

# 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 II. – OBSAH AROMATICKÝCH ALKOHOLŮ V ČESKÝCH PIVECH

## DETERMINATION OF AROMATIC ALCOHOLS IN BEER USING THE SOLID PHASE EXTRACTION (SPE) FOLLOWED BY GAS CHROMATOGRAPHY- MASS SPECTROMETRY (GC- MS). PART II. – THE CONTENT OF AROMATIC ALCOHOLS IN CZECH BEERS

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 44 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 II. – Obsah aromatických alkoholů v českých pivech. *Kvasny Prum.* 55, 2009, č.10, s. 273–277.

V této části jsou shrnuty poznatky týkající se zjištěných reálných hodnot obsahu aromatických alkoholů v českých pivech. Byl studován obsah aromatických alkoholů v běžných výčepních pivech, ležácích a nealkoholických pivech. V případě nealkoholických piv byly získány první údaje o vlivu použité technologie na změny obsahu těchto sensoricky aktivních látek.

Čulík, J. – Horák, T. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J.: Determination of aromatic alcohols in beer using the solid phase extraction (SPE) followed by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). Part II. – The content of aromatic alcohols in czech beers. *Kvasny Prum.* 55, 2009, No.10, p. 273–277.

In this part, new findings concerning the real data of the content of aromatic alcohols in Czech beers are summarized. The content of aromatic alcohols in draught, lager and non alcoholic beers was studied. In the case of non alcoholic beers, the first information concerning the influence of technological process on the changes of the content of these sensory active compounds was acquired.

Čulík, J. – Horák, T. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J.: Bestimmung von aromatischen Alkoholen im Bier durch die Ausnützung der Methode einer Extraktion auf der festen Phase (SPE) und mittels einer Verbindung der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS). Teil II. – Der Gehalt an aromatischen Alkohole im tschechischen Bier. *Kvasny Prum.* 55, 2009, Nr. 10, S. 273–277.

In diesem Artikel werden alle Kenntnisse bezüglich der festgestellten Realwerte der Gehalte von aromatischen Alkoholen im Bier zusammengefasst. Der Gehalt von aromatischen Alkoholen wurde im laufenden Ausschank-, Lager- und Alkoholfreiesbier festgestellt. Im Falle des Alkoholfreiesbieres wurden die ersten Resultate über den Einfluss der angewandten Technologie an den sensorisch aktiven Substanzenänderungen gewonnen.

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

**Keywords:** *aromatic alcohols, solid phase extraction (SPE), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*

### 1 ÚVOD

Jak již bylo zmíněno v prvním díle tohoto článku, věnovaném problematice vzniku a analýzy aromatických alkoholů [1], přítomnost těchto látek ovlivňuje v pozitivním i negativním smyslu výsledný sensorický charakter piva. Údaje o obsazích těchto látek v pivech se však značně liší, stejně jako údaje o jejich prahových hodnotách vnímání. Je to způsobeno nejen různými použitými metodami jejich extrakce a stanovení, ale i tím, že výsledný sensorický výjem závisí na množství a složení doprovodných sensoricky aktivních látek, tj. zejména esterů, alkoholů, hořkých kyselin apod. V této části práce jsme zmapovali běžně dosahované hodnoty obsahu aromatických alkoholů v českých pivech. Dále jsme se pokusili získat první informace o vlivu použité technologie výroby nealkoholického piva na obsah a zastoupení v něm obsažených zástupců jednotlivých aromatických alkoholů. Běžně používané metody stanovení, zmíněné v prvním díle tohoto pojednání, nejsou většinou schopny, s ohledem na jejich dosažitelnou mez stanovení a dynamický rozsah, obsáhnout celé spektrum aromatických alkoholů. Je to způsobeno značnými rozdíly v jejich koncentraci, dosahujícími v některých případech až několika řádů. Nově vyvinutá metoda stanovení vyšších aromatických alkoholů pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) a detekce na přístrojovém spojení kapilárního plynového chromatografu a kvadrupólového hmotnostního spektrometru (GC-MS) však tento nedostatek odstranila. Umožnila sledovat široké spektrum aromatických alkoholů přítomných v pivu bez nebezpečí ovlivnění výsledků necitlivými extrakčními podmínkami, např. zvýšenou tepelnou zátěží matrice při destilaci.

