

ZKUŠENOSTI S VYUŽITÍM NOVÝCH TECHNIK PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE PŘI ANALÝZE SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

Část I. Aplikace Purge and Trap Injektoru (PTI) a Thermal Desorption Cold Trap Injektoru (TCT) při analýze karbonylových sloučenin v pivu

Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., RNDr. MARIE JURKOVÁ, CSc., Ing. PAVEL ČEJKA, CSc., Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc., VUPS, a. s., Pivovarský ústav, Praha

Klíčová slova: karbonylové sloučeniny, pivo, analýza, plynová chromatografie, PTI, TCT

1. ÚVOD

Chemická povaha látek, výrazně se podílejících na sensorických vlastnostech piva, je nesmírně rozmanitá. Kromě širokého spektra mastných kyselin nasycených i nenasyčených [1], nižších alkoholů [2], heterocyklických sloučenin a mnohých dalších [3], se v pivu setkáváme s velmi početnou skupinou tzv. karbonylových látek. Do této skupiny jsou řazeny zejména některé ketony a celá řada nasycených i nenasyčených aldehydů [4, 5].

Poměrně značná těkavost sensoricky aktivních látek, mezi něž patří i sloučeniny karbonylové, je důvodem, proč jsou tyto sloučeniny stanovovány převážně metodami plynové chromatografie. Kromě správné volby kolony a detektoru lze pokládat za rozhodující výběr vhodného izolačního postupu. Jednotlivé použité metody se však od sebe diametrálně liší a silně závisí jak na chemické povaze stanovených látek, tak na zvoleném způsobu izolace analytu z matrice. S ohledem na požadavky kladené na množství stanovených látek během jedné analýzy lze považovat použití náplňových kolon, až na určité výjimky (např. stanovení diacetylů a dalších vicinálních diketonů) [6], za překonané. Jejich separační schopnosti jsou ve

srovnání s kapilárními kolonami naprosto nedostačující. Používání nových typů kapilárních kolon (fused silica), s možností vyšší tloušťky filmu zakotvené fáze (1,5 až 3 μm) nebo zvětšeného vnitřního průměru kolony (0,53 mm, tzv. widebore resp. megabore kolony), přináší možnost zvýšení kapacity kolony s ohledem na množství nastříkovaného množství vzorku na kolonu [7] při zachování její separační účinnosti. Uvedené klady jsou však vykoupeny prodloužením jedné analýzy přesahující mnohdy jednu hodinu. Kromě nejčastěji používaného detektoru plamenionizačního (FID) [8,9], detektoru elektronového záchytu (ECD) [6,7] a plamenionizačního detektoru s alkalickým kovem (AFID resp. NPD) [10], lze za absolutně bezkonkurenční detektor pro tuto oblast považovat hmotnostní detektor (MSD). Oproti dříve používaným hmotnostním detektorům se současné detektory vyznačují nejen možností pracovat v různých módech (EI, CI, SIM), ale i vysokou citlivostí. Hmotnostní spektrometrie přináší kromě možnosti kvantitativního vyhodnocení i okamžitou možnost kvalitativního vyhodnocení příslušného piku, což je v případě piva, s ohledem na velmi složité a často nepřehledné chromatogramy, naprosto nedocenitelné [11–13].

Rozhodujícím faktorem pro dosažení přesných a reprodukovatelných výsledků při sledování karbonylů a ostatních sensoricky aktivních látek v pivu je volba vhodného způsobu extrakce těchto látek z matrice. Klasický způsob extrakce s vodní parou dnes není pokládán za optimální, právě s přihlédnutím k jejich termolabilitě a k možnosti jejich nekontrolovatelných ztrát během destilace. Navíc lze tuto metodu použít pouze pro některé skupiny látek, např. nižší alkoholy a estery [14–16] a nižší mastné kyseliny [17,18].

V současnosti je v oblasti izolačních technik dávána přednost neinvazivním postupům předkoncentrace analytů, bránícím jejich ztrátám a rozkladu. K preferovaným způsobům patří vakuová destilace těkavých látek s vodní parou [10], metody dynamické headspace na vhodném polymerním sorbentu s využitím kryofokusačního nástavce u plynového chromatografu [12,13,19] a metody statické headspace [6, 20]. Jinou možností je využití klasických extrakčních metod, například vytřepání alkoholů, esterů a aldehydů do dichlormethanu případně dalších rozpouštědel [13, 21] s možným následným přečištěním na sloupci vhodného sorbentu [21].

