAX (polyethylenglykol, 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm) a HP-5MS s délkou 60 m (Agilent, USA).

V rámci optimalizace metody byly zkoumány teplotní režimy s pozvolnějším nárůstem teploty. Druhý teplotní program:  $T_1 = 40\text{ °C}$ ,  $t_1 = 5\text{ min}$ , 10 °C/min na  $T_2 = 270\text{ °C}$ ,  $t_2 = 5\text{ min}$  a třetí:  $T_1 = 40\text{ °C}$ ,  $t_1 = 5\text{ min}$ , 5 °C/min na  $T_2 = 200\text{ °C}$ ,  $t_2 = 5\text{ min}$ , 15 °C/min na  $T_3 = 250\text{ °C}$ ,  $t_3 = 1\text{ min}$ .

Ze separačních metod přípravy vzorku se testovala kapalinová extrakce s použitím rozpouštědel hexanu, ethylacetátu a dichlormethanu. Vzorky byly připraveny v 40 ml vialkách a obsahovaly vždy 30 ml piva a 10 ml rozpouštědla. Následovala extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Extrakt ve zkumavkách byl následně 5 min. centrifugován při 18000 ot/min, přičemž došlo k oddělení rozpouštědla od zbytku směsi.

Dále byla analyzována plynná fáze odebraná nad vzorkem bez použití SPME. Vzorek byl nejprve 30 min zahříván a pak bylo odebráno mikrostříkačkou Hamilton 25 µl plynné fáze, která byla okamžitě nástřiknuta do chromatografu.

U mikroextrakce na pevnou fázi (SPME) byly testovány sorbenty divinylbenzen (DVB), carboxen (CAR) a polydimethylsiloxan (PDMS) a to v kombinaci 85 µm DVB/CAR/PDMS, 85 µm PDMS/DVB a 85 µm CAR/PDMS (Supelco, USA).

## MENDELNET 2012

Při testování vlivu přídavku soli na mikroextrakci byl do vzorku o objemu 5 ml přidán chlorid sodný v množství 1, 2, 3, 4 a 5 g a vzorky se před analýzou ponechaly 24 hod v ledničce. Dále byl měřen vliv délky extrakce na zakoncentrování těkavých látek na SPME vlákno. Vzorky se vždy 10 min vyhřívaly a pak následovala 10, 20, 30, 40, 60, 90 a 120 min extrakce. Při zjišťování, jaký je nevhodnější objem vzorku, bylo do vialek o objemu 15 ml nalito 2,5; 5; 7,5; a 10 ml piva a analýza probíhala bez přídavku soli.

Pro optimalizaci použité teploty na extrakci těkavých látek byly vzorky zahřívány na topné desce a teplota vzorků byla měřena elektronickým kontaktním teploměrem. Teplota topné desky byla nastavena na 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 a 130 °C.

Pro určení nevhodnějšího objemu vialky byly použity vialky o objemu 15 (průměr 20 mm), 20 a 40 ml (průměr 23 mm). Do vialky o objemu 15 ml bylo odměřeno 5 a 10 ml piva, do 20 ml vialky 10 a 15 ml piva a do 40 ml vialky 20 a 30 ml piva. SPME sorpce probíhala při 70, 80 a 100 °C. Elektronickým kontaktním teploměrem byla měřena skutečná teplota vzorku a její změny způsobené změnou objemu vzorku.

V rámci optimalizace metody bylo hodnoceno zlepšení SPME sorpce při použití magnetického míchadla, kdy se vzorek promíchával během extrakce při zahřívání na topné desce při 100 ot/min. Dále bylo také testováno, zda se těkavé látky extrahují více po odplynění vzorků pomocí ultrazvukové lázně (Kraintek, Česká republika), a za stejným účelem se použil filtrační papír typu 388 a 390 (Filtrak, Německo).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Prvním krokem při optimalizaci metody stanovení těkavých látek v pivu bylo určit vhodný přístroj k měření těkavých látek v pivu. K dispozici byly GC-MS a GC-FID. Ačkoliv plamenově ionizační detektor zajišťoval souměrné nerozmyté píky analyzovaných látek, pro analýzu byl určen jako vhodnější hmotnostně spektrometrický detektor, který má nižší detekční limit, což umožnilo stanovit více těkavých látek. Další výhodou GC-MS je, že pomocí hmotnostních spekter lze identifikovat jednotlivé těkavé látky.