### 1 INTRODUCTION

As mentioned in the first part of this article dedicated the problematic nature of the origin of aromatic alcohols and their analysis [1], the presence of these substances has an influence on the resulting characteristics of beer in both a negative and a positive sense.

Both the published data about the content of these substances and the data on their perception threshold value differ considerably.

The reason is not only the use of different extraction and analytical methods, but also, the sensory perception depends on the quantity and the composition of the sensory active substances present, namely esters, alcohols, bitter acids etc. In this part the usual values for the content of aromatic alcohols in Czech beers are given. Furthermore, first investigations about the influence of the production technology used for non-alcoholic beers on the content of the specific aromatic alcohols were made. By using the common methods for the determination mentioned in the first part of this study, it is mostly not possible to identify the whole spectrum of the aromatic alcohols because of their limited sensitivity and dynamic scope. This is caused by large differences in the concentration, which can reach a factor of several hundreds. The newly developed method for the determination of higher molecular weight aromatic alcohols using solid phase extraction followed by gas chromatography/ quadruple mass spectrometry overcomes these problems. It enables the determination of a wider scale of aromatic alcohols in beer without the danger of influencing the results due to crude extraction conditions, for example from the enhanced temperature of the matrix during distillation.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

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

K extrakci aromatických alkoholů z piva byla použita metoda Čulík et al. [2], pracující na principu SPE. Vlastní stanovení analytů bylo provedeno novým postupem pomocí přístrojového spojení GC-MS. Pro orientaci zde uvádíme pouze základní údaje, detailní údaje jsou uvedeny v prvním díle tohoto pojednání [1].

#### Použité přístroje, zařízení a chemikálie

##### Přístroje, zařízení a chemikálie:

- plynový chromatograf – hmotnostní spektrometr: Trace GC Ultra – DSQ II
- data systém: Excalibur (GC-MS)
- kapilární kolona RTX-5Sil MS Integra Guard (30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka fáze 0,25  $\mu$ m)
- 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)
- použité standardy: guajakol, tryptofol, 4-ethylguajakol, 4-vinylguajakol, eugenol (Sigma – Aldrich), tyrosol, 4-ethylfenol (Fluka), 2-fenylethanol (Merck).

#### Extrakční postup:

Přibližně 50 ml vzorku piva odplyneme v ultrazvukové lázni a pH vzorku upravíme přidáním 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-ethylfenol) 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 upraveného 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 bombě. 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 víčkem. 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, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka fáze 0,25  $\mu$ m (Restek)  
 Injektor: 250 °C, splitless 1 min (split flow 50 ml/min)  
 Objem nástřiku: 1  $\mu$ l  
 Teplota transfer line GC-MS: 250 °C  
 Teplota zdroje MS: 200 °C  
 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 (selected ion monitoring). Základní údaje o vybraných iontech využitých pro kvantifikaci stanovených sloučenin jsou uvedeny v tab. 2 v prvním díle tohoto pojednání [1].

### 2.2 Stanovení obsahu aromatických alkoholů v českých pivech

Obsah aromatických alkoholů byl stanoven v pivech z devíti pivovarů (označených P1 až P9) vyrábějících jak výčepní piva a ležáky, tak i piva nealkoholická. Uváděné výsledky odpovídají průměrným hodnotám dosaženým ve vzorcích na podzim roku 2007 a jaře roku 2008. Jednalo se o pivovary středně velké a velké, používající při výrobě výčepních piv a ležáků klasickou technologii výroby českého piva. V případě nealkoholických piv se však použitý technologický postup mezi jednotlivými pivovary od sebe značně lišil. Tato piva byla vyrobená buď přerušeným kvašením, s použitím speciálního druhu kvasinek, nebo vakuovou destilací alkoholického piva. V tab. 1 jsou

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Extraction of aromatic alcohols with SPE followed by GC-MS determination

For the extraction of aromatic alcohols the SPE method from Čulík et al. [2] was used. The determination was accomplished with a new GC-MS process. Since the detailed description of the method was published in the first part, only basic information is given in this study [1].

