

MODERNÍ POSTUPY VYUŽÍVANÉ PŘI PŘÍPRAVĚ VZORKŮ PRO STANOVENÍ ALKOHOLŮ, ESTERŮ A KYSELIN V PIVU

KAREL ŠTĚRBA, PAVEL DOSTÁLEK
a MARCEL KARABÍN

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6
karel.sterba@vscht.cz

Došlo 3.9.10, přijato 9.12.10.

Klíčová slova: pivo, alkoholy, estery, kyseliny

Obsah

1. Úvod
2. Možnosti stanovení alkoholů, esterů a kyselin
 - 2.1. Postupy zahrnující destilaci nebo kapalinovou extrakci
 - 2.2. Superkritická fluidní extrakce
 - 2.3. Statický headspace
 - 2.4. Dynamický headspace a purge and trap analýza
 - 2.5. Mikroextrakce tuhou fází
 - 2.6. Extrakce tuhou fází
 - 2.7. Sorpční extrakce na míchací tyčince
3. Porovnání jednotlivých postupů přípravy vzorku
4. Závěr

1. Úvod

Alkoholy, estery a kyseliny patří společně s dalšími látkami, jako jsou aldehydy, ketony, chmelové silice, některé sirmé sloučeniny a aminy, do skupiny tzv. těkavých látek piva.

V pivu je obsaženo přibližně 80 alkoholů o celkovém množství asi 100 mg l^{-1} až 300 mg l^{-1} (cit.¹). Chuť a aroma piva mohou ovlivňovat převážně alkoholovou, hořkou, chemickou či ovocnou příchutí. Ačkoli z vedlejších produktů kvašení vznikají v nejvyšších koncentracích, jejich příspěvek k chuti a vůni piva nebývá kvůli jejich vysoké prahové koncentraci příliš zdůrazňován. Jejich příspěvek k aroma piva je dán zejména díky vzájemnému synergickému efektu. Současně jsou prekurzory chuťově aktivnějších esterů².

Esterů se v pivu vyskytuje kolem 150 o celkovém množství přibližně 25 mg l^{-1} až 40 mg l^{-1} (cit.¹) a lze je rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou estery kyseliny octové, mezi nejvýznamnější z nich patří 3-methyl-1-butylacetát a 2-fenylethylacetát. Do druhé skupiny patří ethylestery mastných kyselin, jako např. ethylhexanoát nebo ethylotkanoát. Ethylacetát lze zařadit do obou skupin,

ale běžně se řadí do první skupiny. Prahové koncentrace jednotlivých esterů jsou výrazně nižší než pro alkoholy a současně se i pro tuto skupinu látek projevuje synergický efekt, tudíž estery jsou jednou z nejvýznamnějších skupin vedlejších produktů kvašení, které se podílejí na chuti a vůni piva².

Organických kyselin je v pivu obsaženo přibližně 200 o celkovém množství $50\text{--}250 \text{ mg l}^{-1}$ (cit.¹). Na rozdíl od alkoholů a esterů je řada zejména mastných kyselin přítomna již v mladině před počátkem kvašení². Jejich vyšší koncentrace nejsou vzhledem k jejich nepříjemné chuti a vůni v pivu žádoucí, navíc se může projevit negativně na tvorbě pěny³.

Aroma a prahové koncentrace vybraných alkoholů, esterů a kyselin jsou uvedeny v tabulce I.

Vzhledem k jejich důležitosti pro aroma piva nelze opominout význam stanovení konkrétních sloučenin v hotovém výrobku, příp. i během výroby. Jelikož je v současné době známa řada postupů využívaných při stanovení alkoholů, esterů a kyselin, je vhodné zpracovat jejich ucelený přehled a srovnání.

2. Možnosti stanovení alkoholů, esterů a kyselin

Ke stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu, stejně jako i dalších sloučenin ze skupiny těkavých látek piva, se v současné době téměř výhradně používá plynová chromatografie. Od použití dalších metod, např. spektrofotometrických⁵, se v současné době z důvodu jejich nespecifičnosti a menší přesnosti ustupuje.

Vlastní analýza na plynovém chromatografu je pro alkoholy a estery již vyřešena. Při stanovení mastných kyselin s řetězcem delším než C_{12} se z důvodu nižší těkavosti a nekompatibility se stacionární fází GC kolon mohou vyskytnout problémy se separací. Proto se používá derivatizace spočívající obvykle v převedení mastných kyselin na jejich methylestery⁶.

V současnosti je pozornost v rámci stanovení těkavých látek piva soustředěna především na přípravu vzorku. Přestože je možný i přímý nástřik⁷ piva na GC, je vzhledem k velkému koncentračnímu rozpětí stanovovaných látek, tj. $10^{-2}\text{--}10^{-9} \text{ g l}^{-1}$, a komplexní matici piva vhodné stanovované látky nejprve izolovat, případně zakoncentrovat.

