

Z výzkumu a praxe

STANOVENÍ VYŠŠÍCH SENZORICKY AKTIVNÍCH ALKOHOLŮ V PIVĚ POMOCÍ EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI A KAPILÁRNÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., Ing. KAREL FIGALLA¹⁾, Mgr. TOMÁŠ HORÁK, Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc.
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a.s., Pivovarský ústav Praha, ¹⁾ Měšťanský pivovar v Poličce, a.s.

Klíčová slova: Tyrosol, tryptofol, 2-fenylethanol, guajakol, plynová chromatografie, pivo

1. ÚVOD

Za nejstarší metodu stanovení vyšších aromatických alkoholů lze považovat stanovení spektrofotometrické, využívající vznik barevných reakčních produktů jednotlivých stanovených látek. Kvantitativním stanovením tyrosolu, tryptofolu a 2-fenylethanolu se zabývali Drews a kol. [1], kteří pro stanovení prvních dvou látek využili Millonovy barevné reakce pro fenolové skupiny [2]. Tryptofol stanovili tito autoři reakcí s vanilinsírovou kyselinou a 2-fenylethanol metodou Kapellera – Adlera [3]. Protože však nebyli schopni stanovit přítomné aromatické alkoholy paralelně, byli nuceni použít k jejich rozdělení sloupcovou chromatografii.

McFarlane a Thompson [4] využili pro kvantitativní důkaz 2-fenylethanolu klasickou destilací vzorku piva. Po extrakci destilátu dichlormethanem odpařili rozpouštědlo a provedli nitraci analytu směsí KNO_3 a H_2SO_4 . 2-fenylethanol stanovili spektrofotometricky [3]. Pro stanovení tyrosolu a tryptofolu však použili pivo odhořčené směsí isooktanu a kyseliny chlorovodíkové. Odhořčené pivo extrahovali ethylacetátem. Zbytek po oddestilování ethylacetátu vytřepali do chloroformu a přečistili na sloupci o složení H_2SiO_3 , Celit a Al_2O_3 . Tryptofol se na sloupci nesorboval, tyrosol byl eluován ethylacetátem. Tryptofol autoři stanovili spektrofotometricky reakcí s vanilinchlorovodíkovou kyselinou, tyrosol Millonovým činidlem nebo Pauliho diazočinidlem.

Stejný analytický postup jako McFarlane a Thompson [4] užila i Poledníková [5] pro studium tvorby vyšších aromatických alkoholů RD mutanty produkčních kmenů *Saccharomyces carlsbergensis*.

Pro selektivní stanovení 2-fenylethanolu byly publikovány metody Äyräpää a Stevensena [6]. Nykanen [7] užil plynovou chromatografii pro stanovení tyrosolu a tryptofolu.

V každém případě je však kvalita dosažených výsledků rozhodujícím způsobem ovlivněna zvoleným izolačním postupem.

Za nejstarší a nejčastěji používaný postup izolace těkavých fenolů lze považovat extrakci v systému kapalina-kapalina. Kieninger a Boeck [8] po destilaci piva, mladiny či upraveného vzorku sladu vodní párou použili jako extrakční činidlo diethylether, extrakt přečistili na koloně plněné oxidem hlinitým a po propláchnutí diethyletherem za-

hustili eluát proudem dusíku. Koncentrát nastříkli na náplňovou kolonu Chromosorb G AW DMCS s 5% Carbowax 20M. Pro detekci použili plamenionizační detektor (FID). Tímto způsobem analyzovali těkavé fenoly, jako např. guajakol, fenol, 4-ethylguajakol, kresoly atd.

Obdobně i Gohee a Alary [9] použili shodnou metodu pro stanovení těkavých fenolických látek v balzámu.