Při stanovení nevhodnějšího teplotního programu chromatografické analýzy je třeba brát zřetel, na jaké účely bude analýza těkavých látek použita. Pokud je třeba separovat maximální množství těkavých látek, aby je bylo možné kvalitativně i kvantitativně stanovit, je vhodné použít teplotní program s nejpomalejším nárůstem teplot. Pro optimalizaci metod použitých pro přípravu vzorku stačí aplikovat zkrácený teplotní program, který zajišťuje dostatečnou separaci základních těkavých složek.

Z metod přípravy vzorku se ukázala kapalinová extrakce oproti SPME jako zcela nevyhovující. V dichlormethanu se extrahovalo jen 8 těkavých látek, v hexanu 10 a v ethylacetátu 13, což je méně jak třetina těkavých látek extrahovaných pomocí SPME.

## MENDELNET 2012

Vzhledem k tomu, že SPME slouží k zakoncentrování analytů, nelze předpokládat, že přímý nástřík plynné fáze odebrané nad vzorkem bude při porovnání s SPME vyhovující. U SPME je však detekce analytů závislá na afinitě k sorbentu, takže není možné zajistit přenos veškerých přítomných látek na chromatografickou kolonu. Proto byl testován přímý nástřík na kolonu, ale výsledky prokázaly, že koncentrace těkavých látek v plynné fázi je příliš malá, aby bylo možné zjistit, které látky se při SPME neextrahují. Při detekci těkavých látek extrahovaných pomocí SPME nechyběla žádná z detekovaných po přímém nástříku.

Během studie byly testovány sorbenty, které tvoří stacionární fázi plynové chromatografie a separují se přes ně těkavé látky a SPME sorbenty, které slouží k extrakci a zakoncentrování analytů před chromatografickou analýzou. V tab. 1 je srovnání jejich účinnosti podle identifikovaných látek. Z tab. 1 je zřejmé, že nevhodnější je kolona DB5 s délkou 60 m a SPME vlákno se sorbentem divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan, protože při jejich použití je identifikováno nejvíce látek.

Tab. 1 Srovnání GC kolon a SPME vláken dle identifikovaných těkavých látek

těkavé látky	GC kolony			SPME vlákna		
	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Ethanol	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Ethyl Acetate	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Butanol, 3-methyl-	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Butanol, 2-methyl-	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Acetic acid, butyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
1-Pentanol	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Butanoic acid, ethyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Butanol, 2-methyl-, acetate	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Myrcene	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Hexanoic acid, ethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Octanoic acid, ethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Acetic acid, octyl ester	DB WAX	-	DB5(60)	D/C/P	-	C/P
Acetic acid, hexyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
2,3-Butanediol	DB WAX	-	-	D/C/P	P/D	C/P
1-Octanol	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
Heptanoic acid, ethyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
Linalool	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	-	C/P
Acetic acid, heptyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Decanoic acid, ethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Humulene	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Ethyl 9-decenoate	DB WAX	-	-	D/C/P	P/D	C/P