Tab. 1 Vybrané indikátory stárnutí piva

Název	Číslo na chromatogramu	Rozsah koncentrací (µg/l)
2-methylpropanal (isobutyraldehyd, isobutanal)	1	5 – 50
2-methylbutanal	2	10 – 200
3-methylbutanal (isovaleraldehyd, isovaleral)	3	5 – 100
hexanal	4	0,1 – 5
heptanal	5	3 – 30
oktanal	6	0,5 – 15
trans-2-butenal	7	0,5 – 40
trans-2-oktanal	8	0,02 – 0,30
trans-2-nonenal	9	0,05 – 0,30
benzaldehyd	10	1 – 50
fenylacetaldehyd (fenylethanal)	11	10 – 200
2-furfural	12	20 – 3000
2-acetylpyrrol	13	100 – 600
3-methylbutan-2-on	14	1 – 100
etyléster kys. nikotinové	15	5 – 750

Pozn.: Číslo na chromatogramu znamená označení jednotlivých piků odpovídajících sloučenin na obrázcích 1, 3, 4, 6, 7, 8.

Nové možnosti skýtá extrakce analytu na pevné fázi. Jako vhodný sorbent lze použít kromě běžně používaných oktadecylových sorbentů i například sorbent obsahující cyklohexylové skupiny [22].

Docilený pokrok v přístrojové technice umožňuje v oblasti plynové chromatografie uplatnit i některé atypické chromatografické postupy, například pracovat s kombinacemi náplňové předkolony a kapilární kolony. I když byla tato kombinace úspěšně vyzkoušena při analýze alkoholů, acetalde-

hydu a ethylacetátu [9], nedosáhla zatím, s ohledem na komplikovanost technického řešení, většího rozšíření. Jiným způsobem umožňujícím paralelní stanovení různých látek dělených na jedné koloně je multidekční uspořádání plynového chromatografu [24], kdy jsou jednotlivé skupiny látek stanoveny paralelně pomocí specifických detektorů. Toto uspořádání je však možné provést pouze u omezeného počtu přístrojů a jeho využití je dále limitováno množstvím stanovené látky v nastříkovaném objemu vzorku. Použití hmotnostního detektoru však ve většině případů eliminuje nutnost používat toto poměrně komplikované zapojení.

Je tedy zřejmé, že většina výše uvedených postupů, kromě svých předností, trpí i mnohými nedostatky.

Před několika lety uvedla na trh firma Chrompack speciální nástavce určené pro plynovou chromatografii pracující na principu dynamické headspace analýzy a kryofokusace [Purge and Trap Injektor (PTI) a jeho modifikaci Thermal Desorption Cold Trap Injektor (TCT)]. Snahou bylo vložit analytickým chemikům do rukou pomůcku umožňující získat rychlým a neinvazivním způsobem těkavé látky z vodných roztoků. V článku uvádíme shrnutí zkušeností získaných při nasazení PTI a TCT při stanovení karbonylových sloučenin v pivě. Rádi bychom tím přispěli k rozšíření zatím poměrně skoupých znalostí v této oblasti.

Na základě literárního přehledu [25,26] bylo vytypováno 16 převážně karbonylových sloučenin považovaných za indikátory stárnutí piva a jejich pomocí bylo provedeno testování PTI a TCT injektoru. Přehled vybraných karbonylových sloučenin a orientační rozsah jejich koncentrací v pivu je uveden v tab. 1 tak, jak je uváděn v literatuře [25,26]. Jedná se o přibližné hodnoty, dolní hranice udává jejich přibližný obsah v čerstvém pivu, horní hranice znamená extrémní hodnoty zjištěné u starých respektive uměle stařených piv.

Jak vyplývá z tab. 1, je obsah těchto látek v pivu přibližně o jeden až tři řády nižší než obsah běžně stanovených těkavých látek, zejména vyšších alkoholů a esterů. Z této skutečnosti vyplývá obtížnost jejich stanovení, neboť pouze dokonalá separace piků na koloně může snížit na minimum nebezpečí překrytí piků stanovené látky pikem látky koeluující.

2. VÝBĚR VHDNÉ KOLONY

Otestovány byly základní typy kapilárních kolon s cílem vybrat kolonu umožňující stanovení co největšího spektra látek, případně jejich skupin. Protože zvolené spektrum látek obsahovalo látky s fyzikálně chemickými vlastnostmi, velmi podobnými či naopak diametrálně odlišnými, byly