Rozsáhlou práci v oblasti pivovarství uveřejnili Alvarez a kol. [10]. Autoři stanovili v pivu kromě těkavých alkoholů i kyseliny a jejich estery. Bylo porovnáno použití hexanolu a CS_2 jako extrakčního činidla. Obě látky poskytovaly shodné výsledky při kvantitativní analýze C6-C10 mastných kyselin a 2-fenylethylacetátu. V případě 2-fenylethanolu se však hexanol ukázal jako vhodnější. CS_2 extrakt byl získán metodou dle Stenroose [11]. Také Szlavko [12,13] použila klasickou extrakci pro stanovení tyrosolu, tryptofolu a 2-fenylethanolu. K extrakci byl použit ethylacetát, emulze byla následně odstředěna a organická vrstva po zakoncentrování dusíkem nastříknuta na kolonu plněnou 10 % silikonovou gumou UC-W98 na Diaportu S. Detekce byla provedena pomocí detektoru FID. Tresl a kol. [14] se zabývali izolací a kvantitativním stanovením látek vzniklých termickým štěpením kyseliny ferulové, sinapinové a p-kumarové kyseliny. Pivo upravené na pH = 7,5 bylo extrahováno směsí pentan-diethylether po dobu 48 hodin. Extrakt byl zakoncentrován na vakuové odparce na 1/10 původního objemu. K rozdělení směsi byla využita sloupcová chromatografie s různými nosiči. Postupnými změnami složení elučního roztoku tak byly získány frakce o různé skladbě fenolických látek. Jednotlivé sloučeniny byly detegovány metodou plynové chromatografie s FID detektorem. Použitá kolona byla náplňová se zakotvenou fází Chromosorb W-AW/DMCS, vázaná fáze: 8 % OV-17. Pro identifikaci jednotlivých sloučenin byl využit hmotnostní spektrometr.

V poslední době se dostávají do popředí metody pracující na principu extrakce na pevné fázi, a to nejen pro svou jednoduchost, přesnost a rychlost, ale také díky možnosti získat analyty v širokém rozmezí koncentrací.

Saegusa a kol. [15] analyzovali guajakol spolu s katecholem ze vzorku moče po extrakci na kolonce Extrelut 3. Eluci provedli dichlormethanem a vzorek odpařili proudem dusíku. Odparek následně rozpustili v ethanolu a získaný roztok nanесли na kolonku Dovex AGSOW-X4 (H^+ forma) a eluovali ethanolem. Eluát následně odpařili a rozpustili v ethanolu a opět převedli na kolonku Dovex AG1X-8 (acetátová forma) a eluci opět provedli ethanolem. Po odpaření nadbytku rozpouštědla dusíkem zbytek derivatizovali a vzniklé silylderiváty analyzovali plynovým chromatografem napojeným na hmotnostní spektrometr.

Velkou jednoduchostí se vyznačovala metoda Donhausera a kol. [16] pro stanovení neutrálních fenolů v pivu. Těkavé složky byly odděleny z piva destilací vodní párou a následnou extrakcí na pevné fázi. Jednotlivé látky byly stanoveny plynovou kapilární chromatografií. Tímto způsobem byly stanoveny těkavé nepolární fenoly 4-vinylguajakol a 4-vinylfenol a dále netěkavé fenolické sloučeniny, fenol, p-kresol, guajakol, tyrosol, tryptofol, 2-benzoxazolinon, iso-eugenol a syringol.

Metody kapilární plynové chromatografie byly též s úspěchem použity při stanovení 2-fenylethanolu v cidru [17] a ve vínu [18].

Headspace techniky se s ohledem na fyzikálně-chemické vlastnosti vyšších aromatických alkoholů a fenolických sloučenin prakticky neuvžívají. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se při stanovení vyšších aromatických alkoholů v pivě příliš často neuplatňuje, zato je hojně využívána v biomedicině [19-21].

Stanovením hlavních fenolických složek v olivovém oleji pomocí HPLC se zabývali Tsimidou a kol. [22] a Akasbi a kol. [23].

I přes značné množství uveřejněných prací však dosud nebyla publikována metoda umožňující současné stanovení všech čtyř aromatických alkoholů v pivě.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Ke stanovení vyšších aromatických alkoholů byla převzata metoda publikovaná Donhauserem a kol. [16], kterou však bylo s ohledem na naše požadavky nutné v hlavních bodech podstatně pozměnit (volba jiného elučního činidla, nový teplotní program apod.).

