

STANOVENÍ AROMATICKÝCH ALKOHOLŮ V PIVU S VYUŽITÍM METODY EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI (SPE) A DETEKCE POMOCÍ SPOJENÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ (GC-MS) Část I. – Vypracování a validace vhodné analytické metody

DETERMINATION OF AROMATIC ALCOHOLS IN BEER BY SOLID PHASE EXTRACTION AND DETECTION WITH GAS CHROMATOGRAPHY IN COMBINATION WITH MASS SPECTROMETRY (GC-MS) Part I. – Creation and validation of the analytical method

JIŘÍ ČULÍK, TOMÁŠ HORÁK, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER, JOSEF DVOŘÁK – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, Plc, Lipova St. 15, 120 144 Praha, Czech Republic*, e-mail: culik@beerresearch.cz

Čulík, J. – Horák, T. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J.: Stanovení aromatických alkoholů v pivu s využitím metody extrakce na pevné fázi (spe) a detekce pomocí spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Část I – Vypracování a validace vhodné analytické metody. *Kvasny Prum.* 55. 2009, č. 7–8, s. 177–186.

V úvodní části jsou krátce shrnuty poznatky týkající se analytických postupů stanovení aromatických alkoholů a doplněny o stručnou literární rešerši věnovanou jejich vzniku, úloze a senzorickým účinkům v pivu.

Na reálných vzorcích pív byl úspěšně odzkoušen postup izolace a zakoncentrování aromatických alkoholů pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) a metoda jejich stanovení pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS).

Čulík, J. – Horák, T. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J.: Determination of aromatic alcohols in beer by solid phase extraction and detection with gas chromatography in combination with mass spectrometry (GC-MS). Part I – Creation and validation of the analytical method. *Kvasny Prum.* 55. 2009, No. 7–8, pp. 177–186.

In the literature section, new findings concerning the analytical procedures of estimation of aromatic alcohols are briefly summarized and completed with short overview about their formation, role and sensory activity in beer.

In the sphere of the analysis of aromatic alcohols in commercial beers, the new proposed analytical method of their SPE isolation and GC-MS estimation was successfully tried out.

Čulík, J. – Horák, T. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J.: Die Bestimmung von aromatischen Alkoholen im Bier durch die Ausnützung der Extraktionsmethode auf der soliden Phase (SPE) und die Detektion mittels der Verbindung der Gaschromatographie und Gewichts-spektrophotometrie (GC-MS). Teil I – Ausarbeitung und Validation einer geeigneten analytischen Methode. *Kvasny Prum.* 55. 2009, Nr. 7-8, S. 177–186.

Zur Einführung werden kurz die Erkenntnisse über die analytische Verfahrens zur Bestimmung von aromatischen Alkoholen im Bier ergänzt mit kurzen Literatursuchen anlässlich ihrer Entstehung, Rolle und sensorischen Wirkung im Bier zusammengefasst.

Auf den realen Biermustern wurden ein Isolationsverfahren und Konzentration von aromatischen Alkoholen im Bier durch die Ausnützung der Extraktionsmethode auf der soliden Phase (SPE) und die Detektion mittels der Verbindung der Gaschromatographie und Gewichts-spektrophotometrie (GC-MS) erfolgreich durchgeführt.

Klíčová slova: *aromatické alkoholy, extrakce na pevné fázi, SPE, hmotnostní spektrometrie, GC-MS*

Keywords: *aromatic alcohols, solid phase extraction, SPE, mass spectrometry, GC-MS*

1 ÚVOD

Se stoupajícími znalostmi o složení piva roste i počet sloučenin, ovlivňujících v menší či větší míře jeho senzorické vlastnosti. Koncentrace mnohých z nich překračují prahové hodnoty vnímání a podstatně ovlivňují chuť piva (vyšší alifatické alkoholy, diacetyl, estery nižších mastných kyselin), jiné se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, často se pohybujících pod prahovou hodnotou vnímání. Je však důležité si uvědomit, že teprve celkový soubor jejich účinků ovlivňuje výsledný senzorický profil piva a určuje tak jeho charakter. Mezi látky s významnými senzorickými vlastnostmi, jejichž počet již přesáhl 450, se bezesporu řadí i aromatické alkoholy, někdy též nazývané alkoholy fenolické. Na rozdíl od ostatních těkavých látek (esterů mastných kyselin, nižších a vyšších alifatických alkoholů) není o obsahu a senzorických vlastnostech aromatických alkoholů přítomných v pivu publikováno příliš mnoho informací. Cílem práce bylo proto vypracovat spolehlivou a rychlou metodu stanovení této skupiny látek v běžných pivech, ale i v pivech s nižším obsahem alkoholu a porovnat dosažené výsledky s výsledky dosud publikovanými. To umožní v budoucnu stanovit obsah aromatických alkoholů jako významných senzoricky aktivních látek, s vyšší citlivostí a přesností a případně zpřesnit nebo doplnit dosud udávané tabelární hodnoty jejich obsahu v pivu. Toto dále umožní dokonale definovat po analytické stránce senzorický profil piva a vyhodnotit dopad zvolených technologických zásahů při jeho výrobě.

1 INTRODUCTION

The number of compounds which affect more or less beer's sensory characteristics grows as the knowledge of beer composition broadens. The concentration of many of these compounds surpasses the sensory threshold values and they significantly affect the taste of beer (higher aliphatic alcohols, diacetyl, lower fatty acid esters). Other compounds are present in very low concentrations below the sensory threshold value. It is important to note that only the overall set of their effects influences the resultant sensory profile of the beer and thus shapes its character. Aromatic alcohols, sometimes referred to as phenolic alcohols, undoubtedly belong among the substances with significant sensory characteristics, whose number has already exceeded 450. In contrast to other volatile substances (fatty acid esters, lower and higher aliphatic alcohols), not much information has been published regarding the content and sensory characteristics of aromatic alcohols in beer. Therefore, the aim of the work was to create a reliable and fast method for determining this group of substances in usual beers as well as in beers with less alcohol and to compare the obtained results with those already published. This will enable to determine the content of aromatic alcohols as significant sensory active substances with higher precision and possibly to specify or complete the current reference tables with values of their content in beer. Furthermore, this will allow to perfectly define the analytical aspect of the sensory profile of beer and to evaluate the influence of the technological steps selected during its production.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Aromatické alkoholy, jejich vznik, výskyt a významné senzorické vlastnosti

Hlavními představiteli aromatických alkoholů v pivu jsou 2-fenylethanol, guajakol a jeho deriváty 4-vinylguajakol a 4-ethylguajakol, eugenol, tyrosol a tryptofol (obr. 1).

Aromatické alkoholy 2-fenylethanol, tyrosol a tryptofol jsou obdobně jako vyšší alifatické alkoholy produkovány kvasinkami katabolickým nebo anabolickým procesem během kvašení. V případě procesu katabolického, kdy získává buňka energii rozkladem substrátu (mladiny), buňka přeměňuje aminokyseliny přítomné v mladině pomocí transaminačního cyklu za přítomnosti kyseliny α -ketoglutarové na příslušné α -ketokyseliny. Přebytek α -ketokyselin je dále dekarboxylován na aldehydy a ty jsou následně redukovány enzymem alkoholdehydrogenázou na alkoholy. Při procesu anabolickém jsou vyšší alkoholy naopak syntetizovány z α -ketokyselin vzniklých při syntéze aminokyselin z cukrů přítomných v mladině [1-5]. Například 2-fenylethanol takto vzniká z fenylalaninu jeho deaminací a oxidativní dekarboxylací přes meziprodukt kyselinu fenylpyrohroznovou [6]. Tyrosol obdobným způsobem z tyrosinu přes p-hydroxyfenylacetaldehyd [7]. Na vznik 2-fenylethanolu mají podstatný vliv podmínky kvašení, tj. například imobilizace kvasničných buněk [8]. Bylo zjištěno, že se na tvorbě vyšších alifatických alkoholů i 2-fenylethanolu podílí kvasinky i v průběhu zrání piva v ležáckém sklepě [6]. Výše popsanými mechanismy lze objasnit vznik 2-methylpropanolu z valinu, 3-methylbutanolu z leucinu, 2-methylbutanolu z isoleucinu, 2-fenylethanolu z fenylalaninu, tryptofolu z tryptofanu a tyrosolu z tyrosinu. Avšak tvorbu některých alkoholů obsažených v pivu nebylo možné reakčním mechanismem navrženým Ehrlichem [1] vysvětlit, protože se odpovídající výchozí aminokyseliny nevyskytovaly v mladině. Také rychlost úbytku aminokyselin ze substrátu a tomu odpovídající přírůstky vyšších alkoholů a jejich finální obsah neodpovídal předpokladu, že by mohly být tyto aminokyseliny jediným zdrojem pro vznik vyšších alkoholů. Z výsledků výzkumných prací lze vyvodit, že produkce vyšších alkoholů souvisí také s metabolismem sacharidů [9-11]. V současné době se tedy považují za prekurzory vyšších alkoholů zejména α -ketokyseliny, které jsou meziproduktem metabolismu aminokyselin i sacharidů.