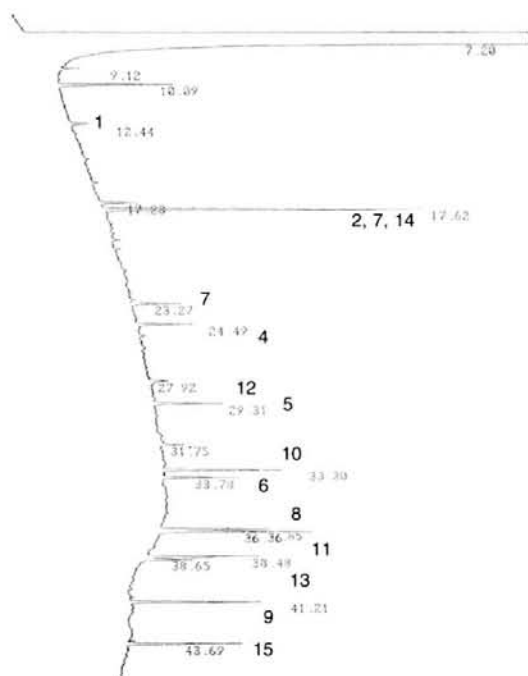
odzkoušeny kolony nízko- i vysokopolarní.

Standardní nízkopolarní kolony SPB-5 a DB-5 o délce 30 m, vnitřním průměru 0,32 mm a tloušťce filmu 0,25 µm ani výsepolární kapilární kolona firmy Hewlett Packard smocná fází Carbowax 20M o délce 50m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce fáze 0,15 µm, neposkytly uspokojivé výsledky.

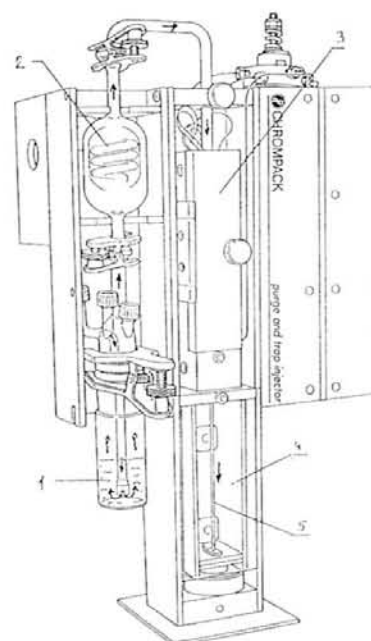
Proto byla dále otestována moderní polarární kapilární wide-bore kolona DB-WAX o délce 15 m, vnitřním průměru 0,53 mm a tloušťce fáze 1 µm. Docílené dělení lze, s výjimkou 2- a 3-methylbutanalů, 2-methylpropanalu a 3-methyl-2-butanonu, považovat za uspokojivé. U této skupiny látek, tvořené z převážné části pětiuhlíkatými aldehydy, bylo nedokonalé dělení způsobeno s největší pravděpodobností omezenou délkou použité kolony i nižší tloušťkou filmu vázané fáze. S ohledem na docílené výsledky u nízko- i vysokopolarních kolon byla zvolena pro další testování speciální nízkopolarární kapilární kolona DB 624 o délce 60 m, vnitřním průměru 0,32 mm a tloušťce filmu 1,8 µm. Běžně se tato kolona používá pro stanovení naprosto odlišného spektra látek, a to těkavých alifatických halogenuhlovdiků. Docílené výsledky, jak vyplývá z chromatogramu směsi 15 sledovaných látek (obr. 1), lze považovat za velmi uspokojivé, neboť pouze u 2-methylbutanalů, 3-methyl-2-butanonu a t-2-butenalu nedošlo k dokonalé separaci. Celkový čas analýzy 45 minut lze považovat rovněž za vyhovující. Pro další použití s PTI byla proto zvolena tato kolona.

3. VYUŽITÍ PTI INJEKTORU PŘI STANOVENÍ KARBONYLOVÝCH SLOUČENIN V PIVU

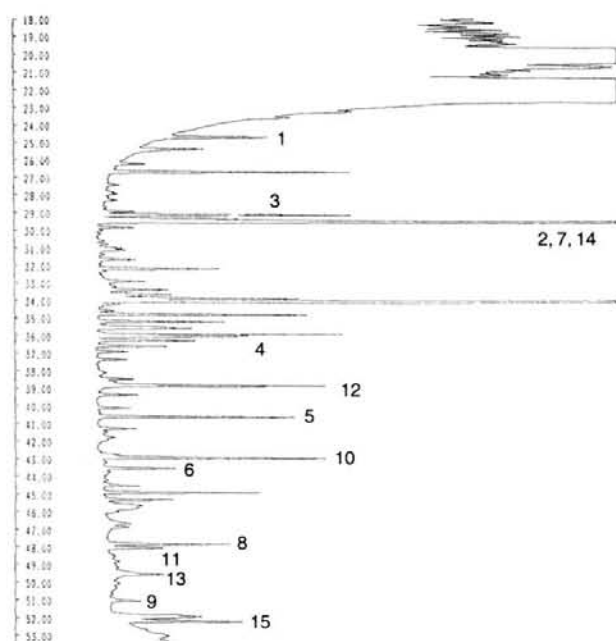
Mechanismus funkce Purge and Trap In-



Obr. 1 Chromatogram standardní směsi karbonylových sloučenin na speciální 60 m koloně DB-624 (vázaná fáze)