V 60. letech 20. století byla vyvinuta řada postupů pro zakoncentrování těkavých látek piva⁸. Z nich se dnes již velká část neuzívá, jedná se např. o vymrazování nebo extrakční techniky založené na chemických reakcích a izolaci látek se stejnou funkční skupinou. V současnosti se stále ještě v menší míře používají postupy založené na jednoduché kapalinové extrakci piva, oddestilování těkavých látek, případně kombinaci obojího a o těchto postu-

Tabulka I
Přehled aroma vybraných látek v pivu⁴

Název	Prahová koncentrace [ppm]	Aroma
1-Propanol	800	alkoholové
2-Propanol	1500	alkoholové
2-Methyl-1-propanol	200	alkoholové
3-Methyl-1-butanol	70	alkoholové, banánové, nasládlé
2-Methyl-1-butanol	65	alkoholové, banánové, medicínální, po rozpouštědlech
2-Fenylethanol	125	po růžích, nasládlé, hořké
Ethylacetát	30	po rozpouštědlech, ovocné, nasládlé
3-Methyl-1-butylacetát	1,6	banánové, jablečné, po rozpouštědlech, esterové, hruškové
Ethylhexanoát	0,23	po kyselých jablkách, ovocné, nasládlé
Ethyl oktanoát	0,9	po kyselých jablkách, medové, po tropickém ovoci, nasládlé
2-Fenylethylacetát	3,8	po růžích, medové, nasládlé, jablečné
Kyselina octová	175	octové
Kyselina máselná	2,2	po másle, po sýru
Kyselina 2-methylbutanová	1,5	po sýru, po starém chmelu, sladké
Kyselina hexanová	8	kozí, olejové
Kyselina oktanová	13	kozí, olejové

pech je pojednáno v kapitole 2.1. Poslední významnou metodou, která byla již tehdy vyvinuta, je statický headspace, který se díky možnosti použití automatických dávkovacích systémů používá dodnes. O této metodě je pojednáno v kapitole 2.3.

2.1. Postupy zahrnující destilaci nebo kapalinovou extrakci

Mezi nejstarší postupy zakonzentrování stanovovaných látek patří extrakční metody spočívající v intenzivní extrakci vzorku rozpouštědlem vybraným v závislosti na stanovovaných látkách. Extrakční rozpouštědla a jejich použití při stanovení jednotlivých skupin těkavých látek jsou uvedena v tab. II. Z dříve používaných rozpouštědel lze jmenovat také parafinový olej, fluorované a chlorfluorované uhlovodíky⁸, které se dnes z ekologických důvodů nepoužívají.

Při klasických destilačních metodách jsou těkavé látky ze vzorku oddestilovány a destilát je přímo analyzován na GC (např. Gisler a spol.¹⁸).

Vedle extrakčních a destilačních metod existují i metody kombinované. Jednou z možností je postup, kdy je vzorek destilován s vodní parou a destilát je jímán do tří předloh lišících se teplotou (laboratorní teplota, 0 °C a –70 °C), přičemž v obou chlazených předlohách je plynná fáze jímána do směsi *n*-pentan : dichlormethan (2 : 1)¹⁹ nebo *n*-pentan : diethylether (1 : 2)⁵, která je dále použita

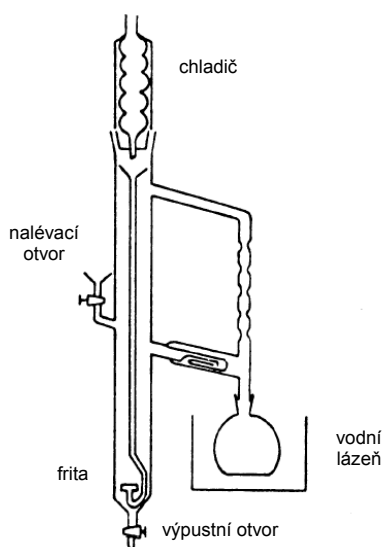
i pro extrakci. Destilát z první předlohy je extrahován v kontinuálním extraktoru, příklad uspořádání extraktoru je znázorněn na obr. 1. Podíly vzorku jsou následně spojeny a zakonzentrovány na vakuové odparce^{5,19}.

Další možností je jímání destilát získaný pomocí destilace s vodní parou pouze do první předlohy a získaný destilát vytřepat do dichlormethanu¹⁹.

Vzhledem k možným chemickým změnám vzorku, ke kterým může dojít při běžné destilaci nebo destilaci s vodní parou, byla vyvinuta metoda (obr. 2) založená na vakuové destilaci probíhající při teplotě pod 20 °C. Stano-

Tabulka II
Přehled použitých rozpouštědel při extrakci těkavých látek piva

Rozpouštědlo	Stanovované sloučeniny	Lit.
Chloroform	kyseliny	9
Ethylacetát	alkoholy, estery, kyseliny, ketony, dioly	10, 11
Dichlormethan	alkoholy, estery, kyseliny, aldehydy, ketony, heterocyklické sloučeniny	12-14
1-Hexanol	alkoholy, estery, kyseliny	15
Sírouhlík	alkoholy, estery, kyseliny	15-17

Obr. 1. Kontinuální extraktor¹⁹

vované látky jsou zachycovány v předlohách chlazených pomocí kapalného dusíku při teplotách -78 °C a -196 °C . Získané frakce jsou následně spojeny a rozděleny další vakuovou destilací do 4 podílů. Podíl zachycený při -46 °C obsahuje převážně ethanol a stopy vody, podíl zachycený při -196 °C oxid uhličitý, dva zbývající podíly obsahují stanovované látky. Pro stanovení výševroucích těkavých látek byl následně spojen podíl zachycený při -46 °C se zbytkem vzorku po úvodní destilaci a podroben vakuové destilaci s vodní parou při 20 °C . Získaný destilát byl v dusíkové atmosféře extrahován etherem²⁰.

