

Sledování methioninu v českých a zahraničních pivech

Monitoring of Methionine in Czech and Foreign Beers

RENATA MIKULÍKOVÁ¹, ZDENĚK SVOBODA¹, KAROLÍNA BENEŠOVÁ¹, SYLVIE BĚLÁKOVÁ¹, IVANA MÁROVÁ²¹ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Sladařský ústav, Mostecká 7, 614 00 Brno / *Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Malting Institute, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic*² FCH VUT v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno / *FCH BUT, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic*

e-mail: mikulikova@brno.beerresearch.cz

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S. – Márová, I.: Sledování methioninu v českých a zahraničních pivech. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 1, s. 8–12.

Prekursory sirných těkavých látek jsou sirné aminokyseliny a hlavně sirná aminokyselina methionin. Byl sledován obsah methioninu v českých a zahraničních pivech zakoupených v obchodní síti. Byla optimalizována metoda stanovení methioninu v pivu pomocí plynové chromatografie se selektivním plamenofotometrickým detektorem. Při validaci metody se dosáhlo těchto parametrů LOD 0,80 mg.l⁻¹, LOQ 2,5 mg.l⁻¹, R² 0,99974, RSD 13 %.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S. – Márová, I.: Monitoring of Methionine in Czech and Foreign Beers. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 1, p. 8–12.

Volatile sulphur substances are precursors of sulphur amino acids, first of all sulphur amino acid methionine. Content of methionine was studied in Czech and foreign beers obtained from the retail shops. The technique for the determination of methionine in beer was optimized using the gas chromatography method with a selective flame photometric detector. Following validation parameters were achieved: LOD 0.80 mg.l⁻¹, LOQ 2.5 mg.l⁻¹, R² 0.99974, RSD 13 %.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S. – Márová, I.: Die Verfolgung des Methionins in den tschechischen und ausländischen Bieren. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 1, S. 8–12.

Die Prekursoren der sulfat-flüchtigen Stoffe sind Sulfat Aminosäuren und insbesondere die Sulfat Aminosäure Methionin. Es wurde der Gehalt an Methionin in den durch Handelsketten gekauften tschechischen und ausländischen Bieren verfolgt. Es wurde eine Methode zur Feststellung des Methionins im Bier mittels Gaschromatographie mit einem selektiven flammenfotometrischen Detektor optimiert. Durch die Validierung der Methode wurden folgende Parameter LOD 0,80 mg.l⁻¹, LOQ 2,5 mg.l⁻¹, R² 0,99974, RSD 13 % erreicht.

Clíčová slova: Methionin, GC/FPD, derivatizace, pivo**Keywords:** Methionine, GC/FPD, derivatization, beer

1 ÚVOD

Většina sirných sloučenin přítomných v pivu jsou netěkavé látky (aminokyseliny, bílkoviny, anorganické sírany). Tyto látky nejsou přímo odpovědné za nepříznivě vůně a chuti piva, ale jsou důležité jako prekursory, ze kterých za určitých podmínek mohou vznikat senzoricky aktivní látky. Takto vzniklé sloučeniny jsou ve většině případů těkavé a jejich množství bývá nižší než 1 % z celkového množství látek, které mají ve své molekule síru a jsou obsaženy v pivu. Skutečná množství látek odpovědných za sirné vůně jsou proto extrémně nízká.

Methionin je esenciální sirná aminokyselina. Je stavební jednotkou bílkovin a je donorem aktivních methylových skupin. Methionin zahajuje biosyntézu bílkovin, ale v rámci posttranslačních modifikací bývá následně z N-konce peptidového řetězce odštěpen [1,2].

S-methylmethionin vzniká metylací methioninu v cyklu sirných aminokyselin (obr. 1) a patří mezi hlavní meziproducty vzniku senzoricky aktivních látek během výroby piva [2,3]. S-methylmethionin je hlavním prekursorem dimethylsulfidu.

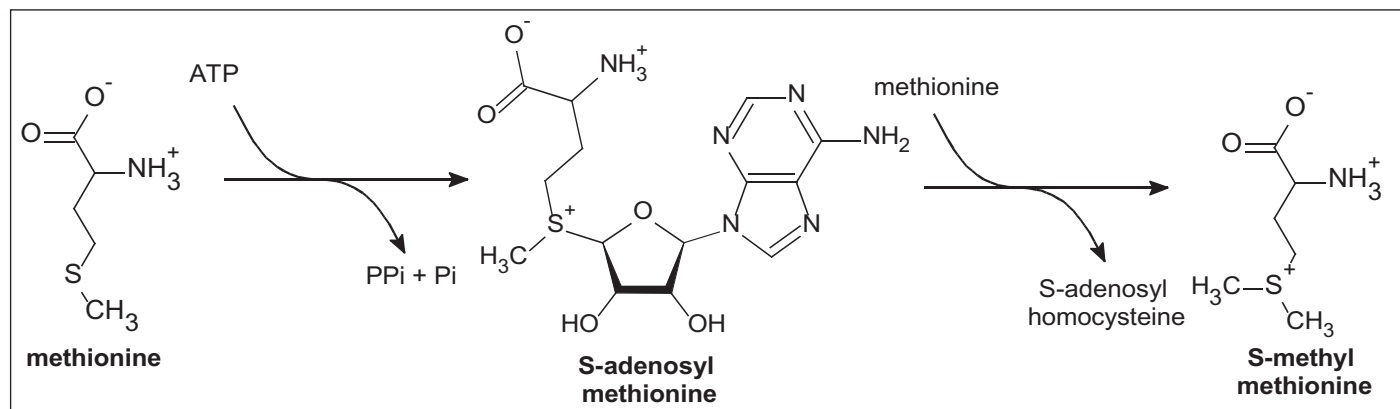
Zcela převládajícím postupem analýzy obsahu sirných aminokyselin v reálných vzorcích jsou chromatografické metody [4,5,6,7], pře-

