

POROVNANIE OBSAHU PRCHAVÝCH SÍRNYCH ZLÚČENÍN V SLOVENSKÝCH PIVÁCH METÓDOU SPME

COMPARISON OF THE CONTENT OF VOLATILE SULPHUR-CONTAINING COMPOUNDS IN SLOVAK BEERS BY THE SPME METHOD

MARTIN ŠULÁK¹, DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ¹, ERICH LEITNER²

¹Oddelenie biochemickej technológie, ÚBP, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika / *Department of Biochemical Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, the Slovak Republic*; e-mail: daniela.smogrovicova@stuba.sk

²Institut für Lebensmittelchemie und -technologie, Technische Universität Graz, Petersgasse 12/II, 8010 Graz, Austria

Šulák, M. – Šmogrovičová, D. – Leitner, E.: Porovnanie obsahu prchavých sírnych zlúčenín v slovenských pivách metódou SPME. *Kvasny Prum.* 54, 2008, č. 3, s. 70–74.

Práca porovnáva obsah prchavých sírnych zlúčenín v slovenských pivách. Sú to látky s výraznou senzoricou charakteristikou a nízkym prahom detekcie, preto môžu arómu piva ovplyvniť negatívne už v stopových množstvách. V pive bolo identifikované veľké množstvo týchto látok, medzi najvýznamnejšie patria dimetylsulfid, dimetyldisulfid, dimetyltrisulfid, etántiol, etyltioacetát, metántiol, metionol, metyltioacetát, 3-metyltiopropylacetát a sírouhlík.

V prvom kroku sa optimalizovali podmienky adsorpcie na SPME vlákno – teplota adsorpcie, čas adsorpcie, objem vzorky a prídavok solí, následne sa merala obsah prchavých sírnych zlúčenín v pive plynovou chromatografiou s plameňovým fotometrickým detektorom (GC-FPD) po mikroextrakcii na tuhú fázu (SPME). Boli použité dva vnútorné štandardy – etylmetylsulfid a 1-propyltioacetát. Zistili sa rozdiely v zastúpení jednotlivých zlúčenín v pivách rôznych značiek aj rozdiely medzi pivami s rôznou stupňovitosťou.

Šulák, M. – Šmogrovičová, D. – Leitner, E.: Comparison of the content of volatile sulphur-containing compounds in Slovak beers by the SPME method. *Kvasny Prum.* 54, 2008, No. 3, p. 70–74.

A comparison of volatile sulphur-containing compounds in Slovak beers was performed. These compounds, due to their low sensory threshold, and powerful and often unpleasant characteristics, can cause off-odours even in trace amounts. A wide variety of sulphur compounds were identified in the beers; the most important ones include dimethyl sulphide, dimethyl disulphide, dimethyl trisulphide, ethanethiol, ethyl thioacetate, methanethiol, methionol, methyl thioacetate, 3-methylthio propylacetate and carbon disulphide.

In the first step, adsorption conditions, such as temperature, time, sample volume and addition of salts, were optimised. The content of volatile sulphur-containing compounds was measured using headspace solid-phase micro-extraction (SPME) coupled with gas chromatography and flame photometric detection (GC-FPD). Two internal standards were used – ethyl methyl sulphide and 1-propyl thioacetate. Differences in the profiles of individual compounds in different beer brands as well as differences in the amounts of sulphur-containing compounds in beers with different gravity were found.

Šulák, M. – Šmogrovičová, D. – Leitner, E.: Der Gehaltsvergleich von flüchtigen schwefelhaltigen Stoffen in den slowakischen Bieren durch die SPME Methode. *Kvasny Prum.* 54, 2008, Nr. 3, S. 70–74.

Im Artikel wird der Vergleich vom Gehalt von flüchtigen schwefelhaltigen Stoffen in den slowakischen Bieren beschrieben. Es handelt sich um die Stoffe mit einer ausdrückvollen sensorischen Charakteristik und einer niedrigen Detektionsschwelle, die auch in einer Spurmengen negativ das Bier beeinflussen können.