2.2. Superkritická fluidní extrakce

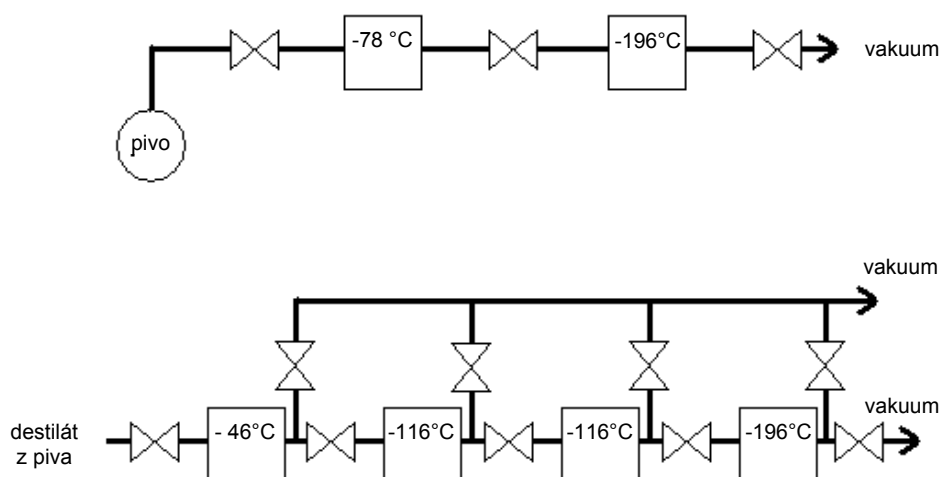
Další extrakční metoda, kterou lze využít pro izolaci těkavých látek z piva, je superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction, SFE) pomocí nadkritického oxidu uhličitého, což se provádí pomocí nadkritické teploty a tlaku. Vlastnosti oxidu uhličitého, který se v nadkritickém stavu chová jako rozpouštědlo, lze shrnout do několika bodů²¹:

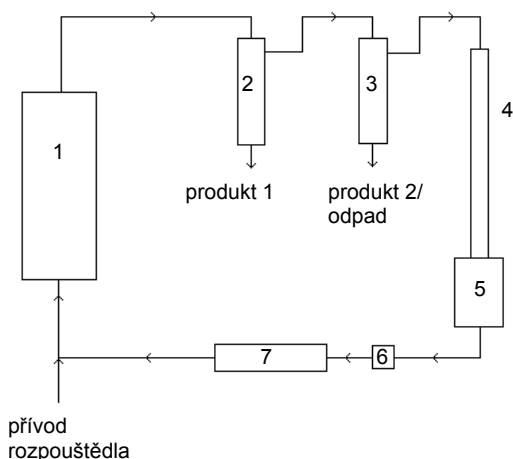
- bezpečnost a netoxicity,
- nízká teplota potřebná pro extrakci,
- rozpouští nepolární a mírně polární sloučeniny, přičemž rozpustnost klesá se vzrůstající molekulovou hmotností,
- vysoká afinita ke kyslíkatým středněmolekulárním organickým sloučeninám,
- nízká rozpustnost volných mastných kyselin a jejich glyceridů,
- rozpustnost vody do 0,5 hm.%.

Zatímco řada uvedených vlastností je pro extrakci sledovaných látek pomocí této metody výhodou, nevýhodou metody je omezená schopnost extrakce polárních látek a instrumentální náročnost. Pro umožnění extrakce méně těkavých látek, látek s vyšší molekulovou hmotností nebo polárnějších látek je možno při extrakci použít vyšší tlak, případně lze rozpustnost polárních látek pozitivně ovlivnit přidávkem methanolu v množství 1–10 hm.% (cit.²¹).

Zjednodušené schéma uspořádání metody je znázorněno na obr. 3. Vzorek je vložen do extrakční nádoby. Po naplnění nádoby oxidem uhličitým probíhá extrakce. Z nádoby je oxid uhličitý s rozpuštěnými složkami převeden do separátorů, kde se změnou teploty či tlaku snižuje rozpustnost zachycených složek²¹.