1 INTRODUCTION

Most of sulphur-containing compounds present in beer are non-volatile substances (amino acids, proteins, inorganic sulphates). These substances do not directly account for unfavourable beer flavors and odors but under certain conditions they may be important precursors of sensorially active substances. These substances are, in majority of cases, volatile and their amount is usually less than 1 % of the total amount of the sulphur-containing substances in beer, i.e. actual amounts of substances responsible for sulphur odors are extremely low.

Methionine is an essential sulphur amino acid. It is a construction unit of proteins and a donor of active methyl groups. It opens biosynthesis of proteins but subsequently, within posttranslation modifications, it is cleaved from the N-terminal side of a peptide chain [1,2].

S-methylmethionine is produced by methylation of methionine in the cycle of sulphur amino acids (Fig. 1), it belongs to the principal intermediates of the origin of sensorially active substances during the beer production [2,3]. S-methylmethionine is a main precursor of dimethyl sulphide.



Obr. 1 Vznik S-methylmethioninu / Fig. 1 Origin of S-methylmethionine

devším plynová chromatografie a kapalinová chromatografie. U plynové chromatografie lze navíc využít selektivní detektory [8,9,10]. Sírné aminokyseliny však nelze plynovou chromatografií stanovit bez derivatizace. Derivatizace se provádí ke zvýšení těkavosti a zlepšení stability separovaných aminokyselin [6,7].

K derivatizaci sirných aminokyselin lze využít několik derivatizačních metod [6,7,8]:

- Esterifikace karboxylu bezvodým alkoholem v HCl a následná acylace dalších protických funkčních skupin.
- Silylace protických funkčních skupin za tepla v bezvodém prostředí pomocí trimethylsilyl nebo terc-butyldimethylsilyl derivátů.
- Derivatizace alkyl chlorformiáty.

K detekci sirných aminokyselin lze použít FID (plameno ionizační detektor) i FPD (plameno fotometrický detektor – selektivní pro sírné látky) detektor. Velmi výhodné je spojení plynového chromatografu s hmotnostním detektorem.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Chemikálie

D, L – methionin (Fluka, USA), pyridin (Merck, Německo), ethanol (ML Chemica, ČR), methanol, 1-propanol, chloroform, ethyl chlorformiát (Sigma Aldrich, USA), destilovaná voda.

Vzorky pív

Ke sledování obsahu volné sírné aminokyseliny methioninu v pivu bylo analyzováno celkem 48 různých druhů českých a zahraničních pív zakoupených v obchodní síti. Pro analýzu bylo vybráno 18 českých světlých ležáků, 8 českých světlých výčepních pív, 6 českých tmavých pív a 3 česká nealkoholická piva. Dále bylo analyzováno 13 zahraničních světlých ležáků. Z toho byly 3 z Dánska, 3 z Francie, 1 z Holandska, 2 z Japonska, 1 z Německa a 3 z USA.

Příprava a zpracování vzorků pív

25 ml piva bylo odpěněno v ultrazvukové lázni po dobu 15 min. Takto připravený vzorek piva byl použit na derivatizaci.

Derivatizace vzorků

K 300 μ l odpěněného piva se přidalo 200 μ l směsi propanol-pyridin (4:1), následně se přidalo 25 μ l ethylchlorformiátu. Směs se míchala 3 minuty při laboratorní teplotě, poté se přidalo 700 μ l chloroformu obsahujícího 1 % ethylchlorformiátu. Směs derivatizovaného vzorku se po protřepání centrifugovala (5 min, 5000 min^{-1}) a pak se 500 μ l organické fáze převedlo do nové zkumavky. Chloroform se odpařil proudem plynného dusíku do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustil v 200 μ l methanolu. Takto připravený vzorek byl analyzován plynovou chromatografií.

Příprava standardů methioninu

Standard methioninu byl navážen na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, rozpuštěn v destilované vodě, kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Rozsah koncentrací standardu methioninu byl 0,8 až 14 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na derivatizaci bylo použito 300 μ l standardního roztoku.