#### Instrumentation, operating conditions and chemicals

- gas chromatograph-mass spectrometer: Trace GC Ultra – DSQ II
- data system: Excalibur (GC-MS)
- capillary column RTX-5Sil MS Integra Guard 30 m x 0,25 mm i.d. and 0,25  $\mu$ m film thickness (Restek)
- operating conditions:
- helium carrier gas (for GC-MS), purity 5,0 Messer, nitrogen, purity 4.8,
- injector temperature 250 °C, splitless 1 min (split flow 50 ml/min), injection volume 1  $\mu$ l
- temperature of the transfer line GC-MS: 250 °C
- temperature of MS: 200 °C
- oven temperature program for column RTX5-Sil MS: initial temperature 70 °C (hold for 1 min), increasing up to 155 °C at a rate of 17 °C/min and then at a rate of 25 °C/min to 260 °C (hold for 2 min)
- water deionised with Millipore Milli-RO 5plus
- extraction columns (for SPE) LiChrolut EN 200 mg (Merck)
- used standards: guaiacol, tryptophol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylguaiacol, eugenol (Sigma- Aldrich), tyrosol, 4-ethylphenol (Fluka), 2-phenylethanol (Merck)

#### Extraction procedure

Approximately 50 ml of the beer sample were degassed in an ultrasonic bath. The pH was adjusted up to 8.5 with a NaOH solution (10 mol/l). 10 ml of the sample and 0.1 ml of 4-ethylphenol as internal standard (concentration approx. 30mg/l) were transferred to a test tube.

SPE column LiChrolut EN 200 mg was conditioned in the device for SPE as follows: The column was washed first with 2 ml ethanol followed by 2 ml water (with pH adjusted to 8.5). Immediately after conditioning 10 ml of the prepared sample was transferred to the column. The column mustn't dry out! The transit through the column was speeded up with a membrane vacuum pump. After the transit of the sample the column was washed with 2 ml water (pH at 8.5). The eluate obtained was rejected. The column was removed from the SPE device, inserted on the valve mouth of the nitrogen cylinder and dried under a gentle nitrogen stream for approx. 3 min. The column is completely dry if the contents of the column light up visibly.

Afterwards, the dry column was returned to the SPE device and eluted with 2 ml ethyl acetate. As before, for the elution the membrane vacuum pump was employed. The eluate was collected in a calibrated conical tube. A part of it was directly transferred to a screw-capped vial with an insert. The vials containing the samples were stored at a temperature of –18 °C.

The quantitative determination of aromatic alcohols was performed in SIM (selected ion monitoring) mode. The basic data about the selected ions used for the quantification of the set compounds are given in Tab. 2 in the first part of this study [1].

### 2.2 Quantitative determination of aromatic alcohols in Czech beers

The content of aromatic alcohols was determined in beers from 9 breweries (designated as P1 to P9) producing draft beers and lager beers as well as non-alcoholic beers.

The results correspond to the average values obtained from samples from autumn 2007 and spring 2008. Medium sized and large breweries using the classical Czech brewing technology for the production of draft and lager beers were involved. However, in the case of non-alcoholic beers the production technology in different breweries varied considerably. These beers were produced either by interrupted fermentation, or by using a specific yeast strain, or by vacuum distillation of alcoholic beer. Tab. 1. gives a summary of determined values.

Furthermore, during two years the content of aromatic alcohols in commercial beers from others breweries (20 samples) was monitored at random. The comparison of the published values and determined values of selected aromatic alcohols in Czech pale draft beers and lager beers from the both series, their threshold values and sensory evaluation are given at Tab. 2.