Metoda SFE použitá pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivo probíhala při teplotě 50 °C , tlaku 20 MPa, průtoku vzorku $0,5\text{--}0,6\text{ ml min}^{-1}$ a průtoku oxidu uhličitého

Obr. 2. Schéma vakuové destilace²⁰



Obr. 3. Schéma superkritické fluidní extrakce²¹; 1 extrakční tank, 2, 3 – separátor, 4 – kondenzátor, 5 – zásobník CO₂, 6 – pumpa CO₂, 7 – tepelný výměník

ho 3,6–3,8 ml min⁻¹. Jako záchytný roztok byla testována rozpouštědla *n*-hexan a ethanol, průměrná výtěžnost pro *n*-hexan byla 55 % a pro ethanol 37 %. Současně byl testován i průtok vzorku v rozmezí 0,5–2,1 ml min⁻¹ a oxidu uhličitého v rozmezí 3,5–4,2 ml min⁻¹ a bylo zjištěno, že výtěžnost extrakce je na uvedených průtocích v podstatě nezávislá a je ovlivněna zejména fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu²².

2.3. Statický headspace

Další skupinou metod sloužících k izolaci těkavých látek piva jsou headspace metody založené na těkavosti stanovovaných látek. Při statickém headspace je vzorek ve vialce temperován, dokud se nevytvoří rovnováha mezi kapalnou a plynnou fází. Poté je odebrán známý objem plynné fáze, který je převeden na chromatografickou kolonu⁵. Důležitým faktorem pro přesnost tohoto uspořádání je možnost využití automatických dávkovacích systémů²³, které výrazně zlepšují opakovatelnost metody. Speciálním případem statického headspace je mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Vzhledem k tomu, že se jedná o moderní a často využívanou metodu, je jí věnována samostatná kapitola.

V uspořádání statického headspace je pro vytvoření rovnováhy mezi fázemi důležitá vhodná kombinace teploty a délky temperování vzorku. Nejčastěji bývá používána kombinace 50 °C po dobu 30 min (cit.^{15,23,24}), nicméně rozmezí použitých hodnot je širší, např. 60 °C a 25 min (cit.²⁵) nebo 35 °C a 60 min (cit.²⁶).

Jednou z možností tohoto uspořádání je i využití tzv. kryofokuse²⁷. Ta se častěji používá při dynamickém headspace, kterému je věnována následující kapitola.

2.4. Dynamický headspace a purge and trap analýza

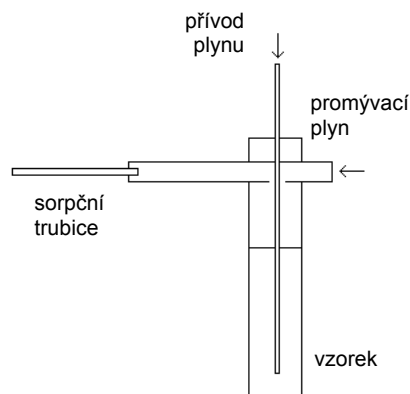
Zatímco při statickém headspace je odebrán pouze podíl z uzavřeného prostoru nad hladinou vzorku, při dynamickém headspace je do prostoru nad vzorkem přiváděn inertní plyn, který následně prochází sorpční trubicí, ve které jsou zachycovány uvolněné těkavé látky. Zachycené látky jsou pak převedeny na chromatografickou kolonu. Při purge and trap analýze inertní plyn na rozdíl od dynamického headspace prochází vzorkem, příklad uspořádání metody je na obr. 4 (cit.²⁸).

Jednotlivé postupy používané k izolaci těkavých látek piva se liší zejména použitým sorpčním materiálem a způsobem desorpce, při které lze použít promytí rozpouštědly nebo termální desorpce²⁹.

Jako promývací plyn a mobilní fáze se běžně užívá helium o průtoku v rozmezí 25–100 ml min⁻¹ (cit.^{28,30}) a dobou promývání 5–30 min (cit.^{28,31,32}), přičemž konkrétní podmínky závisí na uspořádání systému (druh sorbentu, automatizace systému). Díky možným problémům s pěnou vznikající během promývání vzorku při purge and trap analýze někteří autoři doporučují přidat ke vzorku odpěňovací prostředek^{30,33}, zatímco jiní problém navrhuji řešit mícháním takovým způsobem, aby se vytvořil vír, který zabrání tvorbě pěny^{31,32}.

Pro stanovení těkavých látek byly využity sorbenty Tenax GC (fenyldifenylenoxid)^{30,31,32,34}, Tenax TA (2,6-difenylenoxid)³⁵, Porapak Q (polydivinylbenzen)³⁴ a polydimethylsiloxan²⁸. Při srovnávání sorbentů Tenax GC a Porapak Q bylo zjištěno, že z hlediska výsledků jsou rozdíly mezi těmito sorbenty zanedbatelné, nicméně při použití Porapaku Q docházelo k pomalejšímu uvolňování zachycených látek³⁴.

Nejpoužívanějším systémem pro desorpce látek zachycených na sorbentu je termální desorpce. Teplota a délka desorpce se volí v závislosti na použitém sorbentu, např. pro Porapak Q bylo použito 200 °C po dobu 4 min (cit.³⁴).