Instrumentace a chromatografické stanovení

Analýzy vzorků byly prováděny na plynovém chromatografu (Trace GC Ultra, Thermo Finigan, USA) s plamenofotometrickým detektorem (FPD) selektivním pro síru. K separaci analyzovaných látek byla použita kapilární kolona RTX-5 (15 m x 0,32 mm i.d., 0,25 μm , stacionární fáze 5 % difenyl – 95 % dimethylpolysiloxan) s následujícím teplotním programem: počáteční teplota 100 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 0,5 min, nárůst teploty 6 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ do 180 $^{\circ}\text{C}$, setrvání 3 min, nárůst teploty 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ do 280 $^{\circ}\text{C}$, setrvání 1 min. Konstantní průtok nosného plynu He 1,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota SSL injektoru 250 $^{\circ}\text{C}$, splitless režim 0,8 min, průtok 60 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota detektoru 150 $^{\circ}\text{C}$, průtok vzduchu 105 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, průtok vodíku 90 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, průtok dusíku (make-up) 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Identifikace analyzovaného methioninu byla provedena na základě porovnání retenčních časů se standardem, kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Vzorky pív byly pro stanovení methioninu zpracovány optimalizovaným pracovním postupem [11], vlastní stanovení methioninu bylo

The assay prevalently used for the analysis of content of sulphur-containing amino acids in real samples are chromatographic methods [4,5,6,7], first of all gas chromatography and liquid chromatography. There are many selective detectors that can be used in gas chromatography [8,9,10]. Sulphur amino acids however cannot be determined with gas chromatography without derivatization. Derivatization is performed to increase volatility and improve stability of the amino acids separated [6,7].

Several methods can be used for the amino acid derivatization [6,7,8]:

- Esterification of carboxyl group with anhydrous alcohol in HCl and subsequent acylation of other protic functional groups.
- Silylation of protic functional groups in anhydrous media at higher temperatures using trimethylsilyl or terc-butyldimethylsilyl derivatives.
- Derivatization with alkyl chloroformates.

For the sulphur amino acid detection, the FID (flame ionization detector) and FPD (flame photometric detector – selective for sulphur substances) detectors can be used. Coupling of the gas chromatograph and mass detector is very advantageous.

2 EXPERIMENTAL

Standards and chemicals

D, L – methionine (Fluka, USA), pyridine (Merck, Germany), ethanol (ML Chemica, CR), methanol, 1-propanol, chloroform, ethyl chloroformate (Sigma Aldrich, USA), distilled water.

Beer samples

To determine the content of free sulphur amino acid, a total set of 48 various brands of Czech and foreign beers purchased in retail shops were analyzed. 18 Czech pale lager beers, 8 Czech pale dispensed beers, 6 Czech dark beers and 3 Czech non-alcoholic beers were selected for the analysis. In addition, 13 foreign pale lagers were analyzed, of which 3 samples were from Denmark, 3 from France, 1 from Holland, 2 from Japan, 1 from Germany and 3 samples from the USA.

Preparation and processing of beer samples

25 ml of beer were defoamed in the ultrasonic bath for 15 min. The prepared sample was then used for derivatization.

Derivatization of samples

200 μ l of propyl alcohol-pyridin mixture (4:1) was added to 300 μ l of aqueous solution of the defoamed beer, after that 25 μ l of ethyl chloroformate was added. The mixture was blended at the laboratory temperature for 3 minutes and then 700 μ l of chloroform containing 1 % ethyl chloroformate was added. The mixture of the derivatized sample was shaken and then centrifuged (5 minutes, 5000 RPM), subsequently organic phase (500 μ l) was transferred to a new tube. Chloroform was dry-evaporated in a stream of nitrogen gas. The residue left after the evaporation was dissolved in 200 μ l of methanol. Subsequently, the sample was analyzed by gas chromatography.

Preparation of methionine standards

Standard of methionine was weighed on the analytical scales with 0.1 mg readability, dissolved in distilled water, quantitatively transferred to 25 ml volumetric flasks and the volume was completed with distilled water to a scale line. Standard methionine concentrations ranged from 0.8 to 14 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. For the derivatization, 300 μ l of standard solution was used.

Instrumentation and chromatographic determination

The samples were analyzed on the gas chromatograph (Trace GC Ultra, Thermo Finigan) with the flame photometric detector (FPD) selective for sulphur. For the separation of the analyzed substances, the capillary column RTX-5 (15 m x 0.32 mm i.d., 0.25 μm , stationary phase 5 % diphenyl – 95 % dimethyl polysiloxan) with following thermal program was used: initial temperature 100 $^{\circ}\text{C}$ for 0.5 min, increase in temperature 6 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ to 180 $^{\circ}\text{C}$, kept for 3 min, increase in temperature 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ to 280 $^{\circ}\text{C}$, kept for 1 min. Constant flow of the carrying gas He was 1.5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Temperature of the SSL injector 250 $^{\circ}\text{C}$, splitless regime for 0.8 min, flow rate 60 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Temperature of the detector 150 $^{\circ}\text{C}$, air flow rate 105 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, hydrogen flow rate 90 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, nitrogen flow rate (make-up) 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

The identification of the analyzed sulphur amino acids was performed based on the comparison of retention times with the standards, quantification was carried using the calibration curves.

provedeno metodou GC/FPD. Jeho obsah byl vypočítán pomocí softwaru ChromCard 2.4.0 z kalibrační křivky (obr. 2). Identifikace vzniklého N(O,S)-ethoxykarbonylpropyl esteru methioninu byla potvrzena porovnáním naměřeného hmotnostního spektra se spektrem uváděným v literatuře. Chromatogram vzorku piva je znázorněn na obr. 3. Hmotnostní spektrum vzniklého derivátu methioninu je na obr. 4.