2.1. Použité přístroje, zařízení a chemikálie

Přístroje a zařízení:

- plynový chromatograf: Chrompack CP 9001 (Chrompack)
- olejová vývěva
- zařízení pro extrakci na pevné fázi (SULPELCO)
- extrakční kolony:
LiChrolut RP-18 (500mg)
LiChrolut EN (200mg) (MERCK)
Separcol SI C18 (500mg) (ANAPRON)
- injekční stříkačky 10, 250, 500 a 1000 μ l (HAMILTON)
- pH-metr PHM 84 (Radiometer)
- dva chladič boxy
- ultrazvuková lázeň

Chemikálie:

- methanol a ethylacetát: (MERCK)
- acetonitril: (J.T. BAKER)
- chloroform: (ROMIL CHEMICALS)
- diethylether p.a.: (LACHEMA)
- roztoky hydroxidu sodného o koncentraci 10 mol/l a 0,01 mol/l
- ethanol 96 % obj. (použit jako rozpouštědlo chromatografických standardů)

Chromatografické standardy:

- guajakol: (SIGMA-ALDRICH)
- tryptofol: (SIGMA CHEMICAL)
- tyrosol a 2-fenylethanol: (FLUKA)
- 4-ethylfenol: (FLUKA), (použit jako vnitřní standard)

3. VALIDACE NOVÉ ANALYTICKÉ METODY

Výsledky analýz při stanovení linearit odezvy detektorů, výtěžnosti a opakovatelnosti byly vyhodnocovány metodou absolutní kalibrace (metoda vnějšího standardu). Metoda spočívá v nástřiku známých množství vzorku a standardu za identických podmínek do plynového chromatografu a v následném porovnání získaných ploch jednotlivých píků.

Metoda vnitřního standardu byla použita pro vyhodnocení výtěžnosti a obsahu vyšších aromatických alkoholů v reálných vzorcích. Za vnitřní standard (IS) byl zvolen, s ohledem na obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti s látkami stanovovanými, 4-ethylfenol.

Podmínky na plynovém chromatografu byly následující:

- chromatografická kolona: kapilární kolona DB-5 s vázanou fází, délka kolony 60 m, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 1 μ m
- detektor: plamenoionizační (FID)
- teplota nástřiku: 220 °C
- teplota detektoru: 280 °C
- teplotní program: 60 °C (3 min) – 4 °C/min – 130 °C (0 min) – 6 °C/min – 280 °C (10 min)
- nosný plyn: dusík, kvalita ECD grade
- pomocné plyny: vodík a vzduch, dusík – pro zahuštění extraktu

Odezvové faktory jednotlivých stanove-

Tab. 1 Absolutní odezvové faktory a příslušné retenční časy stanovených látek

látka	retenční čas R_t (min)	odezvový faktor R_f
guajakol	28,26	0,0713
2-fenylethanol	29,63	0,0626
4-ethylfenol (IS)	30,99	0,0519
tyrosol	39,01	0,0722
tryptofol	47,83	0,0613

ných látek R_f definované jako podíl koncentrace stanovené látky a příslušné plochy píku jsou obsaženy v tab. 1.

Ověření linearit odezvy detektoru

Linearita odezvy detektoru byla ověřena standardními metodami pro koncentrační rozmezí u guajakolu (0 až 40 mg/l), 2-fenylethanolu (0 až 1100 mg/l), 4-ethylfenolu (0 až 1100 mg/l), tyrosolu (0 až 230 mg/l) a tryptofolu (0 až 120 mg/l). Všechny látky, včetně interního standardu, vykazovaly lineární odezvu v celém koncentračním intervalu. Korelační koeficienty stanovené pomocí statistického softwaru ADSTAT byly následující: guajakol 0,998, 2-fenylethanol 0,999, 4-ethylfenol 0,999, tyrosol 0,997 a tryptofol 0,999.