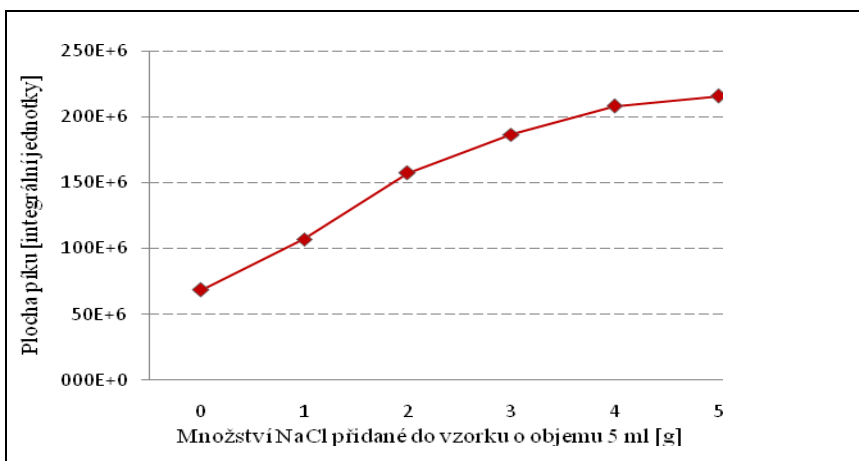
## MENDELNET 2012

1-Decanol	DB WAX	-	-	D/C/P	P/D	C/P
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Nonanoic acid, ethyl ester	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Dodecanoic acid, ethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
Phenylethyl Alcohol	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Undecanol	DB WAX	-	-	D/C/P	P/D	C/P
Octanoic acid	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	-	C/P
Decanoic acid	DB WAX	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Acetic acid, decyl ester	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Dodecanoic acid, 1-methylethyl ester	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P

D/C/P - divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan; P/D – polydimethylsiloxan/divinylbenzen;  
C/P - carboxen/polydimethylsiloxan

Vzhledem k tomu, že se ze zkoumaných metod prokázala jako neúčinnější mikroextrakce na pevnou fázi, byla snaha o maximální optimalizaci podmínek v rámci této metody. Např. byl posuzován vliv přidavku soli do vzorku na zakonzentrování těkavých látek na SPME sorbent, který byl vyhodnocen dle nárůstu plochy píků jednotlivých látek. Vzhledem k tomu, že u všech analyzovaných látek narůstala plocha píku úměrně přidávku soli, bylo možné sestavit graf 1 sečtením jednotlivých ploch. Dle výsledků lze doporučit přidávat do vzorku stejné množství soli, jaký je objem vzorku. Ačkoliv větší přidavky soli nebyly zkoumány, dle průběhu funkce lze vyvodit, že další zvyšování koncentrace soli bude mít minimální vliv na extrakci.

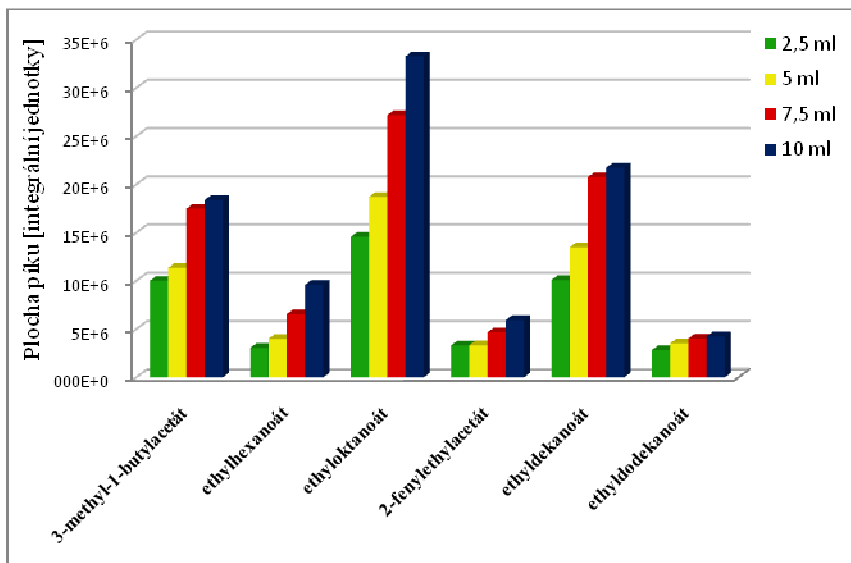
Graf 1 Vliv přidavku soli do vzorku na účinnost SPME