Metoda pro stanovení methioninu metodou GC/FPD s kapilární kolonou RTX-5 byla validována [12,13]. Pro validaci byl použit odplyněný náhodně vybraný vzorek piva. Validované parametry byly vyhodnoceny s použitím softwarového programu Effi Validation 3.0 a validační parametry jsou uvedeny v tab. 1.

Tab.1 Validační parametry / Tab.1 Validation parameters

| | LOD mg.l ⁻¹ | LOQ mg.l ⁻¹ | R ² | RSD % |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|----------|
| Methionin / Methionine | 0.8 | 2.5 | 0.99974 | 13 |

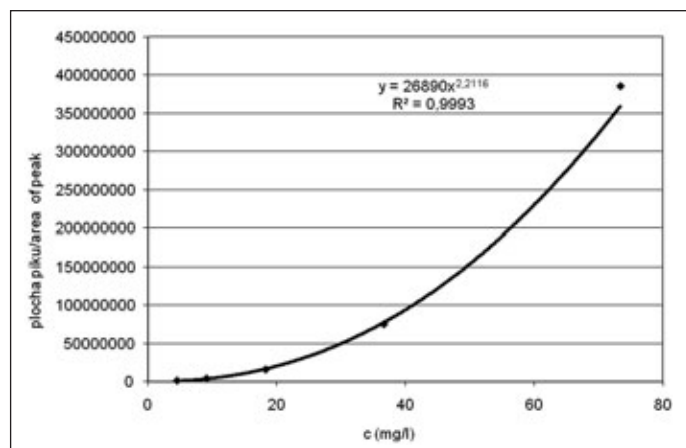
Ke sledování obsahu volných sirných aminokyselin v pivu bylo vybráno 35 českých a 13 zahraničních piv. Jednalo se o 31 světlých ležáků, 8 světlých výčepních piv, 6 tmavých piv a 3 nealkoholická piva. Výsledky stanovení methioninu jsou uvedeny na obr. 5–9.

Obsahy methioninu se v českých světlých ležáckých pivech pohybovaly v rozmezí 3,4–12,9 mg.l⁻¹ (obr. 5). Rozdíly mezi jednotlivými druhy piv nebyly výrazné, kromě světlého ležáku (vzorek č. 17), kde hodnota methioninu byla výrazně vyšší (12,9 mg.l⁻¹).

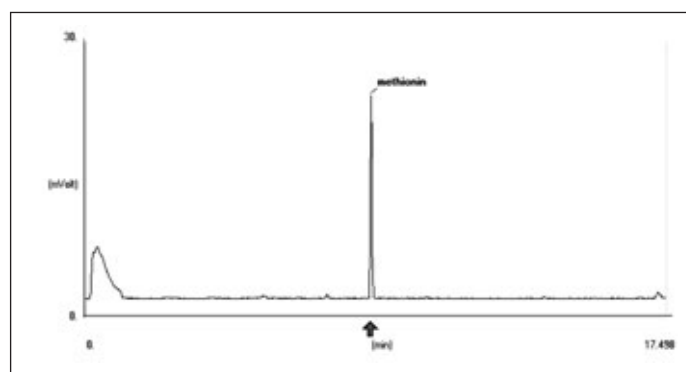
Obsahy methioninu se v českých výčepních pivech pohybovaly v rozmezí 4,0–6,0 mg.l⁻¹ a rozdíly mezi jednotlivými druhy piv nebyly výrazné (obr. 6).

Obsahy methioninu se v tmavých pivech pohybovaly v rozmezí 3,4–6,3 mg.l⁻¹ (obr. 7) a rozdíly mezi jednotlivými druhy piv nebyly výrazné.

Obsahy methioninu v nealkoholických pivech se pohybovaly v rozmezí 3,4–3,7 mg.l⁻¹ (obr. 8). Tyto obsahy byly nejnižší ze všech analyzovaných vzorků piv.



Obr. 2 Kalibrační křivka methioninu / Fig. 2 Methionine calibration curve



Obr. 3 Chromatogram vzorku piva / Fig. 3 Chromatogram of beer sample

3 RESULTS AND DISCUSSION

Beer samples for methionine determination were processed using the optimized method [11], methionine was determined with the GC/FPD method. Methionine content was calculated from a calibration curve (Fig. 2) with ChromCard 2.4.0 software. Identification of the produced N(O,S)-ethoxycarbonylpropyl ester of methionine was confirmed by the comparison of the measured mass spectrum with the spectrum given in the literature. Chromatogram of a beer sample is shown in Figure 3. Figure 4 shows a mass spectrum of the produced methionine derivative.