Tab. 1 Obsahy aromatických alkoholů ve vzorcích českých komerčních piv u vybraných pivovarů / Concentration of aromatic alcohols in samples of commercial beers from selected breweries

Vzorek / Sample	Látka / Compound						
	Guajakol / Guaiacol	2-fenylethanol / 2-phenylethanol	4-ethylguajakol / 4-ethylguaiacol	4-vinylguajakol / 4-vinylguaiacol	Eugenol / Eugenol	Tyrosol / Tyrosol	Tryptofol / Tryptophol
	množství (mg/l) / content (mg/l)						
P1 nealko / non-alcoholic beer	0.003	3.0	0.003	0.38	<0.01	1.29	0.12
P1 výčepní / draft beer	0.003	12.7	0.005	1.71	<0.01	8.37	0.31
P1 ležák / lager beer	0.004	13.0	0.003	2.76	<0.01	10.86	0.27
P2 nealko / non-alcoholic beer	0.002	0.4	0.001	0.33	<0.01	0.27	0.04
P2 výčepní / draft beer	0.004	8.7	0.002	1.97	<0.01	7.29	0.11
P2 ležák / lager beer	0.003	13.9	0.003	1.79	<0.01	7.54	0.21
P3 nealko / non-alcoholic beer	0.001	0.9	0.001	0.29	<0.01	0.55	0.04
P3 ležák / lager beer	0.003	12.0	0.001	1.33	<0.01	7.50	0.23
P4 nealko / non-alcoholic beer	0.001	2.6	0.001	0.27	<0.01	0.67	0.12
P4 výčepní / draft beer	0.002	10.4	0.002	0.69	<0.01	7.59	0.22
P4 ležák / lager beer	0.003	14.1	0.002	0.81	<0.01	7.44	0.25
P5 nealko / non-alcoholic beer	0.004	1.1	0.003	0.64	0.010	1.17	0.12
P5 výčepní / draft beer	0.003	12.5	0.002	1.34	<0.01	7.45	0.19
P5 ležák / lager beer	0.003	16.3	0.003	1.51	<0.01	9.05	0.21
P6 nealko / non-alcoholic beer	0.001	0.5	0.001	0.43	<0.01	0.35	0.04
P6 výčepní / draft beer	0.002	13.6	0.001	1.97	<0.01	5.45	0.30
P6 ležák / lager beer	0.003	16.4	0.002	2.78	<0.01	5.96	0.39
P7 nealko / non-alcoholic beer	0.001	1.4	0.001	0.39	<0.01	0.79	0.05
P7 výčepní / draft beer	0.002	18.0	0.003	1.64	<0.01	12.38	0.23
P7 ležák / lager beer	0.002	20.0	0.003	1.86	<0.01	12.61	0.24
P8 nealko / non-alcoholic beer	0.001	0.4	0.001	0.35	<0.01	0.24	0.04
P8 výčepní / draft beer	0.003	7.8	0.003	1.48	<0.01	7.58	0.09
P8 ležák / lager beer	0.003	19.6	0.003	1.93	<0.01	10.56	0.11
P9 nealko / non-alcoholic beer	0.011	12.6	0.010	2.19	0.03	6.71	0.26
P9 výčepní / draft beer	0.011	13.5	0.011	2.87	0.03	6.39	0.24
P9 ležák / lager beer	0.011	13.8	0.013	3.51	0.03	7.42	0.32

zelené řádky – přerušené kvašení / green row – interrupted fermentation

modrý řádek – speciální kmen kvasinek / blue row – specific yeast strain

žlutý řádek – vakuová destilace / yellow row – vacuum distillation

uvedeny souhrnné stanovené hodnoty. Dále byl v intervalu dvou let namátkově sledován obsah aromatických alkoholů v komerčních pivěch z ostatních tuzemských pivovarů (20 vzorků). Celkové porovnání tabelovaných a stanovených hodnot obsahu vybraných aromatických alkoholů v českých světlých pivěch, jejich prahové hodnoty a smyslové charakteristiky jsou uvedeny v tab. 2.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Získané výsledky u piv z devíti vybraných pivovarů jsou souhrnně uvedeny v tab. 1. Barevně jsou zde od sebe odlišena nealkoholická piva vyrobená přerušným kvašením (zeleně), speciálně použitým kmenem kvasinek (modře) a vakuovou destilací (žlutě).