Volba elučního činidla

Volba elučního činidla byla provedena na kolonce SEPARCOL SI C18 (500 mg), kdy byla vzájemně porovnávána eluční rozpouštědla diethylether, acetonitril a ethylacetát. Pro lepší přehlednost je na obrázcích 1 až 4 použito jednotné označení analytů:

1 – guajakol, 2 – 2-fenylethanol, 3 – 4-ethylfenol, 4 – tyrosol, 5 – tryptofol. U všech stanovených látek, včetně interního standardu, byla vypočítána výtěžnost metodou vnějšího standardu jako podíl rozdílu výsledků získaných u obohaceného a slepého vzorku piva ke skutečné hodnotě přídávku. Na obr. 1 je znázorněn výsledek porovnání výtěžnosti jednotlivých látek v závislosti na použitém elučním činidle. Za modelový roztok posloužil 4 % roztok ethanolu. S ohledem na dosaženou výtěžnost a netoxičnost ethylacetátu byla tato látka vybrána za eluční činidlo pro stanovení vyšších aromatických alkoholů. Pracovní postup byl následující: Do kádinky bylo napipetováno 10 ml modelového roztoku, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 8,5

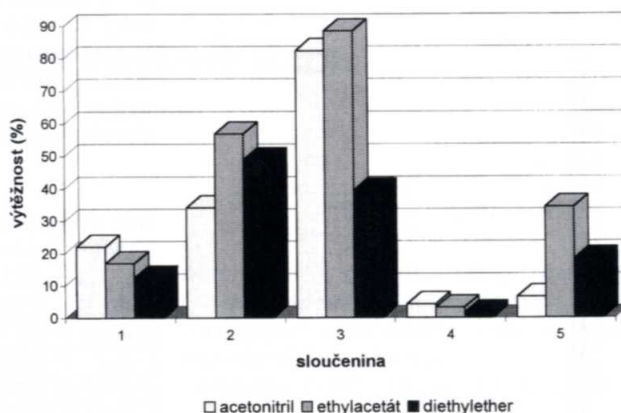
hydroxidem sodným ($c = 10$ mol/l) a bylo přidáno 0,5 ml vnitřního standardu (4-ethylfenol, $c = 205,93$ mg/l v ethanolu 96 % obj.). Směs byla převedena na kolonku, která byla předtím kondicionována 2 ml methanolu a poté 2 ml vody ($pH = 8,5$, upravené 0,01 mol/l hydroxidem sodným). Průtok bylo možno urychlit působením vakua. Po průchodu vzorku byla kolonka promyta opět 2 ml vody ($pH = 8,5$) a vysušena mírným proudem dusíku. Jakmile náplň viditelně zesvětlala (znak dokonalého vysušení), následovala eluce 2 ml rozpouštědla. Obsah byl konečně zakonzentrován proudem dusíku na objem 150–300 μ l a mikrostříkačkou byl změřen jeho přesný objem. Koncentrát byl následně uzavřen do ampulky. Na chromatografickou kolonu bylo nástřikováno 1,5 μ l vzorku a chromatogram byl vyhodnocen metodou vnějšího standardu. Takto byly získány údaje o koncentraci všech látek (včetně interního standardu) ve slepém vzorku.

Volba vhodných extrakčních kolon

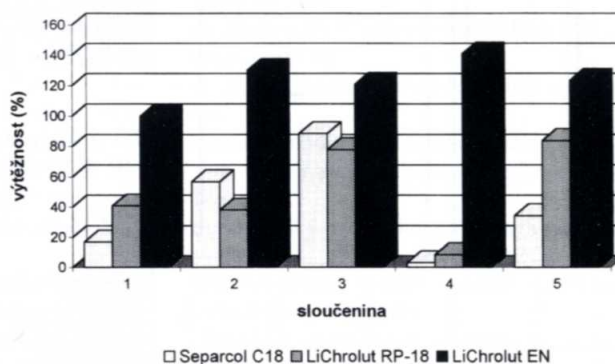
Po zvolení ethylacetátu za nejvhodnější eluční činidlo bylo nutné vybrat vhodnou extrakční kolonku.