Obr. 2 Schema PTI injektoru
1 – Nádobka se stripovanou maticí, 2 – Kondenzor, 3 – Desorpční část, 4 – Komůrka chlazená kapalným dusíkem, 5 – Vyhříváná odporová pátka



Obr. 3 Chromatogram modelového roztoku karbonylových sloučenin získaných pomocí PTI injektoru (10 ml, koncentrace 67 µg/l)

jektoru (PTI) je zřejmý z obr. 2. Analyt je vypláchnut proudem dusíku z roztoku umístěného v nádobce injektoru. Po průchodu kondenzorem, kde je stripovací plyn zbaven vlhkosti, postupuje dusík s analytem přes desorpční část (v této modifikaci vyřazena z činnosti) do kryofokusační části přístroje. Ta je tvořena speciální křemennou kolonou umístěnou v odporové píci. Během stripovací fáze je tato část chlazená tekutým dusíkem, přičemž dochází ke kryofokusaci (předkoncentraci analytu vymražením) na stěnách křemenné kolony. Po ukončení stripování je zapojeno odporové vyhřívání pícky, které umožní během několika sekund dosáhnout požadované desorpční teploty (200 až 240 °C). Tím dojde k vypláchnutí zachyceného analytu na kolonu plynového chromatografu. Výhodou této metody je tedy předkoncentrace analytu a jeho nástřik na kolonu v poměrně velmi úzké zóně.

Možnost využití této metody byla nej-

Tab. 2 Dosažené meze detekce sloučenin při nasazení PTI – stripovaný objem 10 ml

Sloučenina	Mez detekce µg/l
2-methylpropanal	5
3-methylbutanal	5
suma 2-methylbutanal + 3-methylbutan-2-on	1
t-2-butenal	5
hexanal	5
furfural	10
heptanal	2
benzaldehyd	2
t-2-oktenal	2
fenylacetaldehyd	10
acetylpyrrol	10
t-2-nonenal	10
etyléster kyseliny nikotinové	5

dříve odzkoušena na modelovém roztoku 4% ethanolu a dále na reálném vzorku piva. Ze vzhledu chromatogramu na obr. 3 je zřejmá jeho odlišnost od chromatogramu získaného klasickou split-splitless metodou na téže koloně (obr. 1). Kromě změn relativních molárních odezev jednotlivých komponent, způsobených jejich rozličnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi uplatňujícími se v ethanolickém roztoku, došlo k překrytí píky acetonu mohutným píkem ethanolu vystřipovaného spolu s ostatními sledovanými látkami.

Současné došlo i k posunu retenčních časů způsobených nejen nutností použít vyšší tlak na koloně s ohledem na zařazení kryofokusačního nástavce, ale i uplatněním tzv. solvent efektu význačného pro ob-

last kapilární chromatografie.

Po počátečních obtížích způsobených nadměrným pěněním vzorku, které se podařilo odstranit použitím vhodného odpěňovacího přípravku a volbou správné pórovitosti sintrového skla u stripovacího nástavce, bylo přikročeno k nasazení PTI pro analýzu reálných vzorků piva. Chromatogram reálného vzorku piva na PTI je uveden na obr. 4. Dosažené detekční limity pro jednotlivé sloučeniny, při poměru signál/šum roven 3/1, jsou uvedeny v tab. 2.

Podmínky plynové chromatografie a PTI

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu Chrompack CP 9001 vybaveném PTI (výhradně splitless mód).

Kolona kapilární křemenná DB-624 (firma J & W), délka 60 m, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu fáze 1,8 µm.

Plamenoionizační detektor (FID)

nosný plyn: dusík
tlak na koloně: 85 kPa
Teplota nástřiku: 240 °C
Teplota detektoru: 240 °C
Teplotní program pece:
40 °C (15 min.)
– 5 °C/min. – 200 °C
(5 min.) – 40 °C/min.
– 240 °C (7 min.)

Program PTI

Doba předchlazení komůrky chlazené tekutým dusíkem: 2 min.