Determination of methionine using the method of GC/FPD with a capillary column RTX-5 was validated [12,13]. For the validation a degassed beer sample was used. Validated parameters were assessed using the Effi Validation 3.0 software program and validation parameters are given in Tab. 1.

To determine the content of free sulphur amino acid in beer, a total set of 35 various brands of Czech and 13 foreign beers were analyzed, i.e. 31 pale lager beers, 8 pale dispensed beers, 6 dark beers and 3 non-alcoholic beers were selected for the analysis. The results of methionine determination are given in Fig. 5–9.

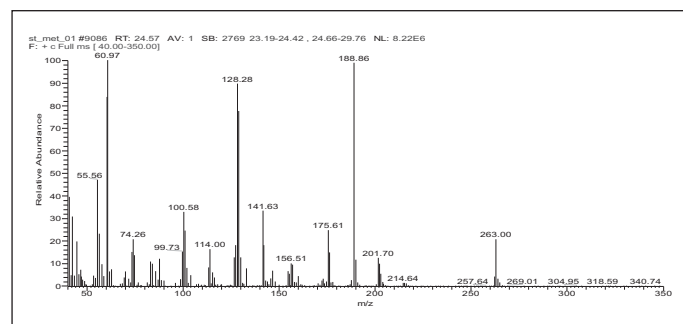
Methionine content in Czech pale lager beers varied from 3.4–12.9 mg.l⁻¹ (Fig. 5). Differences between the individual beer brands were not pronounced, with the exception of pale lager (sample no. 17) with significantly higher value of methionine (12.9 mg.l⁻¹).

Methionine content in Czech dispensed beers varied from 4.0–6.0 mg.l⁻¹. Differences between the individual beer brands were not pronounced (Fig. 6).

Methionine content in Czech dark beers varied from 3.4–6.3 mg.l⁻¹ (Fig. 7). Differences between the individual beer brands were not pronounced.

Methionine content in non-alcoholic beers varied from 3.4–3.7 mg.l⁻¹ (Fig. 8). These content were the lowest of all the beer samples analyzed.

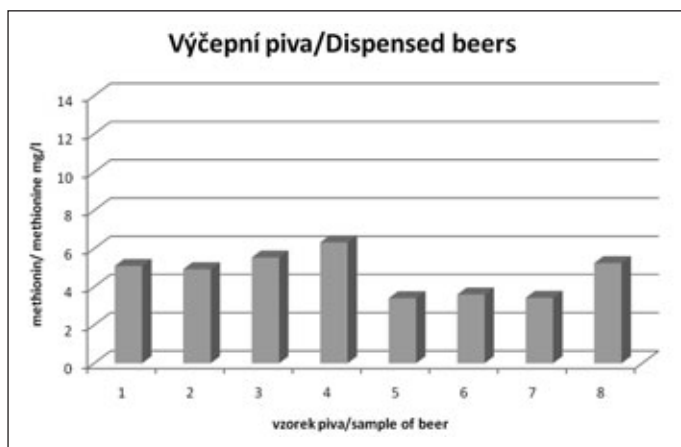
Methionine content in foreign beers in pale lagers varied from 20.8–4.3 mg.l⁻¹ (Fig. 9). The highest methionine level was determined



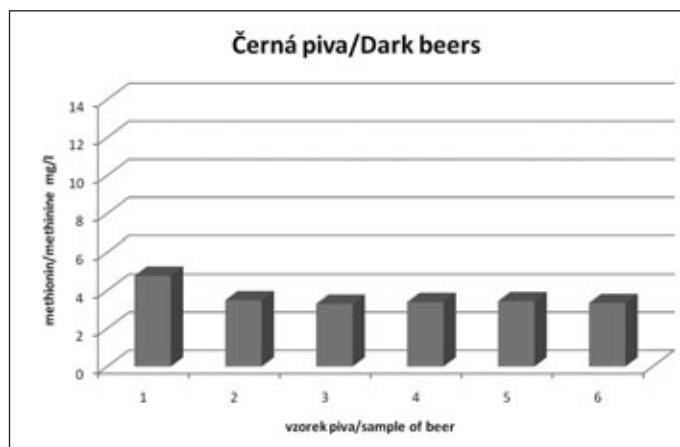
Obr. 4 Hmotnostní spektrum N(O,S)-ethoxykarbonyl propyl esteru methioninu / Fig. 4 Mass spectrum of N(O,S)-ethoxycarbonylpropyl ester of methionine