Im Bier wurde eine grosse Anzahl an diesen Stoffen identifiziert, unter den bedeutendsten gehören die folgende Stoffe: Dimethylsulfid, Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid, Äthantio, Äthyltioazetat, Methantio, Methionol, Methyltioazetat, 3-Methyltioazetat und Kohlendisulfid. Zuerst wurden die Adsorptionsbedingungen an die SPME Faser – Adsorbtionstemperatur, -zeit, Mustervolumen und Salzzugabe optimiert, danach wurde der Gehalt an flüchtigen schwefelhaltigen Stoffen im Bier durch die Gaschromatografie mit einem flammenphotometrischen Detektor (GC-FPD) nach der Mikroextraktion an der festen Phase (SPME) gemessen. Zum Messvorgang wurden zwei Innenstandards – Ethylmethylsulfid a 1-Propyltioazetat angewandt. Es wurden die Unterschiede in Anwesenheit von verschiedenen Einzelstoffen im Bier in Abhängigkeit an der Stammwürze und Biersorte festgestellt.

Шулак, М. – Шмогровицова, Д. – Лейтнер, Э.: Сравнение содержания летучих серных соединений методом SPME в словацких пивах. *Kvasny Prum.* 54, 2008, No. 3, стр. 70–74.

Статья занимается сравнением содержания летучих серных соединений в словацких пивах. Выделяются яркой сенсорической характеристикой и низким порогом детектирования, и для того могут отрицательно повлиять на букет пива уже в рассеянных количествах. В пиве идентифицировано большое количество этих веществ. Самыми значительными являются диметилсульфид, диметилдисульфид, диметилтрисульфид, этантиол, этилтиоацетат, метантиол, метионол, метилтиоацетат, 3-метилтиопропылацетат и сероуглерод.

В первом шагу оптимизировались условия адсорпции на SPME волокно – температура и период адсорпции, объём пробы и прибавка солей. Следом обмеривалось содержание летучих серных соединений в пиве газовой хроматографией с огневым фотометрическим детектором (GC-FPD) после микроэкстракции на твердой фазе (SPME). Использованы два внутренние стандарта – этилметилсульфид и 1-пропилтиоацетат. Были определены отличия в замещении отдельных соединений в пивах разных марок и отличия между различно крепкими пивами.

Kľúčové slová: pivo, sírne zlúčeniny, mikroextrakcia na tuhú fázu, GC, FPD

Key words: beer, sulphur-containing compounds, solid-phase micro-extraction, GC, FPD

1 ÚVOD

Pivo je komplexná zmes, v ktorej bolo doposiaľ identifikovaných viac ako 620 prchavých látok. Spomedzi nich sa na tvorbe arómy vý-

1 INTRODUCTION

Beer is a complex mixture, in which more than 620 volatile compounds have been identified so far. From them, also sulphur-contain-

znamne podieľajú aj zlúčeniny s obsahom síry. Ich výrazné senzorycké charakteristiky a nízky prah detekcie však môžu na konzumentov vplývať aj značne negatívne už v stopových množstvách [1]. Vzhľadom na princíp funkcie čuchového ústrojenstva je vnímanie vôní značne individuálne a čuchový vnem pre konkrétnu látku sa môže meniť aj v závislosti od jej koncentrácie. Kým v stopových koncentráciách sú niektoré z týchto látok žiaduce pre typickú arómu, zvýšením ich koncentrácie môže dôjsť až k výrazne negatívne ovplyvneniu celkovej arómy [2].

Hoci v pive bolo identifikovaných veľa prchavých zlúčenín s obsahom síry, väčšina z nich sa vyskytuje len v stopových množstvách. Medzi hlavné sírne komponenty piva patrí dimetylsulfid (DMS) a 3-metyltiopropánol (metionol) [1, 3]. Zdroje sírnych látok pre tvorbu prchavých sírnych zlúčenín pochádzajú zo sladu a chmeľu. Väčšina senzoryckých sírnych zlúčenín neprechádza do piva priamo zo surovín, ale vzniká v priebehu fermentačného procesu, kedy bunky kvasiniek metabolickými premenami tvoria z neprchavých sírnych látok prchavé [1]. Niektoré však prechádzajú do piva priamo z chmeľu, iné vznikajú aj chemickými premenami v procese starnutia piva [3, 4]. Ešte stále nie sú celkom známe mechanizmy syntézy všetkých týchto látok, no je známe, že ich tvorba je v priebehu fermentácie ovplyvnená množstvom faktorov, ako sú vlastnosti kvasničného kmeňa, nedostatok živín, kationy kovov, redoxný potenciál a teplota fermentácie [4].