K dispozici byly následující typy kolonek:

- Separcol SI C18
- LiChrolut RP-18
- LiChrolut EN



Obr. 1 Dosažené výtěžnosti vyšších alkoholů v závislosti na zvoleném elučním činidle



Obr. 2 Dosažené výtěžnosti vyšších alkoholů v závislosti na typu kolonky

Tab. 2 Průměrné hodnoty, směrodatné odchylky, variační koeficienty a intervaly spolehlivosti pro jednotlivé látky při opakovaném měření.

látky	průměrná hodnota (mg/l)	směrodatná odchylka s_{95} (mg/l)	variační koeficient CV_r	interval spolehlivosti (mg/l)
guajakol	6,63	0,98	0,147	5,42–7,84
2-fenylethanol	39,83	2,24	0,059	36,9–42,7
4-ethylfenol	19,86	1,73	0,087	17,7–22,0
tyrosol	3,63	0,32	0,089	3,23–4,04
tryptofol	12,16	1,03	0,084	10,88–13,43

Způsob provedení extrakce i vyhodnocení získaných výsledků byl shodný s předšlým. Měněny byly pouze jednotlivé kolonky. Eluční činidlo bylo použito vždy stejné, tj. ethylacetát.

Dosažené výtěžnosti na jednotlivých kolonkách jsou uvedeny na obr. 2.

Zjištění výtěžnosti, opakovatelnosti, meze detekce a meze stanovení u reálných vzorků pív

Opakovatelnost metody byla ověřena pro jednotlivé analyty analýzou pěti shodných vzorků pív fortifikovaných známým přídatkem standardu.

Pracovní postup byl následující: Vzorek piva byl zfiltrován přes skládaný filtrační papír s přídatkem křemeliny a odplyněn sonifikací na ultrazvukové lázni. Další postup byl totožný s výše uvedeným postupem.

Získané výsledky jsou uvedeny v tab. 2.

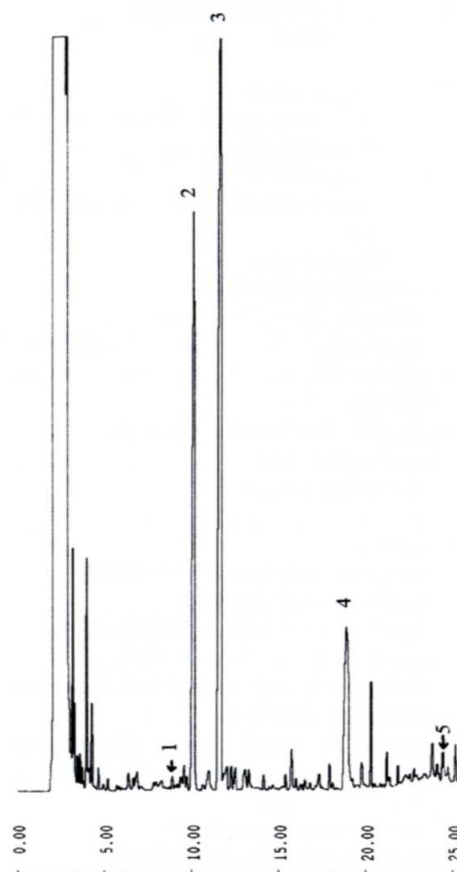
Chromatogramy standardů a reálného vzorku piva jsou uvedeny na obr. 3 a 4.

Výtěžnost metody byla u reálných vzorků pív stanovena postupem obdobným jako v případě volby vhodného elučního činidla. U slepého vzorku bylo pouze nutné změřit objem konečného koncentráту tak, aby bylo možné spočítat koncentraci jednotlivých látek. Kromě metody vnitřního standardu byly hodnoty stanoveny též metodou standardu vnějšího. Vypočtené výtěžnosti z výsledků získaných pomocí vnějšího i vnitřního standardu jsou uvedeny v tab. 3. U všech vzorků bylo použito jako původní matrice 12 % pivo.

Meze detekce a meze stanovení v pivu a koncentráту byly vypočteny z chromatogramu standardu jako troj- a desetinásobek šumu. Hodnoty jsou uvedeny v tab. 4.