Na obsah 2-fenylethanolu v pivu má dále vliv i použitý technologický postup při výrobě piva, například způsob jeho dealkoholizace [12] nebo průběh varu mladiny [13].

Zatímco přítomnost 2-fenylethanolu je v pivu vnímána spíše pozitivně, neboť se projevuje příjemnou květinovou vůní (po růžích), přítomnost guajakolu a jeho derivátů 4-ethyl a zejména 4-vinylguajakolu může při překročení běžných hodnot znamenat významný negativní vliv na výsledný senzorický profil piva. Za prekurzory těchto aromatických alkoholů jsou pokládány kyseliny p-kumarová, sinapová a zejména kyselina ferulová [14]. V obilném zrna jsou tyto látky vázány ve formě esterů nebo glykosidicky ve formě ferulovaných oligosacharidů [15]. I když byl pozorován nárůst obsahu 4-vinylguajakolu termickým štěpením při výrobě barevných sladů [16], za příčinu jeho vyššího obsahu v pivu je pokládána ferulylesterázová aktivita kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* [17]. Obdobná enzymová aktivita byla pozorována i při produkci fenolických cizích vůní (POF) u vína způsobené nejen přítomností divokých kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, ale i zástupci jiných kmenů, např. *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Pichia* a *Brettanomyces* [18]. Při přípravě

2 LITERARY OVERVIEW

2.1 Aromatic alcohols, their formation, presence and significant sensory characteristics

The main representatives of aromatic alcohols in beer are 2-phenylethanol, guaiacol and its derivatives 4-vinylguaiacol and 4-ethylguaiacol, eugenol, tyrosol and tryptophol (Fig. 1).

Similarly as higher aliphatic alcohols, the aromatic alcohols 2-phenylethanol, tyrosol and tryptophol are produced by yeast in a catabolic or anabolic pathway during fermentation. In the catabolic pathway where the cell gains energy from the breakdown of the (hopped) wort, the cell transforms the amino acids present in the (hopped) wort into α -keto acids by a transamination reaction with the presence of α -ketoglutaric acid. The surplus of α -keto acids is decarboxylated to aldehydes, which are then reduced by an alcohol dehydrogenase enzyme to alcohols. During the anabolic process, higher alcohols are synthesized from α -keto acids, which are produced by the synthesis of amino acids from sugars present in the (hopped) wort [1-5].

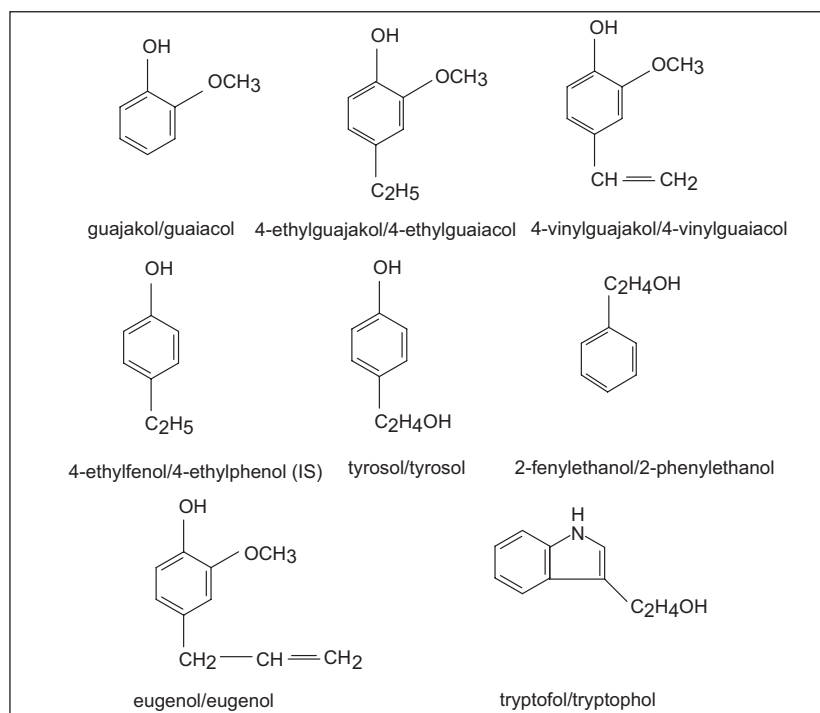
For example, 2-phenylethanol forms this way by deamination and oxidative decarboxylation of phenylalanine with phenylpyruvic acid as an intermediate [6]. Similarly, tyrosol forms from tyrosine over p-hydroxyphenylacetaldehyde [7]. Fermentation conditions, such as immobilization of yeast cells, have a considerable influence on the formation of 2-phenylethanol [8]. It was found that yeast contributes to the formation of higher aliphatic alcohols and 2-phenylethanol even during beer ageing in the ageing cellars [6]. The abovementioned mechanisms illustrate the formation of 2-methylpropanol from valine, 3-methylbutanol from leucine, 2-methylbutanol from isoleucine, 2-phenylethanol from phenylalanine, tryptophol from tryptophane, and tyrosol from tyrosine. Nevertheless, it was not possible to explain the formation of some alcohols contained in beer by the reaction mechanism proposed by Ehrlich [1], because the corresponding reactant amino acids were not present in (hopped) wort. Furthermore, the rate of the decrease of amino acids from the substrate and the corresponding increase of higher alcohols and their resultant content did not correspond with the assumption that these amino acids could be the only source for the formation of higher alcohols. From results of research projects, it can be concluded that the production of high alcohols is also associated with metabolism of saccharides [9-11]. Therefore, especially α -keto acids, which are an intermediate of metabolism of both amino acids and saccharides, are currently considered precursors of higher alcohols.

The technological method used in beer production, such as the process of dealcoholization [12] or the course of (hopped) wort boil [13], affects the 2-phenylethanol content in beer.

While the presence of 2-phenylethanol in beer is perceived rather

positively, as it gives a pleasant flower scent (roses), the presence of guaiacol and its derivatives 4-ethyl and particularly 4-vinylguaiacol can have a significant negative effect on the resultant sensory profile of beer if it exceeds usual values. Sinapic, p-coumaric, and especially ferulic acid are considered the precursors of these aromatic alcohols [14]. In grains, these substances are bonded in the form of esters or glycosidically in the form of feruloylated oligosaccharides [15]. Although an increase in 4-vinylguaiacol content was observed during thermal fission when producing coloured malts [16], feruloyl esterase activity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* is considered to be the cause of its higher content in beer [17].

A similar enzyme activity was observed during the production of phenolic off-



Obr. 1 Hlavní zástupci aromatických alkoholů / Fig. 1 Main representatives of aromatic alcohols



Navštivte
nás na
drinktec
v hale B4.

Ať se na to podíváte z kterékoli strany: Kvalita na celé čáře.