Teplota komůrky chlazené tekutým dusíkem: – 120 °C

Teplota desorpce (po vyhřátí odporové pícky): 220 °C

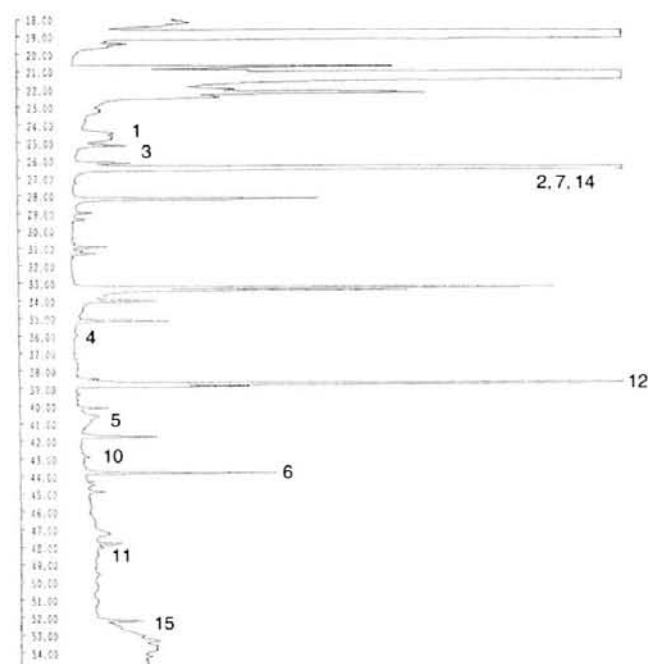
Doba stripování: 10 min.

Dosažené meze detekce nebylo možno ve většině případů považovat za optimální a v některých případech, kdy se množství stanovených látek v pivě pohybují pod hranicí 1 µg/l, je lze považovat za naprosto nevyhovující. Důvodem je kromě značné rozpustnosti stanovených látek ve vodném alkoholickém roztoku i z konstrukčních důvodů omezený objem stripovaného vzorku, který činil v našem případě pouze 10 ml.

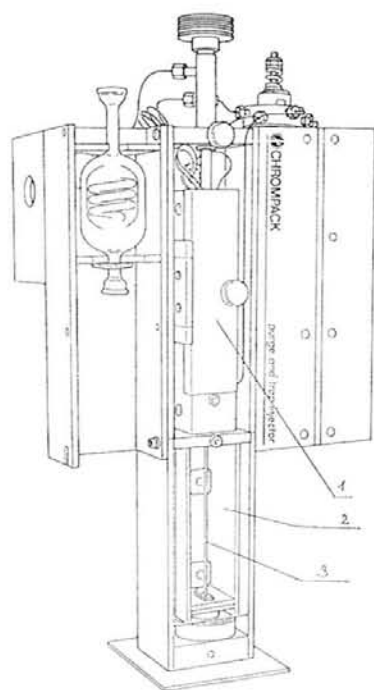
Jak vyplývá z výše uvedených hodnot v tab. 2, s výjimkou furfuralu, 3-methylbutanal a etylesteru kyseliny nikotinové, nebylo by za těchto podmínek možné, s ohledem na dosažený detekční limit, sledovat změny obsahu jednotlivých sloučenin charakterizující proces stárnutí piva. Z tohoto důvodu byla provedena přestavba PTI na TCT, s cílem zvýšit citlivost uvedené metody. Toto přístrojové uspořádání umožňuje provádět stripování větších objemů vzorku (až 500 ml) mimo vlastní TCT injektor, a tím do určité míry zvýšit citlivost metody.

4. VYUŽITÍ TCT INJEKTORU PŘI STANOVENÍ KARBONYLOVÝCH SLOUČENIN V PIVU

Schema TCT injektoru je znázorněno na obr. 5. Při tomto uspořádání je vzorek stripován mimo vlastní injektor a analyt je zachycen na sorpční trubičce plněné sorbentem Tenaxem. Po ukončení stripování je sorpční trubička vložena do desorpční části injektoru a po tepelné desorpci je analyt zakonzentrován v kryofokusačním nástavci obdobně jako tomu bylo u PTI. Výhodou to-



Obr. 4 Chromatogram reálného vzorku piva při použití PTI



Obr. 5 Schema TCT injektoru
1 – desorpční část obsahující trubičku plněnou sorbentem, 2 – komůrka chlazená kapalným dusíkem, 3 – vyhřívaná odporová píčka

hoto způsobu je možnost stripovat větší objemy vzorku, nevýhodou nutnost manuální manipulace při stripování a vkládání sorpční trubičky do TCT.