4. ZÁVĚR

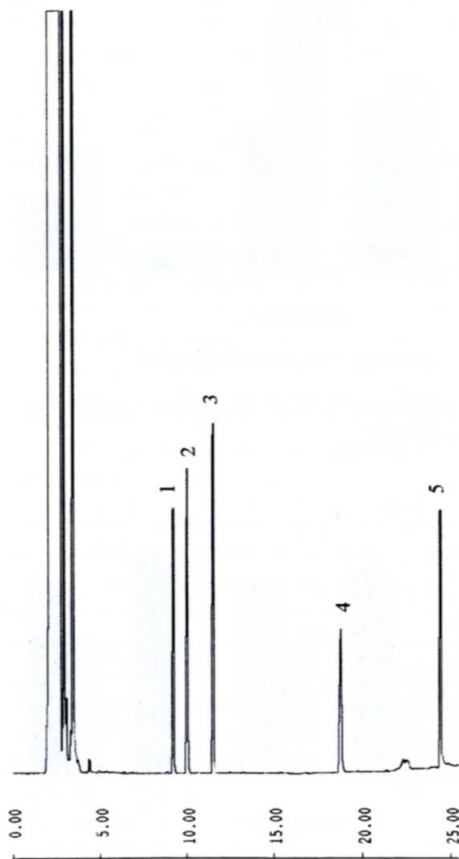
V rámci práce zabývající se studiem úlohy kvasničného kmene při vzniku senzoryckých aktivních vyšších alkoholů v pívě byla vypracována a validována metoda umožňující, na rozdíl od metod dříve publikovaných, současné kvantitativní stanovení čtyř jejich hlavních představitelů, tj. guajakolu, 2-fe-



Obr. 4 Chromatogram reálného vzorku 12% světlého ležáku

nylethanolu, tyrosolu a tryptofolu v mladině a pívě.

Odezva detektoru byla u všech stanovených látek v celém koncentračním rozsahu



Obr. 3 Chromatogram směsi standardů (konc. 150 mg/l)

Tab. 3 Výtěžnost metody jednotlivých látek (vyhodnoceno pomocí metody externího a interního standardu)

číslo měření	guajakol		2-fenylethanol		4-ethylfenol		tyrosol		tryptofol	
	ES	IS	ES	IS	ES	IS	ES	IS	ES	IS
1	47,6	54,5	37,7	69,8	93,5	100	11,3	10,6	95,0	108,3
2	34,9	47,9	35,6	65,9	70,5	100	6,0	9,3	74,5	102,0
3	39,3	53,4	29,3	54,9	71,3	100	8,4	12,4	82,0	111,7
4	46,7	57,3	64,7	66,6	84,2	100	10,2	11,4	84,7	105,6
5	35,4	49,5	22,7	55,6	68,2	100	7,1	11,5	82,8	107,8
průměrná hodnota	40,8	52,5	38,0	62,6	77,5	100	8,6	11,0	83,8	107,1
směrodat. odch. s_{95}	6,1	3,8	16	6,8	10,9	0	2,2	1,2	7,4	3,6

Tab. 4 Meze detekce a meze stanovení jednotlivých látek v koncentráту (0,25 ml extraktu z 10 ml piva) a v pívě

látky	koncentrát (mg/l)		pivo (mg/l)	
	mez detekce	mez stanovení	mez detekce	mez stanovení
guajakol	53	177	1,3	4,4
2-fenylethanol	41	136	1,0	3,4
4-ethylfenol	38	127	0,9	3,2
tyrosol	88	294	2,2	7,4
tryptofol	76	254	1,9	6,4

lineární, což umožnilo použít jednobodovou kalibraci. Koncentrační rozsah byl zvolen tak, aby postihl celou oblast, ve které se mohou stanovené složky vyskytovat jak během kvašení, tak i v hotovém pivu.

Vyšší aromatické alkoholy byly z piva izolovány extrakcí na pevné fázi. S ohledem na dosažené eluční vlastnosti, netoxičnost a snadnou manipulovatelnost byl za eluční činidlo vybrán ethylacetát.

Volba kolonky LiChrolut RP-18 byla výsledkem kompromisu, neboť tato kolonka vykazovala z porovnávaných kolonek druhou nejvyšší výtěžnost. Byla však cenově dostupnější než kolonka LiChrolut EN. Z čistě analytického hlediska vykazovala kolonka LiChrolut EN bezesporu nejlepší výsledky.