Vy určíte obsah a formu, my dodáme optimální zařízení – vyrobené na míru podle nejvyšších technologických nároků. KHS vás bude doprovázet od koncepce až po zprovoznění jednotlivých komponent nebo kompletních plnicích a balicích linek a podpoří vás i při plynulé optimalizaci výrobních produktů. Důvěřujte řešení Life Cycle Solutions společnosti KHS a zvyšte efektivitu vašich strojů – pro dlouhodobý úspěch v podnikání!

www.khs.com/lifecycle

Competence in Solutions.



sladiny respektive mladiny mohou být volné fenolkarbonové kyseliny převedeny termální dekarboxylací [16] a následnými Maillardovými reakcemi na odpovídající fenoly, fenoethery, α -pyrony, což jsou látky, které jsou pokládány za látky zvyšující aroma. Proto byly detailně studovány změny obsahu 4-vinylguajakolu [19, 20] během varu mladiny. Dosud publikované poznatky týkající se vlivu technologických podmínek na vznik aromatických alkoholů včetně výsledků vlastního studia úlohy kvasničného kmene na vznik aromatických alkoholů v závislosti na podmínkách kvašení uvádějí Čulík et al. [21].

Základní údaje o běžném rozsahu koncentrací aromatických alkoholů ve světlých pivech, jejich prahových hodnotách a smyslové charakteristice jsou uvedeny v tab. 1 [22-25]. Je zde však nutné uvést, že se od sebe různé autory uváděné hodnoty v některých případech značně liší, což je způsobeno nejen použitým analytickým postupem, ale i různými druhy piv.

flavour in wine caused not only by the presence of wild yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but also by representatives of other varieties, for ex. *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Pichia* a *Brettanomyces* [18]. During wort and hopped wort production, free phenolcarbonic acids can be transformed by thermal decarboxylation [16] and by Maillard's reactions into the corresponding phenols, phenyl ethers, γ -pyrons, which are substances that are considered to enhance aroma. For that reason, changes in 4-vinylguaiacol content [19, 20] were studied in detail during (hopped) wort boil. Čulík et al. [21] present the thus far published findings regarding the influence of technological conditions on the formation of aromatic alcohols including results from a study of the effect of a yeast variety on the formation of aromatic alcohols in relation to fermentation conditions.

The main information about the usual range of aromatic alcohol concentrations in lager (pale) beers, their threshold values and sen-

Tab. 1 Běžné hodnoty obsahu vybraných aromatických alkoholů ve světlých pivech, jejich prahové hodnoty a smyslová charakteristika / Usual values of content of selected aromatic alcohols in lager (pale) beers, their sensory threshold values and characteristic

Látka / Substance	Běžný rozsah koncentrací (světlé pivo) (mg/l) / Usual concentration range (pale beer) (mg/L)	Prahová hodnota vnímání (mg/l) / Sensory threshold values (mg/L)	Smyslová charakteristika / Sensory characteristic
2-Fenylethanol / 2-Phenylethanol	8–35	125	Rose scent, sweet perfume
Guajakol / Guaiacol	0.01–0.02	NS	Phenolic, burnt
Eugenol / Eugenol	0.02	NS	Spicy, peppery
4-Ethylguajakol / 4-Ethylguaiacol	0.01–0.1	0.1	Phenolic, bitter
4-Vinylguajakol / 4-Vinylguaiacol	0.05–0.55	0.3	Phenol, glove, bitter
Tyrosol / Tyrosol	3–22	100–200	Bitter, chemical
Tryptofol / Tryptophol	0.1–1.7	400	Bready
4-Ethylfenol / 4-Ethylphenol	0–0.01	0.3	Phenolic

2.2 Analýza aromatických alkoholů

Původně byly aromatické alkoholy stanovovány spektrofotometricky [26, 27]. Izolace byla prováděna nejčastěji destilací vzorku piva [28]. Metodu vhodnou pro selektivní stanovení 2-fenylethanolu publikoval Stevens [29]. Tyrosol a tryptofol stanovil pomocí plynové chromatografie Nykanen [30]. Protože platí, že dosažené výsledky v rozhodující míře ovlivňuje použitý izolační postup, byla původně běžně používaná destilační metoda modifikována a případně doplněna o další kroky, například přečištění na sloupci oxidu hlinitého [31]. K extrakci byla vyzkoušena různá rozpouštědla jako například sirouhlík a hexanol [32], ethylacetát [33,34] nebo směs pentan-diethylether [14]. V poslední době se však dostávají do popředí moderní separační postupy, mezi něž například patří extrakce na pevné fázi (SPE). Saegusa a kol. [35] izolovali guajakol společně s katecholem z moči extrakcí na kolonce plněné silikagelem (Extrelut 3). Využili derivatizační silylační postup a deriváty stanovili pomocí přístrojového spojení GC-MS. Kombinací destilace s vodní párou a SPE použil Donhauser a kol. [36]. Aromatické alkoholy a ostatní fenoly lze stanovit i ve formě jejich 2-4-dinitrofenylderivátů pomocí plynové kapilární chromatografie [37]. Stále více nalazají v této oblasti uplatnění i metody využívající k detekci hmotnostní spektrometrii (GC-MS) ve spojení s koncentračními metodami, jako např. „purge and trap“ metodou [38] nebo metodou mikroextrakce na pevné fázi (SPME) [39]. Velmi přesné výsledky, avšak za nesrovnatelně vyšších nákladů, lze získat metodou GC-MS využívající postup izotopového zředování, kdy se ke kvantifikaci přítomného analytu používají nejčastěji deuterované analogy stanovené látky [40, 41]. Ke stanovení 4-vinylguajakolu lze použít i přístrojové spojení HPLC s fluorescenčním detektorem (FPLC-FD), kdy lze dosáhnout detekční limit 0,002 mg/l, nebo s elektrochemickým detektorem s poněkud horší mezí detekce okolo 0,01 mg/l [42]. Obdobně použili při stanovení obsahu 2-fenylethanolu, tyrosolu a tryptofolu v pivu Li et al. [43] spojení HPLC s detektorem s diodovým polem (DAD, diode array detector).

Při stanovení obsahu 4-ethylfenolu a 4-ethylguajakolu ve víně byla použita i vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS-MS) a kombinací detektoru s diodovým polem a detektoru fluorescenčního (DAD-FD) [44]. Aromatické alkoholy lze však stanovit i takovými neobvyklými metodami, jako je například micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) [45] nebo metodou jednoduché nukleární rezonance (^1H NMR) či dokonce dvoudimenzionální nukleární rezonance (2D NMR), schopných rozlišit od sebe i jednotlivé značky pív [46-48]. Náklady na pořízení posledně jmenovaných přístrojů však řádově převyšují normální pořizovací náklady, a proto se tento způsob v běžné praxi zatím neuplatňuje.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Extrakce aromatických alkoholů metodou SPE a jejich stanovení na přístrojovém spojení GC-MS

K extrakci aromatických alkoholů z piva byla použita metoda Čulíka et al. [49] pracující na principu SPE. Vlastní stanovení analytů bylo provedeno novým postupem pomocí přístrojového spojení GC-MS. Detailní údaje jsou uvedeny dále.

3.1.1 Použité přístroje, zařízení a chemikálie

Přístroje a zařízení:

- plynový chromatograf-MS: Trace GC Ultra – DSQ II
- data systém: Excalibur (GC-MS)
- sušárna KBC G – 100/250
- ultrazvuková lázeň Tesla
- lednice s mrazničkou
- membránová vývěva
- zařízení pro extrakci na pevné fázi (Supelco)
- stojan na zakoncentrování extraktů proudem dusíku
- pH meter PHM 84
- myčka nádobí Miele

Materiál:

- kónická zkumavka o objemu 10 ml s jemným kalibrováním do 1 ml
- centrifugační zkumavka o objemu cca 10 ml se zábrusem NZ 14/19
- kádinky 250 ml, 150ml
- pipeta o objemu 20 ml
- pipeta o objemu 1 ml
- odměrný válec o objemu 25 ml

sory characteristics are listed in *tab. 1* [22-25]. It is important to note, that the listed values vary greatly in some cases from different authors due to the analytical method used and different types of beers.