Obr. 4. Schéma uspořádání purge and trap analýzy²⁸

Při desorpci látek zachycených v sorpční trubici může docházet k problémům v rozdílných průtocích nosného plynu skrz sorpční trubici a chromatografickou kolonu. Tyto obtíže lze řešit pomocí kryofokuse, která spočívá v zchlazení přívodu těkavých látek v mobilní fázi na velmi nízké teploty, např. $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, při které stanovované látky z kondenzují. Po z kondenzování látek je vstupní průtok plynu snížen na hodnotu průtoku kolonou, zachycené látky se prudce ohřejí a v plynné fázi jsou převedeny na kolonu³⁴.

2.5. Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction, SPME) je metoda založená na sorpci těkavých látek na vlákno potažené sorbentem, a to buď přímo ve vzorku, nebo v prostoru nad hladinou vzorku. Pro stanovení těkavých látek piva se používá výhradně uspořádání headspace. Po ukončení sorpce je vlákno umístěno do nástřikového prostoru GC, kde probíhá termická desorpce³⁶.

Výhodou metody je její jednoduchost, neboť téměř eliminuje nutnost úpravy vzorku. Další výhodou oproti extrakci tuhou fází, o které je pojednáno v kapitole 2.6., je skutečnost, že zachycuje v headspace uspořádání pouze těkavé látky. Nevýhodou metody je křehkost vlákna a skutečnost, že na vláknech může docházet ke kompetitivní sorpci²⁹.

Těkavost stanovovaných látek lze zvýšit přidávkou anorganické soli, např. chloridu sodného v množství od 10 hm.% (cit.³⁷) do 40 hm.% (cit.³⁸). Přidání anorganické soli snižuje rozpustnost řady organických molekul, zejména hydrofobních, a ty snáze přecházejí do prostoru nad vzorkem³⁹. Při srovnání vlivu přidávku síranu amonného, chloridu amonného a chloridu sodného v množství 20 % na účinnost extrakce byly největší odezvy stanovovaných esterů pozorovány při použití chloridu sodného⁴⁰.

Ke stanovení těkavých látek v pivu byla použita všechna běžně komerčně dostupná vlákna:

- polyakrylát (PA)^{23,38,41} – středně polární,
- divinylbenzen/Carboxen/polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS)^{39,42,43},
- Carboxen/polydimethylsiloxan (CAR/PDMS)^{38,42},
- Carbowax/divinylbenzen (CW/DVB)^{44,45} – polární,
- polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB) (cit.^{38,46,47}),
- polydimethylsiloxan (PDMS)^{37,38,48} – nepolární.

Při srovnání jednotlivých vláken byla pro stanovení alkoholů a esterů (příp. spolu s dalšími látkami) nejvhodnější kombinovaná DVB/CAR/PDMS^{39,42,43} a CAR/PDMS vlákna^{38,42}, pro stanovení kyselin polární CW/DVB^{44,45} a PA vlákna³⁸.

Pro extrakční krok byly vyzkoušeny extrakční teploty v rozmezí od $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cit.³⁸) do $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cit.^{39,40,42,43}). Při srovnávání účinnosti sorpce při různých teplotách bylo různými autory stanoveno teplotní optimum $30\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cit.^{39,40,42,43}).

Použitá délka extrakce se pohybovala v rozmezí od 20 min (cit.³⁷) do 60 min (cit.^{39–41}). Při srovnávání účinnosti

sorpce jednotlivých látek na vláknech na bázi 3-(trimethoxysilyl)-propylmethakrylátu se ukázalo, že každý typ látek potřebuje jinou dobu pro dosažení rovnováhy⁴⁹:

- 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 4-methyl-2-pentanol, 3-methyl-1-butanol a 1-hexanol potřebují 10 minut,
- linalool, ethylacetát, isobutylacetát, ethylbutyrát, isoamylacetát, ethylhexanoát, ethyloktanoát a ethyldekanóat potřebují 20 minut,
- 2-fenylethanol, kyselina octová a kyselina hexanová potřebují 30 minut,
- pro kyselinu oktanovou a dekanovou nebylo dosaženo rovnováhy ani po 80 minutách.

Z tohoto důvodu a kvůli snaze o co nejkratší dobu analýzy byla navržena kompromisní doba extrakce 30 min (cit.^{23,42,43,49}). Při použití celkové odezvy jako hlavního kritéria byla optimální doba extrakce stanovena na 60 min (cit.³⁹).

Teplota a doba desorpce jsou veličiny, které mají zajistit úplné uvolnění zachycených látek. Při testování bylo zjištěno, že při teplotě $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ není 1 minuta pro kompletní desorpci dostačující, neboť při opakovaném nástřiku byly detegovány uvolněné látky. Při časech 3 min a 5 min již při opakovaném nástřiku nebyly detegovány žádné látky²³. V dalších pracích se teplota desorpce pohybovala v rozmezí $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cit.⁴⁷) až $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cit.³⁸) a doba desorpce od 2 min (cit.⁴²) do 15 min (cit.⁴⁷).

Vzhledem k širokému spektru stanovovaných látek je věcí každého uživatele, aby si nadefinoval co nejvhodnější parametry metody s ohledem na konkrétní analýzy.