## MENDELNET 2012

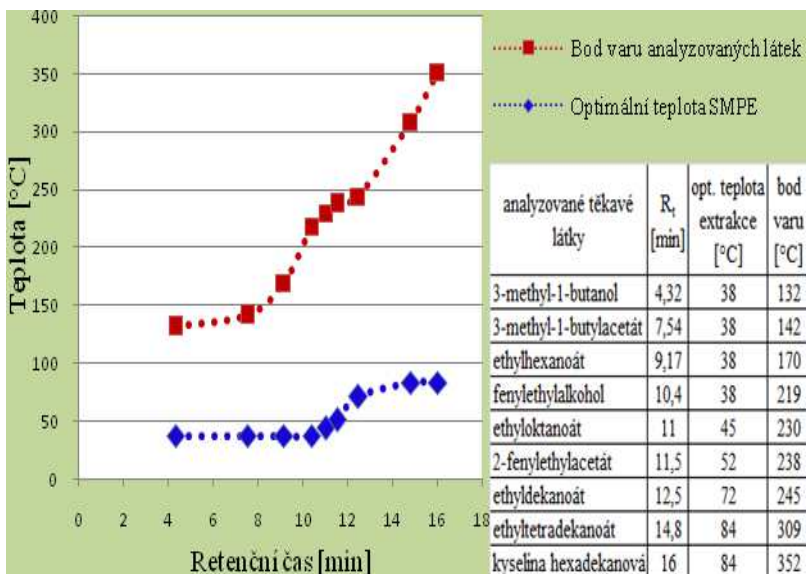
Při analýze vlivu objemu vzorku na extrakci látek na SPME vlákno v 15 ml vialkách bylo prokázáno, že se zvyšujícím se objemem vzorku se zvyšuje účinnost extrakce. Z grafu 2 je tento trend patrný a lze tedy doporučit plnit vialky až do maximálního objemu, který umožňuje extrakci těkavých látek z headspace na SPME vlákno. Zvětšující se objem vialkem však nevede k lepšímu zakoncentrování těkavých látek při SPME sorpci. Sorpci při vyšších objemech zřejmě zhoršuje obsah ethanolu a oxidu uhličitého. Teplota v tomto případě nemůže hrát roli, protože sorpce probíhala při různých teplotách a i při nevhodné teplotě se prokázala sorpce z menších objemů účinnější, jak sorpce z 40 ml vialky při ideální teplotě. Z analýzy vyplývá, že pro SPME sorpci jsou vzorky o objemu 20 a 30 ml v 40 ml vialce nevhodné. Dle experimentu je zřejmé, že na SPME sorpci z vialek má také vliv jejich průměr. Ačkoliv byl do vialek o objemu 15 a 20 ml připraven stejný objem piva - 10 ml a byly porovnávány sorpce při stejných teplotách, pro některé látky se prokázala jako vhodnější vialka o objemu 15, pro jiné o objemu 20 ml. U vzorku 10 ml v 20ml vialce je větší objem headspace, takže by měla na jednotku objemu obsahovat méně odpařených látek. Hladina piva ale tvoří větší plochu, což usnadňuje přestup těkavých látek do plynné fáze.

Graf 2 Vliv objemu vzorku v 15 ml vialce na účinnost SPME



Optimální teplotu SPME sorpce pro jednotlivé těkavé látky v pivu lze vyčíst z grafu 3, ze kterého je také patrné zvyšování bodu varu analytu s prodlužujícím se retenčním časem.