2.2 Analysis of aromatic alcohols

At first, aromatic alcohols were determined by spectrophotometry [26, 27]. Isolation was most often done by distilling the beer sample [28]. Stevens published a suitable method for selective determination of 2-phenylethanol [29]. Nykanen determined tyrosol and tryptophol using gas chromatography [30]. Since the isolation method used considerably affects the obtained results, the initially commonly used distilling method was modified and sometimes accompanied by additional steps, for example purification on an aluminum oxide filled column [31]. Various solvents such as carbon disulphide and hexanol [32], ethylacetate [33, 34] or pentane-diethylether mixture [14] were tested for extraction. However, modern separation methods, for instance solid phase extraction, have recently been taking over the lead. Seagusa et al. [35] isolated guaiacol along with catechol from urine by extraction on silicagel-filled column (Extrelut 3). They used derivative silylation method and determined the derivatives using the GC-MS combination. Donhauser et al. [36] used a combination of distillation with water steam and SPE. It is possible to determine aromatic alcohols and other phenols also in the form of their 2-4-dinitrophenyl derivatives using gas capillary chromatography [37]. More and more applications are found for methods using mass spectrometry (GC-MS) in combination with concentration methods, for instance “purge and trap” method [38] or solid phase microextraction [39]. Very precise results can be attained, although with incomparably higher expenses, by the GC-MS method which uses isotope dilution, where most often deuterated analogs of the determined substance are used for the quantification of the analyte [40-41].

Combination of HPLC with fluorescent detector (FPLC-FD), with a possible limit of detection of 0,002 mg/l, or electrochemical detector with a somewhat worse detection range of around 0,01 mg/l can also be used to determine 4-vinylguaiacol [42]. Similarly, Li et al. [43] used a combination of HPLC with a diode array detector (DAD) when determining 2-phenylethanol content.

High performance liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) and a combination of diode array detector and fluorescent detector (DAD-FD) have been used to determine 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol content in wine [44]. However, aromatic alcohols can also be determined by such unusual methods as are for example micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [45], simple nuclear magnetic resonance (^1H NMR) or even two-dimensional nuclear magnetic resonance (2D NMR), able to distinguish different beer brands [46-48]. However, the expenses with acquisition of the instruments mentioned last exceed the normal acquisition expenses, and so this method is not yet used in regular practice.

3 EXPERIMENTAL SECTION

3.1 Extraction of aromatic alcohols by SPE and their determination on GC-MS

The method used by Čulík et al. [49] working on the SPE principle was used to extract the aromatic alcohols from beer. The actual determination of analytes was performed by a new method using a combination of GC-MS. Detailed information follows.

3.1.1 Instruments, equipment and chemicals used

Instruments and equipment:

- gas chromatograph-MS: Trace GC Ultra – DSQ II
- data system: Excalibur (GC-MS)
- drying oven KBC G – 100/250
- ultrasound bath Tesla
- refrigerator with freezer
- membrane vacuum pump
- solid phase extraction equipment (Supelco)
- stand for increasing concentration of extracts by nitrogen flow
- pH meter PHM 84
- dishwasher Miele

Material:

- conic test tube with volume of 10 ml with fine calibrating to 1 ml
- centrifugal test tube with volume of cca 10 ml with a ground joint neck NZ 14/19

- odměrný válec o objemu 50 ml
- kapilární kolona RTX-5Sil MS Integra Guard (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm)
- stříkačky (Hamilton) o objemu 10 µl, 100 a 500 µl
- odměrná baňka o objemu 10 ml se zábrusem a skleněnou zátkou
- odměrná baňka o objemu 50 ml se zábrusem a skleněnou zátkou
- nálevka
- skládaný filtrační papír

Chemikálie:

- ethanol, methanol, aceton p. a. (Lachema)
- ethylacetát (Merck)
- hydroxid sodný
- voda čištěná reversní osmosou na zařízení Millipore Milli-RO 5plus
- hélium o čistotě 5.0 Messer (pro GC-MS)
- dusík o čistotě 4.8
- extrakční (SPE) kolonky LiChrolut EN 200 mg (Merck)

Chromatografické standardy:

- guajakol, tryptofol, 4-ethylguajakol, 4-vinylguajakol, eugenol (Sigma- Aldrich)
- tyrosol, 4-ethylfenol, (Fluka)
- 2-fenylethanol (Merck)

3.1.2 Analytický postup stanovení aromatických alkoholů

Extrakční postup:

Přibližně 50 ml vzorku piva odplyníme v ultrazvukové lázni a pH vzorku upravíme přidávkem roztoku hydroxidu sodného (o koncentraci 10 mol/l) na hodnotu 8,5. Poté odměříme do zkumavky 10 ml takto upraveného vzorku a přidáme 0,1 ml roztoku vnitřního standardu (4-ethylfenolu) o koncentraci cca 30 mg/l.

Extrakční (SPE) kolonku LiChrolut EN 200 mg kondicionujeme na zařízení pro extrakci na pevné fázi následujícím způsobem. Kolonku promyjeme postupně 2 ml methanolu a poté 2 ml vody, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 8,5. Po kondicionování nesmí kolonka vyschnout, a proto ihned na kolonku převedeme 10 ml vzorku uprave-

- beakers 250 ml, 150 ml
- pipette with volume of 20 ml
- pipette with volume of 1 ml
- graduated cylinder with volume of 25 ml
- graduated cylinder with volume of 50 ml
- capillary column RTX-5Sil MS Integra Guard (30 m, 0.25 mm, 0,25 µm)
- syringe (Hamilton) with volume of 10 µl, 100 and 500 µl.
- measuring flask with volume of 10 ml with a ground joint neck and glass stopper
- measuring flask with volume of 50 ml with a ground joint neck and glass stopper
- funnel
- folded filtration paper

Chemicals:

- ethanol, methanol, acetone p. a. (Lachema)
- ethylacetate (Merck)
- sodium hydroxide
- water purified by reverse osmosis on Millipore Milli-RO 5plus instrument
- helium with purity 5.0 Messer (for GC-MS)
- nitrogen with purity 4.8
- extraction (SPE) columns LiChrolut EN 200 mg (Merck)

Chromatography standards:

- guaiacol, tryptophol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylguaiacol, eugenol (Sigma- Aldrich)
- tyrosol, 4-ethylphenol, (Fluka)
- 2-phenylethanol (Merck)

3.1.2 Analytic method of determining aromatic alcohols

Extraction method:

Degas approximately 50 ml of beer sample in ultrasound bath and adjust the pH of the sample to 8.5 by adding sodium hydroxide solution (10 mol/l concentration). Measure 10 ml of the prepared sam-

Tab. 2 Základní údaje o stanovených sloučeninách / Essential information about determined substances

Látka / Substance	CAS	Přibližný retenční čas / Approximate retention time (min)	Molekulová hmotnost / Molecular mass	Charakteristické ionty / Typical ions (EI-SIM)
Guajakol / Guaiacol (2-methoxyphenol)	90-05-1	4.74	124	81, 109, 124
2-Fenylethanol / 2-Phenylethanol	60-12-8	5.00	122	91, 92, 122
4-Ethylfenol / 4-Ethylphenol (IS)	123-07-9	5.40	122	77, 107, 122
4-Ethylguajakol / 4-Ethylguaiacol	2785-89-9	6.37	152	123, 137, 152
4-Vinylguajakol / 4-Vinylguaiacol (2-methoxy-4-vinylphenol)	7786-61-0	6.67	150	107, 135, 150
Eugenol / Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol)	97-53-0	6.96	164	103, 149, 164
Tyrosol / Tyrosol (2-(4-hydroxyphenyl)ethanol)	501-94-0	7.43	138	107, 138
Tryptofol / Tryptophol (3-(2-hydroxyethyl)indol)	526-55-6	9.33	161	130, 161