2.6. Extrakce tuhou fází

Metoda extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction, SPE) byla vyzkoušena zatím jen pro stanovení kyselin a oproti dříve uvedeným postupům není příliš využívána. Její princip spočívá v zachycení sledovaných analytů na sorbentu, který je umístěn mezi fritami v extrakční minikoloně. Postup SPE je popsán čtyřmi kroky³⁶:

- kondicionace sorbentu – příprava SPE kolonky na interakci se vzorkem,
- aplikace vzorku – prosátí vzorku skrz kolonku pomocí vaku,
- promytí – odstranění interferujících látek z povrchu stacionární fáze,
- eluce – selektivní desorpce vhodným rozpouštědlem.

Při porovnávání vybraných sorbentů bylo zjištěno, že kolonky na bázi C-18 dosahovaly nižších výsledků pro kyseliny s délkou řetězce do C_{12} než polymerní sorbenty na bázi divinylbenzenu, zatímco pro kyseliny s delším řetězcem byly vhodnější C-18 kolonky⁴⁴.

2.7. Sorpční extrakce na míchací tyčince

Sorpční extrakce na míchací tyčince (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE) je založena na sorpci těkavých látek na míchadlo potažené absorpční fází (nejčastěji PDMS),

kterým se po určité době míchá vzorek. Zachycené látky jsou poté buď ve speciálním zařízení pro termální desorpci a nebo pomocí organického rozpouštědla z míchadla uvolněny a převedeny na chromatografickou kolonu³⁶.

SBSE byla využita ke stanovení kyselin a esterů. Vzorek byl ve vialce míchán sorpčním míchadlem při pokojové teplotě při otáčkách 1000 rpm pro stanovení kyselin, resp. 1200 rpm pro stanovení esterů. Byla srovnávána doba sorpce (10–120 min) a jako optimální byla v obou případech zvolena doba 60 min. Jako optimální rozpouštědlo pro desorpci těkavých látek z míchadla byla v obou případech z možností dichlormethan, dichlormethan : methanol (90 : 10) a dichlormethan : hexan (50 : 50) zvolena směs dichlormethan : hexan. Optimální doba desorpce byla pro obě stanovení stanovena na 40 min (cit.^{50,51}).

Magnetické míchadlo potažené sorpční směsí lze zachycené na kovové tyčince použít i v headspace prostoru (Headspace Sorptive Extraction, HSSE). V tomto uspořádání probíhalo míchání při 900 rpm po dobu 2 hodin. Pro uvolnění zachycených látek byla využita termální desorpce, při převodu zachycených látek na kolonu byla použita kryofokusace²⁸.

3. Porovnání jednotlivých postupů přípravy vzorku

Vzhledem k odlišnosti postupů použitých různými autory nelze uvést obecné srovnání všech metod přípravy vzorků k analýze. Z tohoto důvodu jsou v této kapitole uvedena pouze srovnání konkrétních metod použitých vždy v rámci jednoho testu, příp. jednoho autorského kolektivu.

Srovnání dvou různých destilačně-extrakčních metod je uvedeno v tab. III, jako referenční množství 100 % obsahu látek byly zvoleny výsledky získané při 24 h extrakci. Z výsledků vyplývá, že nejvhodnější ze zvolených metod s ohledem na největší výtěžky celkového množství těkavých látek je destilace s vodní parou a následnou 16 h extrakci v kontinuálním extraktoru. S ohledem na jednoduchost a nižší spotřebu rozpouštědel byla autory doporučena i metoda destilace s vodní parou a následným vytřepáním do dichlormethanu. Nevýhodou této metody jsou však nejnižší výtěžky esterů a relativně nízké výtěžky alkoholů¹⁹.

Při srovnání destilační metody a statického headspace byla stanovena nižší mez detekce pro stanovení esterů

pomocí headspace analýzy (např. 0,005 mg l⁻¹ oproti 0,05 mg l⁻¹ pro ethylacetát), avšak relativní směrodatná odchylka byla výrazně nižší pro destilační metodu. Je pravděpodobné, že při použití automatického dávkovacího systému by byla přesnost headspace metody větší¹⁸.

Ze srovnání statického headspace a extrakce pomocí sirouhlíku a 1-hexanolu vyplývá, že headspace analýza je díky své jednoduchosti a rychlosti vhodná pro látky s nižším bodem varu (do 208 °C – ethylkaprylát), pro které poskytuje výsledky srovnatelné se zvolenými extrakčními postupy. Při srovnání extrakčních postupů pro látky s bodem varu vyšším než ethylkaprylát nebyl shledán významný rozdíl při použití jednotlivých rozpouštědel a z bezpečnostních důvodů byl upřednostněn 1-hexanol. Jako optimální metoda měření těkavých látek piva byla autory doporučena kombinace headspace metody a extrakce 1-hexanolem¹⁵.

Metoda SPE byla pro stanovení kyselin v pivu srovnávána se dvěma extrakčními metodami spočívajícími v přímé extrakci vzorku chloroformem. Jako nejlepší byla vyhodnocena metoda SPE, zatímco obě extrakční metody vykazovaly při deseti opakovaných analýzách vysokou relativní směrodatnou odchylku⁹.