Je zřejmé, že zatímco v obsazích guajakolu, 4-ethylguajakolu a eugenolu nebyly pozorovány významné rozdíly mezi pivy výčepními, ležáky i nealkoholickými pivy, u ostatních aromatických alkoholů tomu bylo právě naopak. U tyrosolu, tryptofolu, 4-vinylguajakolu a 2-fenylethanolu byl pozorován zpravidla nárůst v obsahu těchto látek u ležáků v porovnání s pivy výčepními. V případě 2-fenylethanolu byl navíc zaznamenán i významný rozdíl mezi pivy různých výrobců.

Z výše uvedených výsledků i z výsledků namátkových odběrů je patrné, že obsahy sledovaných aromatických alkoholů ve výčepních pivěch a ležácích kolísaly v širším rozsahu a že jejich hodnoty v některých případech překročily dosud zveřejněné hodnoty zahraničními autory (tab. 2).

I když nebylo primárním záměrem této práce detailně zkoumat vliv technologie výroby piva na obsah aromatických alkoholů, neboť se jednalo o úvodní studii, je ze získaných výsledků zřejmé, že zvolené parametry výroby (kvasničný kmen, způsob kvašení, dealkoholizace apod.) značně ovlivňují obsah těchto senzoričky významných látek ve finálním výrobku [3]. Markantně se to projevilo zejména u piv nealkoholických, jak je zřejmé z obr. 1. Významný je zde zejména po-

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The summary of the results obtained from the beers of the 9 selected breweries is shown in Tab. 1. Non-alcoholic beers produced by interrupted fermentation are marked in green, beers produced by using a special yeast strain are marked in blue and beers produced by vacuum distillation of alcoholic beer are marked in yellow.

It is clear that the contents of guaiacol, 4-ethylguaiacol and eugenol in draft beers, lager beers and non-alcoholic beers were similar, but the contents of other aromatic alcohols differ. The contents of tyrosol, tryptophol, 4-vinylguaiacol and 2-phenyl-ethanol were, as a rule higher in lager beers when compared to draft beers.

The content of 2-phenylethanol varied significantly even amongst the same type of beers from different producers.

Both the shown results and the results from commercial beers from other breweries indicate that the contents of selected aromatic alcohols in draft and lager beers varied quite widely. The values found were in some cases higher than those published by others authors Tab. 2.

Even though the main aim of this study wasn't to investigate the effect of brewing technology on the content of aromatic alcohols, due to the preliminary character of this study, it was obvious, that the chosen production parameters such as yeast strain, kind of fermentation and dealcoholisation have a big impact on the content of these sensory important compounds in the final product [3].

Especially for non-alcoholic beers the biggest impact could be seen Fig. 1. The values of 2-phenylethanol in non-alcoholic beers (with exception of non-alcoholic beers produced by vacuum distillation) are substantially lower when compared with the values from draft and lager beers.

Apart from 2-phenylethanol whose content in beers was several fold higher than the content of other aromatic alcohols, higher values of tyrosol and 4-vinylguaiacol were also found. The values of 4-vinylguaiacol were even several times higher than the values for pale bottom fermented beers found in studies by other authors [4-8].

Obr.1 Obsah vyšších aromatických alkoholů v nealko pivech v závislosti na použité technologii / Fig.1 Concentration of higher molecular weight aromatic alcohols in non-alcoholic beers in relationship to the technology used