Podmínky plynové chromatografie a TCT

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu Chrompack CP 9001 vyba-

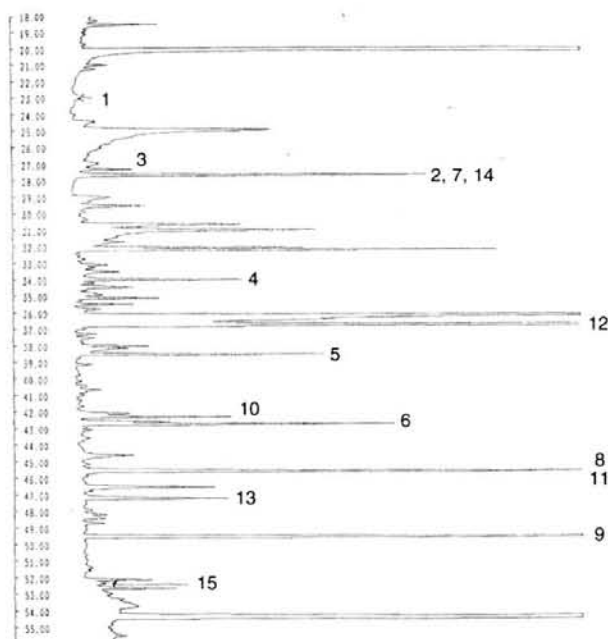
veném TCT nástavcem (výhradně splitless mód) a na shodné koloně a za stejných podmínek jako v předchozím případě, pouze program TCT se od předešlého lišil.

Program TCT

Doba předchlazení komůrky chlazené tekutým dusíkem: 2 min.
Teplota komůrky chlazené tekutým dusíkem: -120°C
Náplň sorpční trubičky Tenax TA, 90 mg, pórovitost 0,35/0,25 mm tj. 35/60 mesh
Teplota desorpce ze sorpční trubičky: 280°C
Teplota desorpce (po vyhřátí odporové píčky): 270°C
Doba stripování 10 min.

Obdobně jako u PTI byl i zde patrný rozdíl mezi identifikačním chromatogramem získaným přímým nástřikem 1,5 μl roztoku karbonylových sloučenin v abs. ethanolu na lože sorbentu (obr.6) a chromatogramem vystripovaného modelového roztoku 4 % ethanolu obsahujícího 37,5 $\mu\text{g/l}$ jednotlivých karbonylových sloučenin (obr. 7). Na obr. 8 je prezentován chromatogram reálného vzorku piva po tepelném šokování. Získané poznatky lze shrnout do následujících bodů:

a) Docílené zvýšení citlivosti bylo v porovnání s PTI přibližně pětinasobné. Jeho

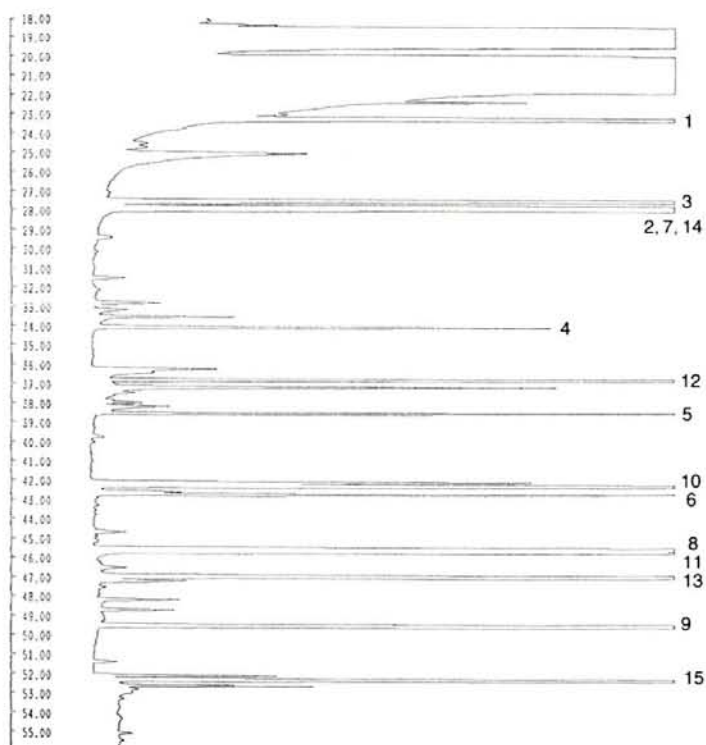


Obr. 7 Chromatogram modelového roztoku karbonylových sloučenin získaný pomocí TCT (500 ml, konc. 37,5 $\mu\text{g/l}$)