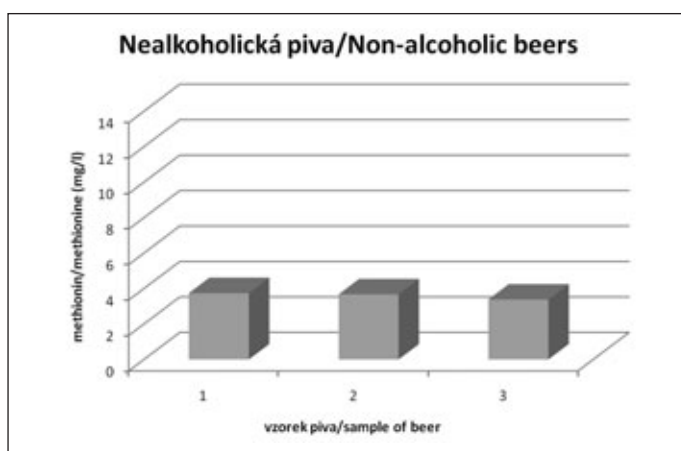
Obr. 5 Obsah methioninu v českých pivech – světlé ležáky / Fig. 5 Methionine contents in Czech beers – pale lager



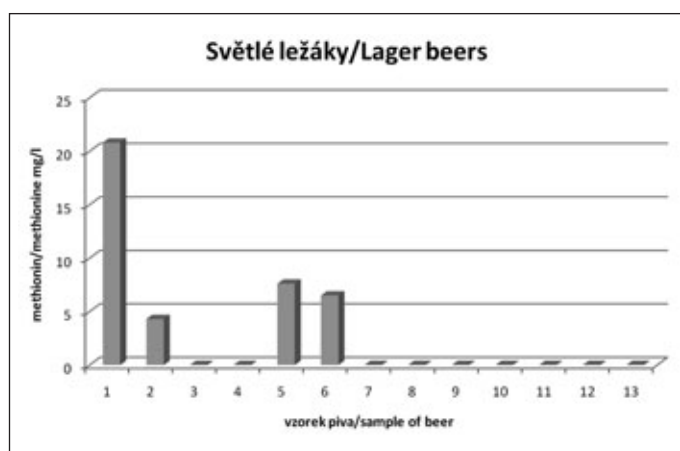
Obr. 6 Obsah methioninu v českých pivech – výčepní piva / Fig. 6 Methionine contents in Czech beers – dispensed beers



Obr. 7 Obsah methioninu v českých pivech – tmavá piva / Fig. 7 Methionine contents in Czech beers – dark beers



Obr. 8 Obsah methioninu v českých pivech – nealkoholická piva / Fig. 8 Methionine contents in Czech beers – non-alcoholic beers



Obr. 9 Obsah methioninu v zahraničních pivech – světlé ležáky / Fig. 9 Methionine contents in foreign beers – lager beers

Obsahy methioninu se v zahraničních pivech u světlých ležáků pohybovaly v rozmezí od 4,3–20,8 mg.l⁻¹ (obr. 9). Nejvyšší obsah methioninu byl v dánském světlém ležáku (20,8 mg.l⁻¹), u tří zahraničních piv se hodnoty pohybovaly v rozmezí 4,3–7, 6 mg.l⁻¹. Obsah methioninu u zbývajících zahraničních piv (9 vzorků) byl pod mezí stanovení.

in Danish pale lager beer (20.8 mg.l⁻¹), levels in three foreign beers varied from 4.3–7. 6 mg.l⁻¹. Methionine content in remaining foreign beers (9 samples) was under the limit of quantification.

4 ZÁVĚR

Sírné aminokyseliny jsou přirozenou součástí ječmene, sladu i piva. Kromě fyziologické role jsou však tyto látky prekursory při vzniku těkavých sirných látek, které mohou negativně ovlivnit senzorickou kvalitu piva.

Byla sledována sírná aminokyselina methionin jako hlavní prekursor při vzniku těkavých sirných látek v českých a zahraničních pivech. Obsah methioninu v českých pivech se pohyboval v rozmezí 3,4–12,9 mg.l⁻¹. Nejvyšší obsahy byly u tmavých a u nealkoholických piv. Největší rozdíly v obsahu methioninu byly u ležáků, kde nejvyšší obsah methioninu byl prokázán u vzorku piva č. 17. Ve všech českých pivech byl obsah methioninu nad mezí stanovení. V zahraničních pivech byl obsah methioninu z celkem analyzovaných 12 vzorků zjištěn pouze u 4 vzorků. Jednalo se o piva z Dánska (2), Francie a USA. Ve všech ostatních vzorcích zahraničních piv byl obsah methioninu pod mezí stanovení.

Objektivní posouzení příčin těchto rozdílů by vyžadovalo konkrétní znalost technologie výroby jednotlivých analyzovaných zahraničních piv.

Poděkování

Výsledků bylo dosaženo v rámci projektu MSMT 2B08057 a Výzkumného záměru MSM 6019369701.

4 CONCLUSION

Sulphur amino acids are natural component of barley, malt and beer. Besides a physiological role, these substances are also precursors of volatile sulphur substances that can negatively affect beer sensory quality.

Sulphur amino acid methionine as a main precursor of volatile sulphur substances in Czech and foreign beers was studied. Methionine content in Czech beers varied from 3.4–12.9 mg.l⁻¹. The most balanced contents were in dark and non-alcoholic beers. The highest differences in methionine content were in lagers where the highest methionine level was determined in the beer sample no. 17. Methionine content in all Czech beers was above the limit of quantification. Methionine content in foreign beers was detected only in 4 samples of the total set of 12 samples. These were beers from Denmark (2), France and the USA. Methionine content in all the other samples of foreign beer samples was under the limit of quantification.