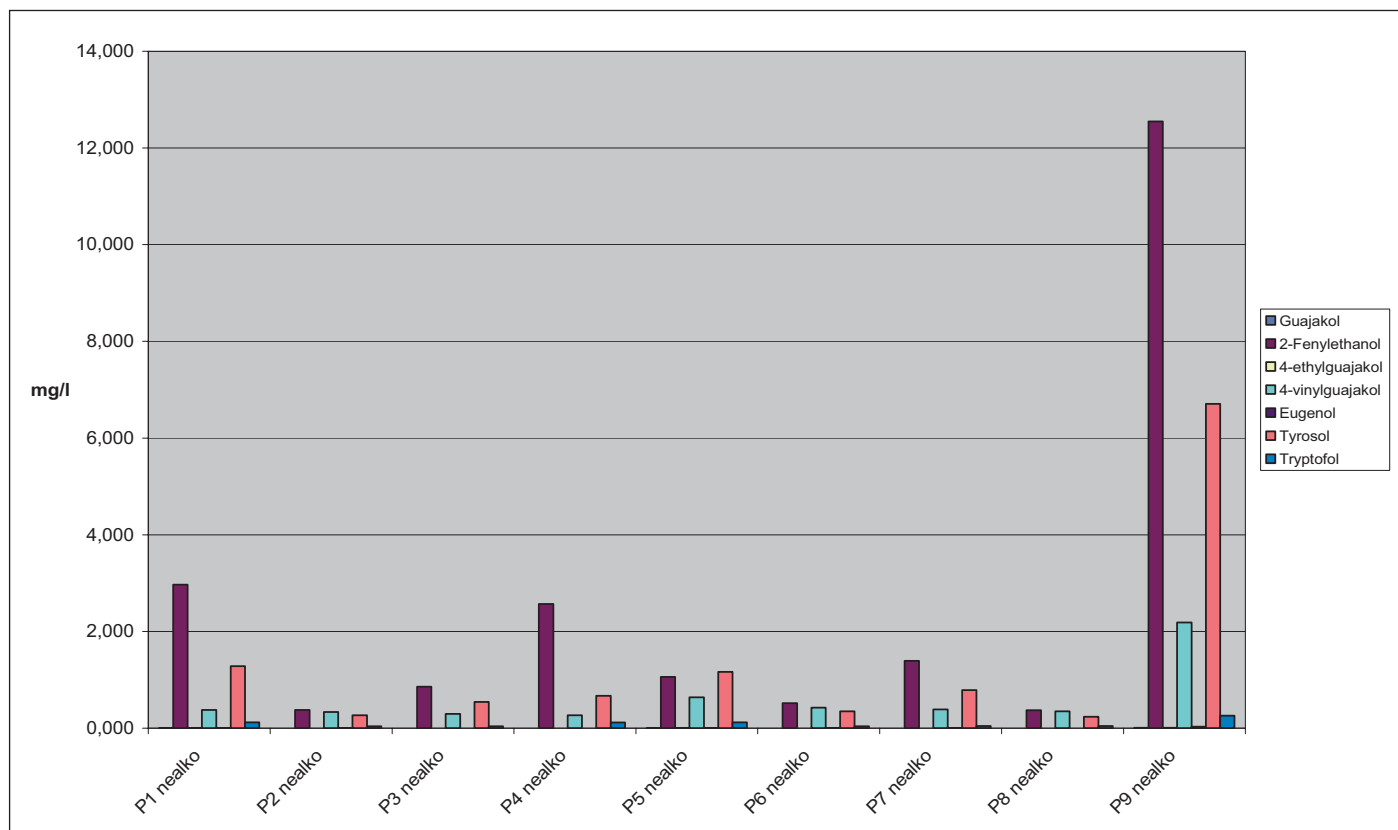
Vzorky P1–P9 nealko / Samples P1–P9 non alcoholic beer

Standardy: guajakol, tryptofol, 4-ethylguajakol, 4-vinylguajakol, eugenol (Sigma- Aldrich), tyrosol, 4-ethylfenol (Fluka), 2-fenylethanol (Merck) / Standards: *guaiacol, tryptophol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylguaiacol, eugenol (Sigma- Aldrich), tyrosol, 4-ethylphenol (Fluka), 2-phenylethanol (Merck)*

Pivovary P1–P3, P5–P8 pracují technologií přerušného kvašení / Breweries P1–P3 and P5–P8 use the technology of interrupted fermentation

Pivovar P4 používá speciální druh kvasinek / Brewery P4 uses a specific yeast strain

Pivovar P9 využívá vakuovou destilaci piva / Brewery P9 uses a vacuum distillation of the beer



Tab. 2 Porovnání tabelovaných a běžných hodnot obsahu vybraných aromatických alkoholů v českých světlých pivech, jejich prahové hodnoty a smyslová charakteristika / Comparison of published concentrations of aromatic alcohols with values found in selected pale Czech lager and draft beers, their perception threshold value and their sensory characteristic