Graf 3 Optimální teplota SPME pro jednotlivé těkavé látky v pivu

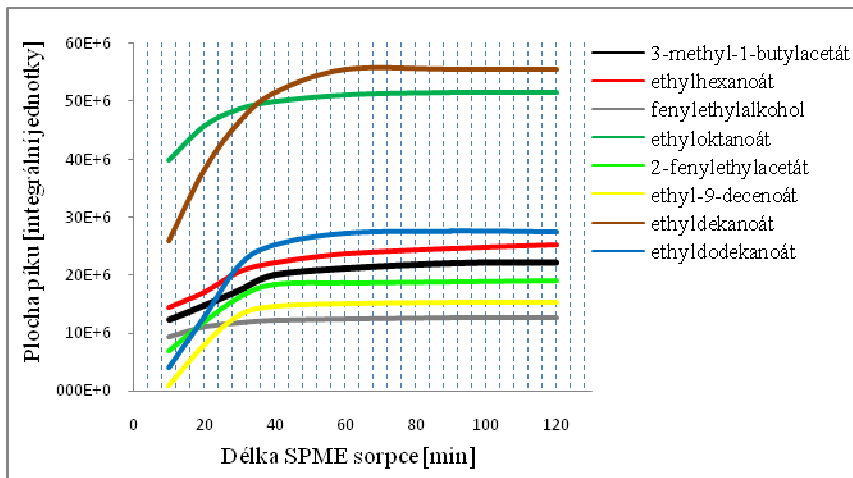


Ke stanovení optimální teploty pro SPME extrakci lze dle ploch píku jednotlivých látek říci, že s rostoucím retenčním časem analýzy roste i teplota optimální pro SPME extrakci. Je to dáno tím, že dle teplotního programu jsou z kolony vymývány nejprve látky s nižším bodem varu a látky méně těkavé následují. Z grafu 3 je patrné, že počáteční zkoušená teplota 32 °C není vhodná pro žádnou analyzovanou látku. Při 38 °C se nejlépe sorbují látky, které vycházejí z kolony při daném teplotním programu do 10,39 min. V tomto čase se z kolony eluoval fenylethylalkohol, takže jde o nejtěkavější látku, pro kterou je vhodné použít 38 °C. Poté se optimální teplota zvyšuje až na 84 °C.

Optimální délka SPME je dle naměřených dat 60 min. Delší doba sorpce těkavých látek není nutná, protože plochy píků už se příliš nezvětšují. Pro těkavé látky s vyšším bodem varu jsou rozdíly při různé době SPME významnější. Závislost extrakce na čase je znázorněna v grafu 4, kdy v pravé části jsou těkavé látky seřazeny od nejvíce těkavých po sloučeniny s vyšším bodem varu.



Graf 4 Vliv doby SPME na účinnost metody



Po použití ultrazvukové lázně na odstranění oxidu uhličitého ze vzorku se chromatografická analýza většiny analytů nezlepšila. Působením ultrazvuku dochází zřejmě i k vytěsnění těkavých látek ze vzorku. Oproti tomu po filtraci byla SPME účinnější a je možné použít oba typy filtračních papírů, typ 388 s širšími póry či typ 390 s jemnějšími póry. Typ 388 je vhodnější pro více těkavé látky, které mají zpravidla i menší molekulovou hmotnost, a typ 390 pro analyty s vyšším bodem varu. Mezním analytem je ethyloktanoát, pro jehož analýzu je ještě účinnější použít typ 388.

## ZÁVĚR

Pro stanovení těkavých látek v pivu se osvědčila jako neúčinnější metoda přípravy vzorku mikroextrakce na pevnou fázi. Extrakci lze zvýšit přidávkem soli do vzorku, zvýšením objemu vzorku ve vialce či prodloužením doby sorpce. Při určování optimální teploty sorpce nelze stanovit univerzální hodnotu, protože těkavé látky mají jiná optima extrakčních teplot dle jejich bodu varu. Použití ultrazvuku k odstranění oxidu uhličitého se prokázalo jako nevhodné. Oproti tomu filtrace přinesla uspokojivější výsledky.

Výzkumem bylo prokázáno, že pro stanovení těkavých látek v pivu o nízkých koncentracích nelze aplikovat jednu konkrétní metodiku, protože pro různé látky jsou vhodné různé podmínky analýzy. Tak lze posunout limity chromatografické analýzy i pro těkavé látky, které mají ve vzorku nízký obsah, ale vzhledem k nízkému prahu senzorického vnímání mají význam pro kvalitu výrobku a je třeba jim věnovat pozornost.

**LITERATURA**

Cajka, T., et al. (2010): Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint. *Journal of Chromatography A*, 1217: 4195-4203.

Kolb, B. (1999): Headspace sampling gas analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 842: 163-205.

Pawliszyn, J. (2000): Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880: 35-62.

Silva, G. A., Augusto, F., Poppi, R. J. (2008): Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. *Food chemistry*, 111: 1057-1063.

Štěrba, K., Dostálek, P., Karabín, M. (2011): Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chemické listy*, 105: 603-610.

Wardecki, W., Sowinski, P., Curylo, J. (2003): Evaluation of headspace SPME for the analysis of volatile carbonyl compound in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 984: 89-96.