Objective assessment of causes of these differences would require actual knowledge of production technology of the individual analyzed foreign beers.

Acknowledgements

The results were obtained within the project of the MEYS 2B08057 and Research Plan MSM 6019369701.

Translated by Mgr. Vladimíra Nováková

LITERATURA / REFERENCES

1. Vodrážka, Z.: Biochemie. 1. vyd. Praha: Academia, 2002, 508 s. ISBN 80-200-0600-1.
2. Voet, D., Voetová, J.: Biochemie. 1. vyd., Praha: Victoria Publishing, a. s., 1995, 1325 s., ISBN 80-85605-44-9.
3. Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T.: Pivovarství teorie a praxe výroby piva. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
4. Vacek, J., Onofrejová, L., Klejdus B., Kubáň V.: Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. Chem. Listy **103**, 2009, 381–385.
5. Langrock, T., Czihal, P., Hoffmann, R.: Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry. Amino Acids, **30**, 2006, 291–297.
6. Hušek, P.: Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, J. Chromatogr. B, **717**, 1998, 57–91.
7. Hušek, P., Matucha, P., Vránová, A., Šimek, P.: Simple plasma work-up for fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic amino acids, J. Chromatogr. B, **789**, 2003, 311–322.
8. Myung S., Kim M., Min H., Yoo E., Kim K.: Determination of homocysteine and its related compounds by SPME/ GC/ MSD, J. Chromatogr. B, **727**, 1999, 1–8.
9. Mayadunne, R., Nguyen, T.-T., Marriott, P., J.: Amino acid analysis by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. Analytical and Bioanalytical Chemistry **382**, 2005, 836–847.
10. Erbe, T., Brückner, H.: Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture. J. Chromatogr. A, **881**, 2000, 81–91.
11. Mikulíková, R., Svoboda, Z., Benešová, K., Běláková, S.: Stanovení methioninu ve sladu. Kvasny Prum. **55**, 2009, 310–314.
12. Barek, J. a kol.: Metrologická terminologie v chemii, Chem. Listy **94**, 2000, 439–444.
13. Spektroskopická společnost Jana Marka Marci: Nejistota a nezávažnost výsledků spektroskopických metod, 2001, ISBN 80-7080-447-5.

76. zasedání MEBAK v Rheinfeldenu

Ve dnech 14. až 16. října 2010 proběhlo v Rheinfeldenu (Švýcarsko) na pozvání Feldschlösschen Getränke AG, Rheinfelden zasedání komise MEBAK.

Jednání se zúčastnilo 23 delegátů, z toho 1 host.

V zasedacím sále pivovaru Feldschlösschen přivítal přítomné předseda MEBAK Dr. Anger a jménem hostitelů Dr. Zürcher.

Bez dalších připomínek byl schválen protokol ze 75. zasedání MEBAK konaného ve dnech 14. až 16. dubna 2010 v Linci.

Dr. Gresser přednesl zprávu o hospodaření. Sekretářka MEBAK paní Deutschmann seznámila přítomné se stavem prodeje svazků MEBAK v uplynulém období.

Současně podal Dr. Gresser zprávu o stavu internetových stránek MEBAK.

Ediční činnost MEBAK nadále probíhá uspokojivě. Byl dokončen svazek Mladina, pivo (koordinátor Michael Anger – VLB Berlín, dříve svazek II.) a Michané nápoje (koordinátor Dr. Elisabeth Jülich – Döhler Darmstadt). S ohledem na velký rozsah cca 600 stran se uvažuje o možnosti, že by knižní forma obsahovala pouze výběr základních, nejčastěji používaných metod a zbývající metody by byly přístupné po registraci na internetových stránkách MEBAK. Zákazník by obdržel přístupový klíč při koupi svazku a dle potřeby by si mohl stáhnout zbývající potřebné metody elektronicky.

Zájemce zajisté potěší zpráva, že již byl uveden na trh svazek MEBAK Getränkeschankanlagen věnovaný problematice výčepních zařízení.

V současné době byl dokončen anglický překlad svazku Rohstoffe (Suroviny). Další svazky MEBAK budou překládány do angličtiny v závislosti na finanční situaci MEBAK, neboť ediční činnost MEBAK je výhradně financována z výtežku prodeje svazků MEBAK a příjmů z reklam v nich uveřejněných.

Dále byly přítomnými diskutovány otázky spojené s úpravou stanov MEBAK. Předsednictvo připraví pro následující zasedání jejich finální znění k odsouhlasení.

Byla již dokončena směrnice pro analytickou kontrolu a vyhodnocení účinnosti filtračních zařízení (koordinátor Dr. Stefan Kreis – Bagsvaerd, Dánsko). Při její koupi obdrží zákazník přístupový klíč, na jehož základě si bude moci stáhnout příslušné formuláře z internetových stránek MEBAK.