Látka / Compound	Rozsah koncentrací udávaných zahraničními autory (světlé pivo) (mg/l) / Concentration range found by foreigner authors (pale beer) (mg/l)	Pozorovaný rozsah koncentrací u českých piv (světlé pivo výčepní a ležáky) min. / max. / průměr / medián (mg/l) / Concentration range in Czech beers (pale draft and lager beer) min. / max. / average / median (mg/l)	Prahová hodnota vnímání (mg/l) / Perception threshold value (mg/l)	Smyslová charakteristika / Sensory characteristic
2-fenylethanol / 2-phenylethanol	8 – 35	20.0/6.45/6.79/6.65	125	vůně růžová, nasládlé parfémová / aroma rosey, sweetish perfume
guajakol / guaiacol	0.01 – 0.02	0.001/0.030/0.017/0.010	NS	fenolová, připálená / phenolic, burnt
eugenol / eugenol	0.02	0.01/0.034/0.01/0.01	NS	kořeněná, pepřová / spicy, peppery
4-ethylguajakol / 4-ethylguaiacol	0.01 – 0.1	0.001/0.013/0.01/0.01	0.1	fenolová, hořká / phenolic, bitter
4-vinylguajakol / 4-vinylguaiacol	0.05 – 0.55	0.26/3.51/1.48/2.07	0.3	fenolová, po rukavicích (glove), hořká / phenolic, glove-like, bitter
tyrosol / tyrosol	3 – 22	4.85/12.61/6.26/6.04	100 – 200	hořká, chemická / bitter, artificial
tryptofol / tryptophol	0.1 – 1.7	0.11/0.39/0.18/0.15	400	chlebová / bread-like

NS = neurčena / not determined

zorovaný pokles obsahu 2-fenylethanolu (s výjimkou nealkoholického piva vyrobeného vakuovou destilací) v porovnání s pivy výčepními a ležáky. Kromě 2-fenylethanolu, jehož obsah v pivech řádově převyšoval obsahy ostatních aromatických alkoholů, byl u sledovaných vzorků piv pozorován i vyšší obsah tyrosolu a 4-vinylguajakolu. U posledně jmenovaného byly zjištěny obsahy několikanásobně převyšující hodnoty uváděné zahraničními autory pro tento typ světlých, spodně kvašených piv [4-8]. Lze to vysvětlit i tím, že nově navržený postup stanovení využívá velmi šetrný způsob extrakce stanovených látek a navíc pracuje s metodou přidavku interního standardu, což kompenzuje možné ztráty analytu během extrakce a následné analýzy. Získané poznatky budou v budoucnu využity při detailním studiu vlivu technologických podmínek a použitého typu kvasnic na obsah aromatických alkoholů ve vyráběném pivu a dále při typizaci značek českých piv.

#### 4 ZÁVĚR

Navržená metoda stanovení aromatických alkoholů v pivu pomocí SPE a jejich následná GC-MS detekce byla úspěšně odzkoušena v praxi při sledování obsahu aromatických alkoholů v komerčních pivech českého typu.

V případě guajakolu, 4-ethylguajakolu a eugenolu nebyly pozorovány významné rozdíly v jejich obsazích jak u piv výčepních, tak i ležáků a piv nealkoholických. U tyrosolu, tryptofolu, 4-vinylguajakolu a 2-fenylethanolu byl pozorován nárůst v obsahu těchto látek u ležáků, v porovnání s pivy výčepními. V případě 2-fenylethanolu, který lze považovat za hlavního představitele aromatických alkoholů v pivu, byl navíc zaznamenán i významný rozdíl v jeho obsahu mezi pivy různých výrobců.

Obsahy sledovaných aromatických alkoholů ve výčepních pivech a ležáčích kolísaly v širším rozsahu a jejich hodnoty v některých případech, jako například v případě 4-vinylguajakolu, překročily hodnoty uváděné zahraničními autory. Možným vysvětlením je fakt, že kromě použité citlivé a vysoce specifické metody stanovení aromatických alkoholů pomocí GC-MS, byl využit i velmi šetrný způsob jejich extrakce a k vyhodnocení metoda interního standardu kompenzující vliv možných ztrát stanovených látek během extrakčního postupu.