Intervaly spolehlivosti se na 95 % hladině spolehlivosti u jednotlivých vyšších alkoholů pohybovaly v rozmezí:

guajakol 5,42–7,84 mg/l, 2-fenylethanol 36,9–42,7 mg/l, 4-ethylfenol 17,7–22,0 mg/l, tyrosol 3,23–4,04 mg/l a tryptofol 10,88–13,43 mg/l.

Výtěžnost navržené metody dosahovala u jednotlivých látek následujících hodnot: guajakol 40,8 %, 2-fenylethanol 38,0 %, 4-ethylfenol 77,5 %, tyrosol 8,6 % a tryptofol 83,8 %.

Pro všech pět látek byla stanovena mez detekce a mez stanovení, a to jak v pivu, tak i v koncentrátu připraveném extrakcí z 10 ml vzorku piva. Dosažené hodnoty umožňují stanovit výše uvedené látky, s výjimkou ty-

rosolu, s dostatečnou citlivostí a přesností. Pokud bychom však použili k extrakci kolonku LiChrolut EN, odpadlo by i toto omezení.

Kolísání výsledků vlivem náhodných chyb, způsobených např. nehomogenitou náplně extrakčních kolonek, lze předejít využitím metody vnitřního standardu.

I přes určité nedostatky, zejména nižší dosaženou výtěžnost u tyrosolu, lze výše popsanou metodu použít v běžné pivovarské praxi.

LITERATURA

- [1] DREWS, B., SPECHT, H., SCHWARTZ, E.: Brauwissenschaft **18**, 1965, s. 240; **19**, 1966, s. 76.
- [2] MILLON, E. C. R.: Acad.Sci.Paris **28**, 1940.
- [3] KAPPELLER-ADLER, R.: Biochem. Z. **185**, 1932, s. 252.
- [4] McFARLANE, W. D., THOMPSON, K. D.: J.Inst. Brew. **70**, 1964, s. 497.
- [5] KOZÁKOVÁ-POLEDNÍKOVÁ, M.: Diplomová práce, VŠCHT Praha 1969.
- [6] STEVENS, R.: J. Inst. Brew. **67**, 1961, s. 329.
- [7] NYKANEN, L., PUPUTTI, E., SOUMALAINEN, H.: J. Inst. Brew. **24**, 1966, s. 72.
- [8] KIENINGER, H., BOECK, D.: Brauwissenschaft **30**, 1977, s. 357.
- [9] GOHEE, Y., ALARY, J.: Spectra 2000 **10**, 1985, s. 33.
- [10] ALVAREZ, P., et al.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **52**, 1994, s. 127.
- [11] STENROOS, L. E., SIEBERT, K. J., MIELGARD, M. C.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **4**, 1976, s. 34.
- [12] SZLAVKO, C. M.: J. Inst. Brew. **79**, 1973, s. 283.
- [13] SZLAVKO, C. M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **34**, 1976, s. 59.
- [14] TRESSL, R., KOSSA, T., RENNER, R.: Proc. Eur. Brew. Conv., 1975, s. 737.
- [15] SAEGUSSA, K., et al.: Biomed. Chrom. **7**, 1993, s. 172.
- [16] DONHAUSER, S., et al.: Mschr. Brauwiss. **2**, 1989, s. 88.
- [17] MANGAS, J. J., et al.: Chromatografia **42**, 1996, s. 101.
- [18] WADA, K., SHIBAMOTO, T.: J. Agric. Food Chem. **45**, 1997, s. 4362.
- [19] MILLS, M. H., et al.: J. Chrom. Biomed. Appl. **50**, 1986, s. 250.
- [20] RAYNAUD, F., PEVET, P.: J. Chrom. Biomed. Appl. **102**, 1991, s. 103.
- [21] CHIN, J. L.: J. Chrom. Biomed. Appl. **72**, 1993, s. 206.
- [22] TSIMIDOU, M., PAPADOPOULOS, G., BOSKOU, D.: Food Chem. **44**, 1992, s. 53.
- [23] AKASBI, M., SHOEMAN, D. W., CSALLANY, A. S.: J. Am. Oil Chem. Soc. **70**, 1993, s. 367.

Lektoroval Ing. Pavel Dostálek, CSc.
Do redakce došlo 16. 11. 1998