Před dokončením je i směrnice týkající se In-line měřících technik (koordinátor Dipl.-Ing. Roland Folz).

Prof. Rath referoval o posledních poznatcích týkajících se testování modifikovaného Carlsberg testu určeného pro stanovení gushing potenciálu sladu. Na základě získaných výsledků byla experimentálně stanovena hodnota 4,08 ml. Bylo doporučeno, aby byl modifikovaný Carlsberg test dále označován názvem Modifikovaný Carlsberg test 2.0 a aby byly hodnoty menší než 5,0 ml považovány za jeho mez stanovení.

Ve své zprávě o činnosti komise AHA (Pracovní skupina pro analýzu chmele) seznámil R. Schmidt přítomné s posledními výsledky týkajícími se sledování stability standardu ICE 2 a jeho nově testovaných nástupců, kandidátů na ICE 3. V porovnání se standardem ICE 2 zatím vykazuje standard ICE3 stabilní obsah alfa kyselin, naproti tomu obsah beta kyselin je u standardu ICE3 přibližně o 5 % nižší. Od 1. 9. 2010 vstoupil v platnost nový standard ICE 3, nicméně do vyčerpání zásob v laboratořích lze dále používat i standard ICE 2. Na protokolech je však třeba uvádět, na základě jakého použitého standardu byly prezentované výsledky získány.

Dr. Coelhan se ve své prezentaci věnoval poznatkům, získaným při dlouholetém vývoji a testování vhodné metody pro stanovení dimethylsulfidu (DMS) a jeho prekurzorů (PDMS) ve sladu. Hodnoty velmi ovlivňuje doba filtrace a teplota. Výsledky získané postupem tzv. studeného výluhu vykazují v průměru o 10 % nižší výsledky. Obdobně bylo doporučeno při kalibraci na PDMS používat alkalické prostředí, neboť vodné roztoky při kalibraci opět vykazují o přibližně 10 % nižší hodnoty.

Dr. Klein seznámil přítomné s výsledky kruhového testu pro stanovení vápníku, hliníku a železa v křemelině (hrubé a jemné) dle MEBAK. Testován byl postup založený na výluhu pivem (společným pro všechny laboratoře) a ftalátovým výluhem. Výsledky získané ftalátovým výluhem byly (s výjimkou hliníku) lepší v porovnání s výsledky získanými výluhem pomocí piva. Nicméně celkově nelze považovat získané výsledky za uspokojivé. Ftalátový výluh poskytoval nižší výsledky, avšak v porovnání s pivem vykazoval nižší rozptyl výsledků. Ostatní účastníci testu upozornili na potřebu detailně specifikovat podmínky ex-

trakce (typ třepačky, způsob třepání, přesnou teplotu a čas atd.). Na optimalizaci metod se nadále pracuje. Obecně lze říci, že postup založený na ftalátovém výluhu lze s výhodou použít při kontrole kvality dodávané křemeliny, nicméně pro vlastní potřebu pivovaru lépe vyhovuje výluh provedený vlastním pivem.

Otázce problémů spojených se stanovením redukováných iso-alfa kyselin v pivu společně s iso-alfa kyselinami během jedné společné analýzy byla věnována přednáška Dr. Coelhana. Byly zjištěny problémy s koelucí a identifikací piků jednotlivých izomerů iso-alfa kyselin a jejich redukováných forem. Z tohoto důvodu nebude zatím navržena metoda zahrnutá do zveřejněných metod MEBAK.

O praktických poznatcích získaných s nasazením automatického analyzátoru Arena 30 od firmy Thermo Fischer v provozních podmínkách referoval Dr. Zürcher. Jedná se o automatický analyzátor vybavený dávkovačem, pracující na základě spektrometrických a enzymatických metod. K jeho výhodám patří jeho značná flexibilita, kdy byla u nové verze odstraněna softwarová i hardwarová omezení týkající se rychlé změny metod u menšího počtu vzorků. V současné době je přístroj v pivovaru Feldschlösschen schopen provádět v provozním nasazení dvanáct druhů pivovarských analýz a dalších trináct se chystá. Výhodou je i malé množství vzorků pro analýzu, nízká spotřeba reagentů a poměrně příznivá cena spotřebního materiálu. Na druhou stranu má však přístroj dosud i mnohé slabiny. Trvanlivost některých reagentů je časově omezená a přístroj se zatím nehodí pro analýzu tmavých piv. Lze tedy konstatovat, že je analyzátor Arena 30 zatím vhodný zejména pro velké pivovary. V současné době probíhá jeho testování i v laboratořích Veritas a Forschungsanstalt Geisenheim.

Jako host vystoupil se svou přednáškou pan Richter z pokusného střediska sladovny firmy Weyermann/Bamberg. Přednáška se týkala vývoje pokusné mikroskladovny a na ni navazujícího minipivovaru a destilační aparatury.

77. zasedání komise MEBAK je plánováno na dny 14. až 16. dubna 2011 v německém Kulmbachu.

Ing. Jiří Čulík, CSc.
člen MEBAK