#### 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“

*Do redakce došlo 9. 2. 2009*

*Recenzovaný článek*

#### LITERATURA / REFERENCES

1. Čulík, J., Horák, T., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V.: 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, 177–187.
2. Čulík, J., Figalla, K., Horák, T., Kellner, V.: Stanovení vyšších sensoricky aktivních alkoholů v pivě pomocí extrakce na pevné fázi a kapilární plynové chromatografie. *Kvasny Prum.* **45**, 1999, 4–7.
3. Čulík, J., Figalla, K., Jurková, M., Poledníková, M.: Studium úlohy kvasničního kmene při vzniku vyšších aromatických sensoricky aktivních alkoholů v závislosti na podmínkách kvašení. *Kvasny Prum.* **45**, 1999, 91–94.
4. Pollock, J. R. A.: in: *Brewery Science*, Vol. 2, Academic Press, London, 1981.
5. Moll, M.: in: *Beer and Coolers*, Lavoisier, Paris, 1991, angl. překlad Intercept. Ltd.
6. Krüger, E., Anger, H. M.: in: *Kennzahlen zur Betriebskontrolle und Qualitätsbeschreibung in der Brauwirtschaft*, Behr's Verlag., 1996.
7. Analytica EBC, European Brewery Convention, 5. vydání, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg 1998.
8. 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.

The possible explanation is the very gentle extraction process used in the newly proposed procedure. Also the introduction of an internal standard to the sample at the very beginning of the extraction compensates for possible losses during the extraction and improves the precision of the analytical method.

The information obtained will be used for a detailed study about the influence of the process technology and the yeast strain used, on the content of aromatic alcohols in the beers produced and for the classification of Czech beer brands.

#### 4 CONCLUSIONS

The proposed method for the determination of aromatic alcohols in beer using the SPE followed by GC-MS was successfully tested in practice for commercial Czech-type beers.

For guaiacol, 4-ethylguaiacol and eugenol no significant differences in the contents of these aromatic alcohols in draft and lager beers as well as in non-alcoholic beers were found. Contents of tyrosol, tryptophol, 4-vinylguaiacol and 2-phenylethanol were higher in lager beers when compared to draft beers. In the case of 2-phenylethanol which is the most characteristic compound among the aromatic alcohols in beer, significantly different values were found in the beers from various producers.

The contents of observed aromatic alcohols in draft and lager beers varied within a wide range and sometimes their values, for example in the case of 4-vinylguaiacol exceeded values published by foreign authors. The possible explanation for this is the use of a highly specific GC-MS technique for the determination of the aromatic alcohols as well as the very gentle method for their extraction. Additionally, the introduction of an internal standard to the sample at the very beginning of the extraction improved the precision of the analytical procedure by compensating for possible losses during the extraction.

#### 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 hops”

*Translated by Eva Paterson*

**centec**

Automatické provzdušňování mladiny  
Automatické dávkování kvasnic  
Systém pro pasterizace  
Kontinuální úprava stupňovitosti piva  
Karbonizace-dekarbonizace a deoxidace  
Laboratorní /provozní analyzátoři piva, kvasnic  
Systém pro nitrogenaci  
In-line měření obsahu CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, pH, alkoholu, extraktu, stupňovitosti, zákalu ....  
Analyzátor nealkoholických nápojů  
UV-lampy-dezinfekce vody pitné, provozní, odpadní a bazénové  
Senzory pro měření rychlosti zvuku, teploty, hustoty, CO<sub>2</sub>, změn frekvence rychlosti zvuku  
Laboratorní přístroj pro kompletní analýzu nápojů  
Odstraňování alkoholu z piva / vína  
Analyzátor nealkoholických nápojů

**Kompletní vybavení laboratoří od renomovaných světových firem**

Centec automatika, spol. s r. o.  
Pekařská 87601, 15500 Praha 5  
Tel.: 257 084 111  
Fax: 23 551 87 01  
prodej@centec.cz  
www.centec.cz