Tab. 3 Linearita stanovení / Linearity determination

Látka / Substance	Koncentrace / Concentration range (mg/l)	Lineární regresní koeficient / Linear regression coefficient (column CP-Sil 8 CB)	Lineární stanovení / Linear regression coefficient (column RTX5-Sil MS)
Guaiacol / Guaiacol	0 – 27.8	0.9956	0.9996
2-Fenylethanol / 2-Phenylethanol	0 – 26.4	0.9952	0.9984
4-Ethylguajakol / 4-Ethylguaiacol	0 – 49.8	0.9953	0.9998
4-Vinylguajakol / 4-Vinylguaiacol	0 – 38.2	0.9882	0.9994
Eugenol / Eugenol	0 – 27.4	0.9913	0.9995
Tyrosol / Tyrosol	0 – 30.6	0.9867	0.9976
Tryptofol / Tryptophol	0 – 29.6	0.9745	0.9955

Tab. 4. Opakovatelnost a vnitrolaboratorní reprodukovatelnost (kolona RTx5-Sil MS) / *Intralaboratory reproducibility and repeatability (column RTx5-Sil MS)*

Látka / <i>Substance</i>	Průměrný obsah / <i>Average content</i> (mg/l)	Opakovatelnost variační koeficient / <i>Repeatability</i> <i>coefficient of variation (%)</i>	Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost variační koeficient / <i>Intralaboratory</i> <i>reproducibility coefficient</i> <i>of variation (%)</i>
Guajacol / <i>Guaiacol</i>	0.003	3.25	7.28
2-Fenylethanol / <i>2-Phenylethanol</i>	23.05	5.80	5.84
4-Ethylguajakol / <i>4-Ethylguaiacol</i>	0.001	12.1	14.58
4-Vinylguajakol / <i>4-Vinylguaiacol</i>	1.095	6.54	6.76
Eugenol / <i>Eugenol</i>	0.008	9.77	15.46
Tyrosol / <i>Tyrosol</i>	11.88	2.48	3.31
Tryptofol / <i>Tryptophol</i>	0.447	4.55	6.21

ného výše popsaným způsobem. Průchod methanolu, vody i vzorku kolonkou je urychlen působením vakua z membránové vývěvy. Po průchodu vzorku kolonku propláchneme opět 2 ml vody (pH = 8,5). Vše jímáme do centrifugační zkumavky, jejíž obsah následně vyprázdníme do odpadu. Kolonku vyjmeme ze zařízení pro extrakci na pevné fázi a nasadíme na ústí ventilu na dusíkové lahvi. Mírným proudem dusíku po dobu asi 3 min kolonku vysušíme. Viditelné zesvětlení náplně je znakem dokonalého vysušení. Dále kolonku opět nasadíme do zařízení pro extrakci na pevné fázi a provedeme eluci 2 ml ethylacetátu. Prosátí kolonky provedeme vakuově pomocí membránové vývěvy. Eluát jímáme do kalibrované kónické zkumavky a dále bez zahuštění jeho část převedeme do vialky opatřené insertem a šroubovacím. Vialky se vzorky přechováváme v mrazáku při teplotě -18°C .

Podmínky na přístrojovém spojení GC-MS

GC podmínky: Spojení GC – MS (Trace GC Ultra – DSQ II)

Kolona: RTx5-Sil MS Integra Guard, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μm , (Restek) nebo alternativně CP-Sil 8 CB (50 m, 0,25 mm, 0,25 μm), (Chrompack)

Injektor: 250°C , splitless 1 min (split flow 50 ml/min)

Objem nástřiku: 1 μl

Teplota transfer line GC-MS: 250°C

Teplota zdroje MS: 200°C

Teplotní program pece pro kolonu CP-Sil 8 CB:

70°C (3 min) -7°C/min -150°C (0 min) -10°C/min -260°C (2 min)

Teplotní program pece pro kolonu RTx5-Sil MS:

70°C (1 min) -17°C/min -155°C (0 min) -25°C/min -260°C (2 min)

Kvantitativně byl obsah aromatických alkoholů stanoven v SIM módu. Základní údaje jsou uvedeny v tab. 2.

3.1.3 Porovnání dělicí schopnosti kolon RTx5-Sil MS a CP-Sil 8 CB

Pro stanovení aromatických alkoholů byly zvoleny křemenné kapilární kolony smočené nepolární fází, tj. pouze s 5 % dimethylpolysil-

ple into a test tube and add 0,1 ml of standard solution (4-ethylphenol) of 30 mg/l concentration.

Condition the extraction (SPE) column LiChrolut EN 200 mg on equipment for solid phase extraction in the following way. Rinse the column with 2 ml of methanol and then with 2 ml of water, whose pH has been adjusted to 8.5. The column must not dry after the conditioning and therefore immediately transfer 10 ml of the sample, prepared by the abovementioned way, to the column. The flow of methanol, water and then sample is made faster by the vacuum from the vacuum pump. Once the sample has flowed through the column, rinse it again with 2 ml of water (pH = 8.5). Collect everything into a centrifugal test tube, whose content then empty into the drain. Remove the column from the equipment for solid phase extraction and place it at the mouth of the valve on a nitrogen cylinder.

Dry the column with moderate nitrogen flow for about 3 min. A visibly lighter colour of the filling signifies thorough drying. Place the column back into the equipment for solid phase extraction and perform elution of 2 ml of ethylacetate. Perform suction of the column by vacuum using the membrane vacuum pump. Collect the eluate into a calibrated conical test tube and then without thickening transfer a part of it to a screw cap vial. Store the vials with samples in the freezer at -18°C .

Conditions on GC-MS

GC conditions: Connection GC – MS (Trace GC Ultra – DSQ II)

Column: RTx5-Sil MS Integra Guard, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μm , (Restek) or alternatively CP-Sil 8 CB (50 m, 0.25 mm, 0.25 μm), (Chrompack)

Injektor: 250°C , splitless 1 min (split flow 50 ml/min)

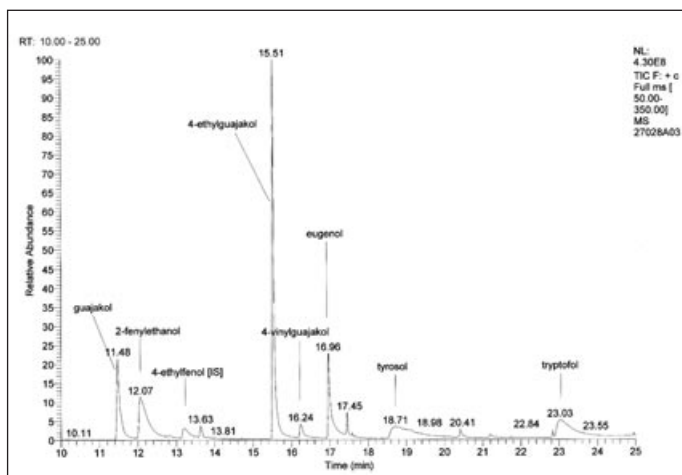
sample volume: 1 μl

Transfer line temperature GC-MS: 250°C

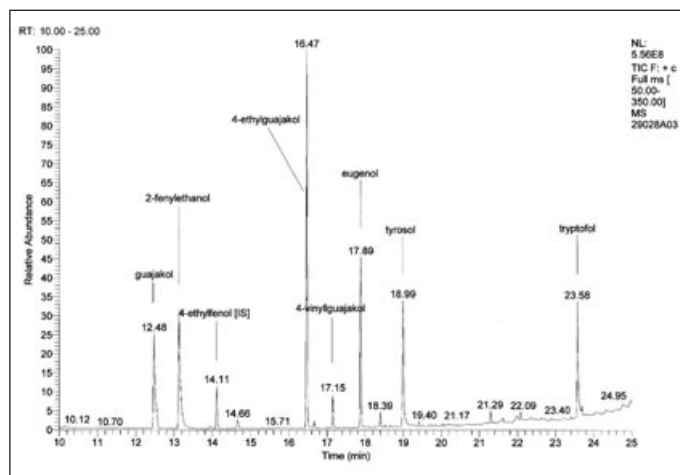
Source temperature MS: 200°C

Temperature program of oven for column CP-Sil 8 CB:

70°C (3 min) -7°C/min -150°C (0 min) -10°C/min -260°C (2 min)



Obr. 2 Chromatogram roztoku standardů aromatických alkoholů na koloně CPSil8-CB (konc. rozsah 10 až 20 mg/l) / *Fig. 2 Chromatogram of solution of standards of aromatic alcohols on column CP-Sil8-CB (conc. range 10 to 20 mg/l)*



Obr. 3 Chromatogram roztoku standardů na koloně RTx5-Sil MS (konc. rozsah 10 až 20 mg/l) / *Fig. 3 Chromatogram of solution of standards of aromatic alcohols on column RTx5-Sil MS (conc. range 10 to 20 mg/l)*

Tab. 5 Správnost a shodnost / *Precision and accuracy*

Látka / <i>Substance</i>	Průměrná výtěžnost / <i>Average yield (%)</i>	Shodnost / <i>Precision (RSD) (%)</i>
Guajakol / <i>Guaiacol</i>	60.4	8.9
2-Fenylethanol / <i>2-Phenylethanol</i>	49.5	6.4
4-Ethylfenol / <i>4-Ethylphenol</i> (IS)	80.3	8.1
4-Ethylguajakol / <i>4-Ethylguaiacol</i>	51.6	12.6
4-Vinylguajakol / <i>4-Vinylguaiacol</i>	48.4	4.4
Eugenol / <i>Eugenol</i>	69.9	7.5
Tyrosol / <i>Tyrosol</i>	61.1	2.6
Tryptofol / <i>Tryptophol</i>	47.5	2.8

Tab. 6 Meze detekce a stanovení / *Limits of detection and determination*

Látka / <i>Substance</i>	Mez detekce S/N = 3 (mg/l vzorku) / <i>Limit of detection S/N = 3 (mg/l of sample)</i>	Mez stanovení S/N = 10 (mg/l vzorku) / <i>Limit of determination S/N = 10 (mg/l of sample)</i>
Guajakol / <i>Guaiacol</i>	0.0001	0.001
2-Fenylethanol / <i>2-Phenylethanol</i>	0.005	0.02
4-Ethylfenol / <i>4-Ethylphenol</i> (IS)	0.001	0.005
4-Ethylguajakol / <i>4-Ethylguaiacol</i>	0.0005	0.002
4-Vinylguajakol / <i>4-Vinylguaiacol</i>	0.005	0.02
Eugenol / <i>Eugenol</i>	0.002	0.01
Tyrosol / <i>Tyrosol</i>	0.005	0.02
Tryptofol / <i>Tryptophol</i>	0.005	0.02

loxanu od dvou renomovaných výrobců (Restek a Chrompack). Z výsledků na obr. 2 a 3 je patrné, že se na 30 m koloně RTx5-Sil MS v porovnání s 50 m kolonou CP-Sil 8 CB, za totožných chromatografických podmínek, podařilo docílit lepších výsledků. Kolona RTx5-Sil MS vykazovala, kromě podstatného zkrácení doby analýzy, zejména v případě tyrosolu a tryptofolu, nižší chvostování jejich píků, a proto jí byla dána přednost. Přibližné retenční časy na této koloně jsou uvedeny v tab. 2.

3.1.4 Měřicí rozsah stanovení

Proměřením koncentrační řady standardů byl stanoven měřicí rozsah stanovení aromatických alkoholů. S ohledem na skutečnost, že se obsah aromatických alkoholů v pivu liší až o několik řádů, bylo nutné ověřit, zda bude možné, s ohledem na předpokládaný dynamický rozsah hmotnostního detektoru (linearitu odezvy), využít ke kvantitativnímu vyhodnocení výsledky získané měřením extraktu bez potřeby jeho dalších úprav (ředění). Získané hodnoty pro oba typy kolon jsou uvedeny v tab. 3.

Lze tedy konstatovat, že je možné využít lineární kalibrační křivky v daném koncentračním rozsahu pro všechny stanovené látky.

3.1.5 Opakovatelnost a vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

Opakovatelnost byla ověřena osminásobným opakovaným změřením reálného vzorku extraktu piva a vyjádřena jako variační koeficient, tj. podíl vypočtené směrodatné odchylky a výsledné průměrné hodnoty v procentech. Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost byla stanovena tím způsobem, že ve dnech po sobě následujících připravili dva pracovníci čtyři paralelní extrakty jednoho vzorku a ty byly neprodleně změřeny. Výsledek byl vyjádřen obdobným způsobem jako v případě opakovatelnosti (tab. 4).

3.1.6 Správnost a shodnost

Správnost a shodnost metody byla ověřena analýzou vzorků piva obohacených přidavkem aromatických alkoholů. K osmi vzorkům komerčního piva byl přidán přidavek analytů v desetinásobku odhadovaného přirozeného množství. Správnost (pravdivost) získaných hodnot byla ověřena na základě dosažených výtěžností jednotlivých analytů, shodnost byla vyhodnocena jako směrodatná odchylka souboru výsledků (RSD) stanovení za podmínek opakovatelnosti. Výsledky jsou uvedeny v tab. 5.

3.1.7 Mez detekce a mez stanovení

Mez detekce (detekční limit na hladině pravděpodobnosti 95 %) a mez stanovení byla stanovena pomocí modulu ovládání a vyhodnocovacího softwaru Excalibur pro GC-MS (Signal to Noise Cal-

Temperature program of oven for column RTx5-Sil MS:

70 °C (1 min) –17 °C/min –155 °C (0 min) –25 °C/min –260 °C (2 min)

The content of aromatic alcohols was quantitatively determined in SIM mode. The essential information is listed in tab. 2.

3.1.3 Comparison of separating ability of columns RTx5-Sil MS and CP-Sil 8 CB

Fused silica capillary columns wetted by non-polar phase, only with 5 % dimethylpolysiloxane from two renowned producers (Restek and Chrompack), were chosen for the determination of aromatic alcohols. Results in Fig. 2 and 3 show that the 30 m column RTx5-Sil MS yielded better results than the 50 m column CP-Sil 8 CB under the same chromatographic conditions. Apart from the considerable shortening of the analysis time, column RTx5-Sil MS analyzed, especially in the case of tyrosol and tryptophol, a lower tailing of their peaks and that is why it was preferred. Approximate retention times on this column are listed in Tab. 2.

3.1.4 Determination of measuring range

Determination of measuring range of aromatic alcohols was determined by measuring the solutions of standards. With regards to the fact that the content of aromatic alcohols in beer differs by even several figures and to the expected dynamic range of mass detector (feedback linearity), it was necessary to confirm whether it will be possible to use results from measuring the extract for a quantitative assessment without the need for additional adjustments (dilution). The attained values for both types of columns are listed in Tab. 3.

Therefore, it can be concluded that it is possible to use linear calibration curves in a given concentration range for all determined substances.

3.1.5 Intralaboratory repeatability and reproducibility

Repeatability was verified by repeating the measurement of a real sample of beer extract eight times and it was expressed as a coefficient of variation, that is, the quotient of calculated standard deviation and resultant mean value as a percentage. To determine intralaboratory reproducibility, two workers prepared four parallel extracts from one sample and measured them immediately in consecutive days. The result was expressed similarly as for repeatability (Tab. 4).

3.1.6 Precision and accuracy

Precision and accuracy of the method were verified by analysis of beer samples enriched with aromatic alcohols. An enrichment of ana-

tulator) analýzou 10násobně a 100násobně zředěného standardního roztoku na koncentračních úrovních 0,01 a 0,001 mg/l. To odpovídá koncentračnímu rozmezí 0,002 a 0,0002 mg/l v reálném vzorku. Odhadnuté meze detekce a stanovení jsou uvedeny v tab. 6.

3.2 Stanovení aromatických alkoholů v reálných vzorcích pív

Chromatogram reálného vzorku piva v TIC módu je uveden na obr. 4, v SIM módu pro 2-fenylethanol, 4-vinylguajakol, tyrosol a tryptofol na obr. 5. Je zde patrné, jak výraznému zvýšení citlivosti a selektivity dojde, použijeme-li pro vyhodnocení SIM mód.