Při srovnání statického headspace a SPME při použití PA vlákna bylo zjištěno, že obě metody jsou z hlediska výsledků a relativní směrodatné odchylky měření pro sledované alkoholy a estery srovnatelné, avšak metoda SPME je s výjimkou ethylacetátu a 1-propanolu citlivější. Získané kalibrační křivky pro stanovované látky byly lineární a jejich korelační koeficient byl vždy vyšší než 0,997 (cit.²³).

V rámci testování použitelnosti metod SPE, SBSE a SPME (CW/DVB vlákno) pro stanovení kyselin bylo zjištěno, že pro kyseliny o délce řetězce C₆ až C₁₂ jsou obě metody z hlediska výtěžnosti srovnatelné, hodnota opakovatelnosti je u metody SPME nižší. Pro delší řetězce se srovnání SPE a SPME neprovádělo, neboť pro metodu SPME by bylo třeba provést derivatizaci vzorku na vlákno⁴⁴. Metoda SBSE měla vzhledem k ostatním dvěma metodám nižší výtěžek pro kyseliny do délky C₁₂, pro delší řetězce již byla s metodou SPE srovnatelná. Za určitou nevýhodu SBSE metody lze podle autorů považovat její časovou náročnost⁵².

Metody SPME (DVB/CAR/PDMS vlákno) a SBSE byly srovnávány též z hlediska stanovení esterů. Kalibrační křivky obou metod vykazovaly vysokou linearitu (korelační koeficienty pro SPME byly větší než 0,9995,

Tabulka III

Srovnání celkových obsahů jednotlivých skupin těkavých látek pro různé extrakční postupy¹⁹

Látka	24 h extrakce	16 h extrakce	8 h extrakce	2 h extrakce	vytřepání
Alkoholy	100,0 %	95,6 %	78,6 %	75,7 %	88,3 %
Estery	100,0 %	121,2 %	94,0 %	86,2 %	71,7 %
Kyseliny	100,0 %	137,8 %	111,6 %	104,5 %	128,0 %

pro SBSE byly větší než 0,9991). Z hlediska výtěžnosti a opakovatelnosti jednotlivých metod nebyly sledovány významnější rozdíly. Při zhodnocení metod autoři uvedli jako výhody SPME jednoduchost, rychlost a univerzálnost (možnost výměny vlákna pro stanovení dalších skupin látek), jako výhoda SBSE je uvedena robustnost metody⁴⁰.

V rámci testování schopností sorpčního materiálu PDMS byly porovnávány metody SBSE, HSSE, dynamický headspace a purge and trap analýza. Při dynamickém headspace byl vzorek promýván vzduchem (120 ml min⁻¹, 5 min), při purge and trap analýze dusíkem (30 ml min⁻¹, 20 min). Z hlediska celkové odezvy, přesnosti a opakovatelnosti byla jako nejvhodnější určena metoda SBSE. Při srovnání linearit jednotlivých kalibračních křivek vzrůstala průměrná hodnota korelačních koeficientů v závislosti na metodě v pořadí dynamický headspace (0,9394), purge and trap analýza (0,9731), HSSE (0,9803) a SBSE (0,9841)²⁸.

4. Závěr

Stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu patří mezi důležité analýzy a může poskytnout nejen důležité informace o aroma piva, ale i zpětnou vazbu pro technologii výroby. V současnosti existuje řada postupů přípravy vzorku pro GC analýzu a záleží na každé laboratoři, kterou metodu s ohledem na konkrétní stanovované látky, laboratorní vybavení, četnost měření a účel analýzy zvolí.

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR (1M0570 a MSM6046137305).