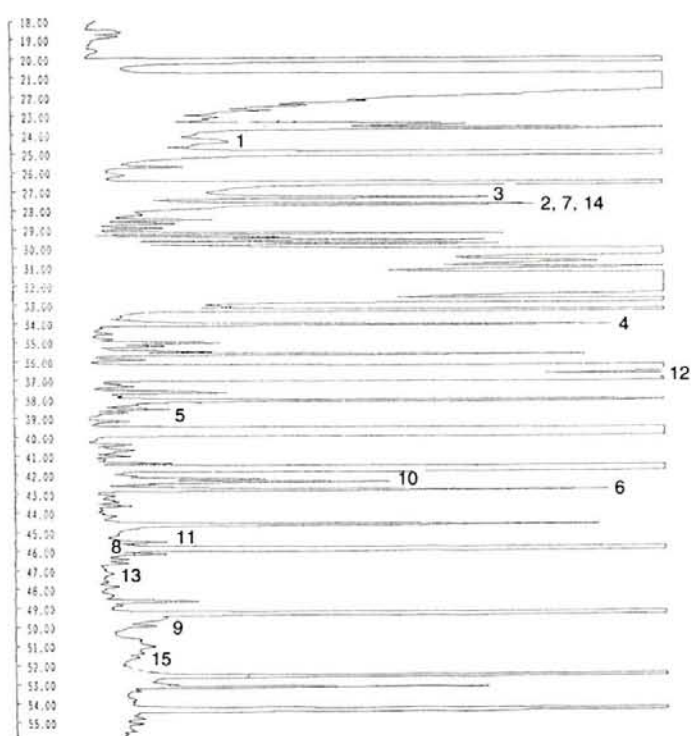
praktický přínos je však diskutabilní s ohledem na skutečnost, že dochází současně k zakoncentrování i širokého spektra doprovodných látek převyšujících řádově obsah přítomných senzorycky aktivních karbonylových látek. Píky těchto doprovodných látek mohou svou velikostí překrýt píky stanovených karbonylových sloučenin, a tím znehodnotit výsledky analýzy.

b) Optimální teplota pro stripování karbonylových látek činí 35°C .

c) Při stripování větších objemů matrice



Obr. 6 Chromatogram standardní směsi karbonylových sloučenin získaných pomocí TCT (přímý nástřik 1,5 μl standardu na sorbent)



Obr. 8 Chromatogram reálného vzorku piva získaný pomocí TCT

(500 ml) dochází při této teplotě k sorpci značného množství vody a ethanolu na loži sorbentu. Při následující kryofokusaci dochází k zamrznutí kryofokusační kapiláry a k zahlcení kolony. Možnou obranou je pouze zpětné vysušení sorbentu proudem dusíku. Důsledkem jsou však značné ztráty C_4 a C_5 karbonylů na počátku chromatogramu.

d) Výševroucí sloučeniny, zejména ethylester kyseliny nikotinové a acetylpyrrol vykazují velmi nízké výtěžnosti.

e) U TCT bylo pozorováno i zhoršené dělení t-2-oktenalu a fenylacetaldehydu. Důvodem je zřejmě usazování vrstvičky vody a její difuze do silné vrstvy vázané fáze, a tím zhoršení dělicích vlastností kolony.

5. ZÁVĚRY

Z dosažených výsledků na PTI resp. TCT injektoru lze vyvodit následující závěry. Pro stanovení karbonylových sloučenin v pивě nelze považovat nasazení PTI v dané konfiguraci za příliš výhodné. Důvody jsou následující. Malý objem stripovaného vzorku, který je nutné volit s ohledem na konstrukční uspořádání PTI a silnou pěnivost matrice, zhoršuje detekční limit metody. Konstrukční uspořádání PTI s vymrazovačem vodních par zařazeným před kryofokusační částí přináší i další problémy. Kromě odstranění vody zde zřejmě dochází i k vymražení stanovených látek, což se projevuje zřetelným pamětovým efektem.

Na rozdíl od PTI umožňuje TCT stripování velkého množství vzorku (500 ml i více) a nejsou zde tak velké problémy s jeho pěněním. Nutnost předsušení lože sorbentu před kryofokusací však působí ztráty některých těžkých karbonylových sloučenin.

Zdá se, že ani výše uvedené výhody TCT nestačí na odstranění problémů působených vysokým dosaženým detekčním limitem, který se pohybuje v oblasti jednotek $\mu\text{g/l}$. V případě t-2-oktenalu a t-2-nonenalu, jejichž přirozené koncentrace leží o dva řády níže, bude proto nutné použít jinou metodu stanovení, založenou například na vhodné derivatizaci.