Nově navržená metoda stanovení obsahu aromatických alkoholů v pivech byla využita při mapování obsahu aromatických alkoholů v českých pivech, přičemž jsme vybrali skupiny pív tak, aby v nich byla zastoupena piva nealkoholická, světlá výčepní i ležáky od tožného výrobce. Získané výsledky budou zveřejněny v následujícím díle tohoto článku.

4 DISKUSE VÝSLEDKŮ

Výše popsáný způsob extrakce aromatických alkoholů ze vzorků pív pomocí metody SPE s následnou detekcí pomocí GC-MS lze pokládat pro účely běžné pivovarské kontroly za plně vyhovující. Na základě dosažených výsledků na obou porovnávaných kolonách lze s ohledem na získané chromatogramy konstatovat, že bylo dosaženo lepších výsledků na koloně RTX-5Sil MS (obr. 1 a 2). Linearita detektoru byla ve zvoleném koncentračním rozsahu plně vyhovující (tab. 2). Dosažená opakovatelnost měření (tab. 3), jeho správnost a shodnost (tab. 4), stejně jako dosažené meze detekce a stanovení u jednotlivých látek (tab. 5), potvrzují schopnost navrženého analytického postupu stanovit obsahy aromatických alkoholů v reálných vzorcích pív s dostatečnou citlivostí a správností.

Uvedený analytický postup byl dále využit při detailním studiu obsahu aromatických alkoholů v českých pivech, a to jak běžných výčepních a ležáčích, tak i v pivech nealkoholických. Výsledky této studie budou zveřejněny v navazujícím díle na tento článek.

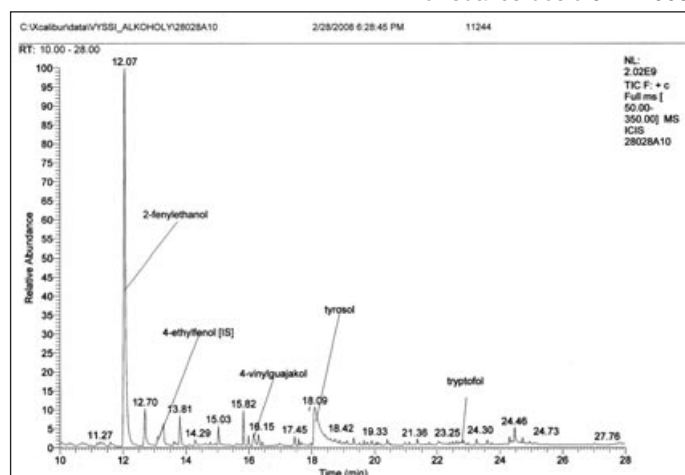
5 ZÁVĚR

V práci byl popsán nový analytický postup stanovení aromatických alkoholů pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) a jejich následné stanovení pomocí přístrojového spojení GC-MS splňuje náročné požadavky na analýzu těchto sensoricky významných látek v pivu. Je možné jej využít jako účinného nástroje ke studiu změn obsahu sensoricky aktivních látek, způsobených například technologickými zásahy při výrobě nealkoholického piva.

Poděkování

Práce byla umožněna následujícími granty:
Výzkumný záměr MSM6019369701 „Výzkum sladařských a pivovarských surovin a technologií“
Výzkumné centrum 1M0570 „Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele.“

Recenzovaný článek
Do redakce došlo 9. 2. 2009



Obr. 4 Chromatogram reálného vzorku piva (TIC mód) / Fig. 4 Chromatogram of real beer sample (TIC mode)

lytes, ten times the estimated natural amount, was added to eight samples of commercial beers. Accuracy of the attained values was verified on the basis of the achieved yields of the individual analytes. Precision was evaluated as the relative standard deviation of determination under the conditions of repeatability. Results are listed in Tab. 5.

3.1.7 Limit of detection and limit of determination

Limit of detection (detection limit at the level of probability 95%) and limit of determination were determined using a module of the controlling and evaluating software Xcalibur for GC-MS (Signal to Noise Calculator) by analysis of 10 times and 100 times diluted standard solution with concentration levels of 0.01 and 0.001 mg/l. That corresponds to concentration range of 0.002 and 0.0002 mg/l in real sample. The estimated limits of detection and determination are listed in tab. 6.

3.2 Determining aromatic alcohols in real beer samples

The chromatogram of a real beer sample in TIC mode is shown in Fig. 4, it is shown in SIM mode for 2-phenylethanol, 4-vinylguaiacol, tyrosol and tryptophol in Fig. 5. The significant increase in sensitivity and selectivity with the SIM mode can be seen here.

A newly created method of determination of the content of aromatic alcohols in beers was used when mapping out the content of aromatic alcohols in Czech beers. We selected the beer groups so that nonalcoholic, pale drafts and lagers from the same producer were represented. The attained results will be published in the following part of this article.

4 DISCUSSION OF RESULTS

The described method of extraction of aromatic alcohols from beer samples using solid phase extraction followed by detection using GC-MS can be considered fully suitable for the purposes of ordinary brewing control. Based on the attained results from both compared columns and with regard to the chromatograms, it can be stated that better results were achieved on the RTX-5Sil MS column (Fig. 1 and 2). The detector linearity was fully suitable in the selected concentration range (Tab. 2). The achieved repeatability of measurement (Tab. 3), its accuracy and precision (Tab. 4), as well as the limits of detection and determination for individual substances (Tab. 5) confirm the ability of the created analytic method to determine contents of aromatic alcohols in real beer samples with satisfactory sensitivity and accuracy.

The described analytic method was used further in a detailed study the content of aromatic alcohols in Czech beers, in drafts and lagers as well as in nonalcoholic. The results of this study will be published in the following part of this article.

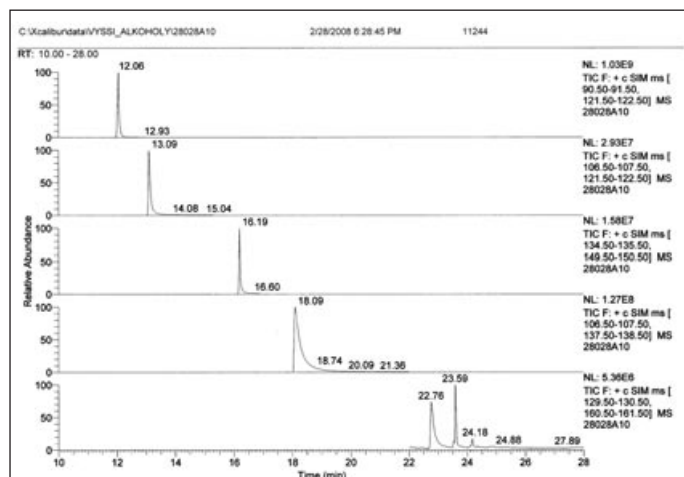
5 CONCLUSION

An analytical method for the determination of aromatic alcohols using solid phase extraction and determination by GC-MS was created in the project. The new method meets the demanding criteria for the analysis of these sensory significant substances in beer. It can be used as an efficient tool in the study of changes in the content of sensory active substances, caused by, for example, technological procedures during the production of nonalcoholic beer.