LITERATURA

- Buiatti S., v knize *Beer in Health and Disease Prevention*, (Preedy V. R., ed.), kap. 20, Elsevier Inc., Burlington 2009.
- Verstrepen K. J., Derdelinckx G., Delvaux F. R.: *Cerevisia* 28, 41 (2003).
- Briggs D. E., Boulton C. A., Brookes P. A., Stevens R.: *Brewing Science and Practice*, kap. 12. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2004.
- Meilgaard M. C.: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 12, 151 (1975).
- Basařová G.: *Pivovarsko-sladařská analytika*, sv. 3. Merkanta, Praha 1999.
- Pan L., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 69, 196 (1997).
- Barker R. L., Irwin A. J., Murray C. R.: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 29, 11 (1992).
- Kahler M., Čepička J., Moštek J., Šámal F.: *Kvasný Prům.* 24, 73 (1978).
- Battistutta F., Buiatti S., Zenarola C., Zironi R.: *J. High. Resolut. Chromatogr.* 17, 662 (1994).
- Williamson S. A., Iverson W. G.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 51, 114 (1993).
- Iverson W. G.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52, 91 (1994).
- Sendra J. M., Todo V., Izquierdo L., Carbonell J. V.: *Monatsschr. Brauwiss.* 47, 316 (1994).
- Stenroos L. E., Grabowski D. W., Spearman J., Siebert K. J.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 43, 203 (1985).
- Wei A., Mura K., Shibamoto T.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 4097 (2001).
- Alvarez P., Malcorps P., Sa Almeida A., Ferreira A., Meyer A. M., Dufour J. P.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52, 127 (1994).
- Landaud S., Latrille E., Corrieu G.: *J. Inst. Brew.* 107, 107 (2001).
- Vinh T., Schwartz G., Moll M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 39, 44 (1981).
- Gisler B., Mäkinen V.: *Brauwissenschaft* 31, 177 (1978).
- Dostálek P., Kwaczek P., Řezáč J., Čepička J.: *Kvasný Prům.* 41, 302 (1995).
- Pickett J. A., Coates J., Sharpe F. R.: *J. Inst. Brew.* 82, 228 (1976).
- Abbas K. A., Mohamed A., Abdulmir A. S., Abas H. A.: *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 4, 345 (2008).
- Čulík J., Horák T., Čejka P., Jurková M., Kellner V., Karásek P., Varad'ová-Ostrá E.: *Kvasný Prům.* 52, 142 (2006).
- Jeleń H. H., Wlazły K., Wąsowicz E., Kamiński E.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 1469 (1998).
- Malcorps P., Cheval J. M., Jamil S., Dufour J. P.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49, 47 (1991).
- Saerens S. M. G., Delvaux F., Verstrepen K. J., van Dijck P., Thevelein J. M., Delvaux F. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 454 (2008).
- Calderbank J., Hammond J. R. M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52, 84 (1994).
- Van Iersel M. F. M., Van Dieren B., Rombouts F. M., Abee T.: *Enzyme Microb. Technol.* 24, 407 (1999).
- Marsili R. T., Laskonis L. C., Kanaan C.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 65, 129 (2007).
- Plutowska B., Wardencki W.: *Food Chem.* 107, 449 (2008).
- Dercksen A. W., Carter C., Torline P. A.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 44, 110 (1986).
- Chen E. C. H.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 41, 28 (1983).
- Casey G. P., Chen E. C. H., Ingledew W. M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 43, 179 (1985).
- Vanderhaegen B., Delvaux F., Daenen L., Verachtert H., Delvaux F. R.: *Food Chem.* 103, 404 (2007).
- Murakami A., Goldstein H., Chicoye E.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 44, 33 (1986).
- Kaipainen A.: *J. High. Resolut. Chromatogr.* 15, 751 (1992).
- Horák T., Čulík J., Jurková M., Čejka P., Kellner V.: *Kvasný Prům.* 48, 186 (2002).
- Lochow E., Peschmann P., Hellwig C.: *Brauwelt* 144, 608 (2004).
- Pinho O., Ferreira I. M. P. L. V. O., Santos L. H. M. L. M.: *J. Chromatogr., A* 1121, 145 (2006).
- Rodrigues F., Caldeira M., Câmara J. S.: *Anal. Chim.*

- Acta 609, 82 (2008).
40. Horák T., Čulík J., Kellner V., Jurková M., Čejka P., Hašková D., Dvořák J.: *J. Inst. Brew.* 116, 81 (2010).
 41. Liu M., Zeng Z., Xiong B.: *J. Chromatogr., A* 1065, 287 (2005).
 42. Techakriengkrai I., Paterson A., Piggott J. R.: *J. Inst. Brew.* 110, 360 (2004).
 43. Saison D., de Schutter D. P., Delvaux F., Delvaux F. R.: *J. Chromatogr., A* 1190, 342 (2008).
 44. De Schutter D. P., Saison D., Delvaux F., Derdelinckx G., Rock J.-M., Neven H., Delvaux F. M.: *J. Chromatogr., A* 1179, 75 (2008).
 45. Horák T., Čulík J., Jurková M., Čejka P., Kellner V.: *Kvasný Prům.* 52, 78 (2006).
 46. Horák T., Čulík J., Jurková M., Čejka P., Kellner V.: *Kvasný Prům.* 51, 374 (2005).
 47. Malfliet S., Goiris K., Aerts G., De Cooman L.: *J. Inst. Brew.* 115, 49 (2009).
 48. Da Silva G. A., Augusto F., Poppi R. J.: *Food Chem.* 111, 1057 (2008).
 49. Constant M., Collier J.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55, 112 (1997).
 50. Horák T., Čulík J., Jurková M., Čejka P., Kellner V.: *J. Chromatogr., A* 1196-1197, 96 (2008).
 51. Horák T., Kellner V., Čulík J., Jurková M., Čejka P.: *J. Inst. Brew.* 113, 154 (2007).
 52. Horák T., Čulík J., Čejka P., Jurková M., Kellner V., Dvořák J., Hašková D.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 11081 (2009).

K. Štěřba, P. Dostálek, and M. Karabín
(*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Modern Trends in Sample Preparation for Determination of Alcohols, Esters and Acids in Beer**

Alcohols, esters and acids are substances which create specific flavour of beer. The aim of this work is to describe a number of methods, which are used for their determination in beer, with emphasis on modern methods developed in recent years. A comparison of these methods is also given.