Jedním z největších problémů, se kterým jsme se setkali, jsou až několikařádkové rozdíly v obsahu nižších alkoholů, esterů i jiných látek a senzoričky aktivních karbonylových látek v pivě. Ve svém důsledku to znamená, že piky nižších alkoholů a esterů mohou po předkoncentraci překrýt piky sledovaných senzoričky aktivních látek, a tím naprosto znehodnotit dosažené výsledky. Do jisté míry lze tento problém vyřešit volbou vhodné kolony, avšak bez možnosti konfirmace čistoty jednotlivých piků pomocí hmotnostního detektoru zde neustále přetrvává nebezpečí falešně pozitivních výsledků. Nasazení běžného plamenoionizačního detektoru (FID) ve spojení s kryofokusací se ukázalo s ohledem na výše uvedené skutečnosti jako nepříliš vhodné, neboť se nejedná o selektivní detektor. Za perspektivní lze považovat v případě kryofokusace pouze spojení s hmotnostním detektorem.

Určitým způsobem, jakým lze nedostupnost hmotnostního detektoru do jisté míry eliminovat, je provedení selektivní derivatizace karbonylových sloučenin. Výhodou je zvýšení odezvy detektoru pouze pro vybranou skupinu stanovených látek. Použití detektoru elektronového záchytu (ECD) by tak umožnilo i stanovení t-2-oktenalu a t-2-nonenalu, tj. látek, jejichž obsahy leží až o dva řády níže, než obsahy ostatních karbonylových sloučenin. Poznatky získané v této oblasti budou prezentovány v dalším článku.

LITERATURA

- [1] NARZISS, L., MIEDANER, H., MÜCK, E.: *Mshr. Brauwiss.* **39**, 1986, s. 109.
- [2] SEELEITNER, G., LIEBL, M.: *Brauwissenschaft* **35**, 1982, s. 25.
- [3] BOHMANN, J. J.: *Mshr. Brauwiss.* **37**, 1984, s. 436.
- [4] BARKER, R. L., et al.: *J. Inst. Brew.*, **89**, 1983, s. 411.
- [5] NARZISS, L., MIEDANER, H., GRAF, H.: *Mshr. Brauwiss.* **38**, 1985, s. 396.
- [6] MORRISON, N. M., BENDIAK, D. S.: *Techn. Q. Master. Brew. Assoc. Am.* **24**, 1987, s. 14.

- [7] LAKSZNER, K., et al.: *Mshr. Brauwiss.* **42**, 1989, s. 92.
- [8] PARISH, M. E., BRADDOCK, R. J., WICKER, L.: *J. Food. Qual.* **13**, 1990, s. 249.
- [9] HAGMAN, G., ROERAADE, J., J. *High Resol. Chromatogr.* **13**, 1990, s. 352.
- [10] NARZISS, L., MIEDANER, H., KOCH, M.: *Mshr. Brauwiss.* **41**, 1988, s. 844.
- [11] PEPPARD, T. L.: *J. Inst. Brew.* **91**, 1985, s. 16.
- [12] EICHHORN, P. et al.: *Proc. Eur. Brew. Conv.*, 1989, s. 717.
- [13] TORRENT, J. et al.: *Proc. Eur. Brew. Conv.*, 1989, s. 757.
- [14] TRESSL, R. et al.: *Mshr. Brauerei* **28**, 1975, s. 109.
- [15] NEUMANN, L.: *Mshr. Brauerei* **31**, 1978, s. 86.
- [16] NARZISS, L., MIEDANER, H., SCHÖNDORFER, H.: *Brauwissenschaft* **35**, 1982, s. 109.
- [17] Mc PHERSON, J. K., BUCKEE, G. K.: *J. Inst. Brew.* **80**, 1974, s. 540.
- [18] SANDRA, P., VERZEL, M.: *J. Inst. Brew.* **81**, 1975, s. 302.
- [19] SHIMODA, M., SHIBAMOTO, T.: *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1990, s. 802.
- [20] BAKER, C. D.: *J. Inst. Brew.* **95**, 1989, s. 267.
- [21] IRWIN, A. J., THOMPSON, D. J.: *J. Inst. Brew.* **93**, 1987, s. 113.
- [22] GELSOMINI, N., CAPOZZI, F., FAGGI, C.: *J. High Resol. Chromatogr.* **13**, 1990, s. 352.
- [23] BARKER, R. L., IRWIN, A. J., MURRAY, C. R.: *Techn. Q. Master. Brew. Assoc. Am.* **29**, 1992, s. 11.
- [24] SEELEITNER, G., LIEBL, M.: *Brauwissenschaft*, **35**, 1982, s. 25.
- [25] EICHHORN, P.: *Disertační práce*. TU München, 1991.
- [26] NARZISS, L., et al.: *Techn. Q. Master. Brew. Assoc. Am.* **30**, 1993, s. 48.

Lektoroval: Ing. Pavel Dostálek, CSc.
Do redakce došlo 8. 7. 1997