Acknowledgement

Presented results were acquired with support of these grants:
Research Plan, code MSM6019369701 “Research of malting and brewing raw materials and technologies”
Research Centre 1M0570 “Research Centre for studies on component parts of barley and hop”

Translated by Marek Mikunda



Obr. 5 Chromatogram reálného vzorku piva (SIM mód) / Fig. 5 Chromatogram of real beer sample (SIM mode)

Literatura / References

- Ehrlich, F.: Über das natürliche Isomere des Leucins. Ber. Dtsch. Chem. Ges. **37**, 1904, 1809–1840.
- Chen, E.C., H.: Relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to formation of fusel alcohols. J. Am. Soc. Brew. Chem. **36**, 1978, 39–43.
- Oshita, K., Kubota, M., Uchida, M., Ono, M.: Clarification of the relationship between fusel alcohols formation and amino acid assimilation by brewing yeast using ^{13}C -labeled amino acid. Eur. Brew. Chem. Cong. Proc. 1995, 387–402.
- Dickinson, J. R.: The catabolism of branched-chain amino acids to fusel alcohols. Eur. Brew. Chem. Symp. Monogr. **28**, 1999, 74–81.
- Debourgh, A.: Yeast flavour metabolites. Eur. Brew. Chem. Symp. Monogr. **28**, 1999, 60–73.
- Vanderhaegen, B., Coghe, S., Vanbeneden, N., Van Landschoot, A., Venderhasselt, B., Derdelinckx, G.: Yeasts as postfermentation agents in beer. Monatsschr. Brauwiss. **55**, 2002, 218–232.
- Sentheshanmuganathan, S., Eldsen, S. R.: The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. **69**, 1958, 210–218.
- Willaert, R., Nedovic, V. A.: Primary beer fermentation by immobilised yeast – a review on flavour formation and control strategies. J. Chem. Technol. Biotechnol. **81**, 2006, 1353–1367.
- Genevois, L., Lafon, M.: Transformation of labeled acetate by yeast during anaerobic fermentation; formation of succinic acid, isopropanol, amyl alcohol and sterols. Bull. Soc. Chimia Biol. **38**, 1956, 89.
- Ingraham, J. L. et al.: The pathway of formation of n-butyl and n-amyl alcohols by a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. **95**, 1961, 169.
- Van Laere, S. D. M., Verstrep, K. J., Thevelein, J. M., Vandijck, P., Delvaux, F. R.: Formation of higher alcohols and their acetate esters. *Cerevisia* **33**, 2008, 65–81.
- Bartolome, B., Pena-Neira, A., Gomez-Cordoves, C.: Phenolic and related substances in alcohol-free beers. J. Eur. Food Res. Technol. **210**, 2000, 1438–2377.
- Hertel, M., Sommer, K.: The Behaviour of flavours during the boiling of wort. *Cerevisia* **32**, 2007, s. 177–183.
- Tressl, R., Kossa, T., Renner, R.: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen flüchtiger Inhaltsstoffe von Hopfen, Würze und Beer und deren Genese. II. Phenole und sauerstoffhaltige Heterocyclusen in Würze und Beer. Eur. Brew. Chem. Cong. Proc., 1975, 737.
- Szwajgier, D., Wasko, A., Zapp, J., Targonski, Z.: An attempt to identify the low molecular feruloylated oligosaccharides in beer. J. Inst. Brew. **113**, 2007, 185–195.
- Coghe, S., Martens, E., DαHollander, H., Dirinck, P.J., Delvaux, F. R.: Sensory and instrumental flavour analysis of wort brewed with dark specialty malts. J. Inst. Brew. **110**, 2004, 94–103.
- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., Delvaux, F.: Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Agric. Food Chem. **52**, 2004, 602–608.
- Shinohara, T., Kubodera, S., Yanagida, F.: Distribution of Phenolic Yeasts and Production of Phenolic Off-Flavors in Wine Fermentation. J. Biosci. Bioeng. **90**, 2000, 90–97.
- De Schutter, D. P., Derdelinckx, G., Delvaux, F. R.: Flavour Impact of Innovative Wort Boiling Technologies. *Cerevisia* **32**, 2007, 162–176.
- Ogane, O., Imai, T., Ogawa, Y., Ohkochi, M.: Influence of Wort Boiling and Wort Clarification Conditions on Aging-Relevant Carbonyl Compounds in Beer. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **43**, 2006, 121–126.
- Čulík, J., Figalla, K., Jurková, M., Poledníková, M.: Studium úlohy kvasničného kmene při vzniku vyšších aromatických senzorycky aktivních alkoholů v závislosti na podmínkách kvašení. Kvasny Prum. **45**, 1999, 91–94.
- Pollock, J. R. A.: v knize Brewery Science, Vol. 2, Academic Press, London, 1981.
- Moll, M.: v knize Beer and Coolers, TEC and DOC – Lavoisier, Paris, 1991, angl. překlad Intercept. Ltd.
- Analytica EBC, European Brewery Convention, 5 vydání, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 1998.
- Dufour, J.-P. et al.: Quantitative Analysis of Beer Aromatic Alcohols Using Stable Isotope Dilution Assay. J. Am. Soc. Brew. Chem. **60**, 2002, 88–96.
- Drews, B., Specht, H., Bärwald, G., Riemann, J.: Kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung der höheren aliphatischen Alkohole im Bier. Mschr. Brauerei **18**, 1965, 128–130.
- Kapeller-Adler, R., Toda, K.: Über das Vorkommen von Monomethylamine im Harn. Biochem. Z. **185**, 1932, 252.
- McFarlane, W. D., Thompson, K. D.: Colorimetric methods for determination of aromatic alcohols in beer. J. Inst. Brew. **70**, 1964, 497.
- Stevens, R.: Beer flavour. III. Beta-phenylethanol. J. Inst. Brew. **67**, 1961, 329.
- Nykänen, L., Puputti, E., Suomalainen, H.: Gas chromatographic determination of tyrosol and tryptophol in wines and beers. J. Inst. Brew. **72**, 1966, 24–28.
- Kieninger, H., Boeck, D.: Gaschromatographische Bestimmung einiger flüchtiger Phenole in Gerste, Grünmalz, Malz, Würze und Bier. Brauwiss. **30**, 1977, 357.
- Alvarez, P. et al.: Analysis of Free Fatty Acids, Fusel Alcohols, and Esters in Beer: An Alternative to CS_2 Extraction. J. Am. Soc. Brew. Chem. **52**, 1994, 127.
- Szlvako, C. M.: Tryptophol, tyrosol and phenylethanol – the aromatic higher alcohols in beer. J. Inst. Brew. **79**, 1973, 283.
- Szlvako, C. M.: Variations in the Level of Formation of the Aromatic Higher Alcohols as Influenced by Yeast Strain. J. Am. Soc. Brew. Chem. **34**, 1976, 59.
- Saegussa, K. et al.: Determination of catechol and guaiacol estrogens in urine by capillary gas chromatography/mass spectrometry Biomed. Chrom. **7**, 1993, 172.
- Donnhäuser, S. Et Al.: Zwei Schnellmethoden zur Bestimmung neutraler Phenole im Bier. Monatsschr. Brauwiss. **42**, 1989, 88.
- Lehtonen, M.: Gas-flüssigchromatographische Bestimmung flüchtiger Phenole in gelagerten alkoholischen destillierten Getränken. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66**, 1983, 62–70.
- Venerhaegen, B., Derdelinckx, G.: Charakterization of flavour compounds in fresh and aged beer by purge and trap-gas chromatography-mass spectrometry. Monatsschr. Brauwiss. **58**, 2005, 1–9.
- Fan, W., Xu, Y., Yu, A.: Influence of Oak Chips Geographical Origin, Toast Level, Dosage and Aging Time on Volatile Compounds of Apple Cider. J. Inst. Brew. **112**, 2006, 255–263.
- Dufour, J.-P.: Die Analyse von Bier- und Hopfenaromaverbindungen mit Hilfe von stabilen Isotopen-Verdünnungsprüfmethoden: Stärken und Grenzen. Eur. Brew. Chem. Conv. Monogr. **31**, 2002.
- Rayne, S., Eggers, N. J.: Quantitative determination of 4-ethylphenol and 4-ethyl-2-methoxyphenol in wines by a stable isotope dilution assay. J. Chromatogr. A, **1167**, 2007, 195–201.
- Madigan, D., Mcmurrough, I., Smyth, M. R.: Schneller Nachweis von 4-Vinyl-Guaiacol und Ferulsäure in Bier und Würze mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. J. Am. Soc. Chem. **52**, 1994, 152–155.
- Caboni, P., Sarais, G., Cabras, M., Angioni, A.: Determination of 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol in Wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-Fluorescence. J. Agric. Food Chem. **55**, 2007, 7288–7293.