Vzhľadom na nízky obsah prchavých sírnych zlúčenín v pive je potrebné pred vlastnou chromatografickou analýzou tieto látky vo vzorke zakoncentrovať. Klasickou metódou je extrakcia do nepolárneho rozpúšťadla alebo statická *headspace* extrakcia, no tieto metódy majú viaceré negatíva a obmedzenia, ako je časová náročnosť, škodlivý vplyv rozpúšťadiel a nedostatočná citlivosť. Na niektoré extrémne prchavé zlúčeniny sú tieto metódy dokonca nepoužiteľné. Alternatívnou, relatívne novou prekoncentračnou metódou je mikroextrakcia na tuhú fázu (SPME – Solid-Phase Micro-Extraction). Pri použití tejto techniky sa prchavé zlúčeniny adsorbujú na povrch tenkého vlákna s nanosenou vrstvou aktívnej adsorpčnej látky. Následne sa vlákno desorbuje v injektore plynového chromatografu a vzorka sa štandardne analyzuje. Aj po zakoncentrovaní je však obsah sírnych zlúčenín vo vzorke veľmi nízky, preto sa na detekciu týchto látok po separácii používajú selektívne detektory, ako je plameňovo-fotometrický detektor (FPD – Flame Photometric Detector), chemiluminiscenčný detektor (SCD – Sulphur Chemiluminescent Detector), resp. inovovaná verzia FPD, pulzný plameňovo-fotometrický detektor (PFPD – Pulsed Flame Photometric Detector), ktorý vykazuje veľmi vysokú citlivosť na sírne zlúčeniny [4].

Cieľom práce bolo optimalizovať metódu pre meranie profilu sírnych látok v pive a porovnať obsah prchavých sírnych látok v pivách slovenskej proveniencie. Sledovala sa závislosť odozvy detektora od použitého objemu vzorky, teploty a času extrakcie, procesu úpravy vzorky pred analýzou a prídavku anorganických solí do vzorky.

2 MATERIÁL A METÓDY

2.1 Vzorky

Na analýzu bolo použitých 12 vzoriek výčapných pív a 11 ležiakov pochádzajúcich z ôsmich slovenských pivovarov. Vzorky boli zakúpené v obchodnej sieti.

2.2 SPME

Na extrakciu sírnych zlúčenín z *headspace* priestoru sa použilo SPME vlákno 50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS Stableflex (57348-4) od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA), GC bol vybavený modifikovaným autosamplerom Combi PAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) umožňujúcim prácu v móde SPME.

2.3 Chromatografia

Analýzy prebiehali na prístroji Agilent 6890A vybavenom plameňovým fotometrickým detektorom v móde pre selektívnu detekciu sírnych látok (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s nasledovným prietokom plynov do detektora: vodík 50 ml/min, vzduch 60 ml/min, dusík 60 ml/min. Kapilárna chromatografická kolóna Varian (CP 8946) FactorFour VF-5MS 30 m X 0,25 mm ID DF=1,0 (Varian, Darmstadt, Germany).

2.4 Príprava vzorky

Vzorky piva boli pred analýzou vychladené v chladničke na teplotu 4 °C, aby sa zamedzilo úniku prchavých frakcií [5]. Po otvorení bolo pipetovaných 6 ml vzorky do sklenej vzorkovnice na lisovateľný uzá-

ning compounds significantly contribute to the aroma formation. But their distinctive sensory characteristics and a low detection threshold can also have considerably negative effects on consumers even in trace amounts [1]. With respect to the principle of the olfactory system, the perception of aroma is very individual and the olfactory perception for the compound in question can also vary depending on its concentration. In trace amounts, some of these compounds are desirable for the typical aroma, but when being present in higher concentrations, they can adversely influence the overall aroma [2].

Even though a great number of highly volatile sulphur-containing compounds has been identified in beer, most of them occur in trace amounts only. The major sulphur-containing compounds include dimethyl sulphide (DMS) and 3-methyl thiopropanol (methionol) [1, 3]. The sources of sulphur-containing compounds for the formation of volatile sulphur-containing compounds originate from malt and hops. Most of active sulphur-containing compounds influencing the sensory system do not pass into beer directly from the raw materials, but they are formed during the fermentation process, when the yeast cells provide volatile sulphur-containing compounds from non-volatile ones by metabolic transformations [1]. But some of them do pass into beer directly from hops; some are also formed by chemical changes in the process of beer ageing [3, 4]. The mechanisms of the syntheses of all these compounds are not known completely yet, but it is known that their formation is influenced during the fermentation process by a number of factors such as the yeast strain used, lack of nutrients, metal cations, oxidation-reduction potential and fermentation temperature [4].

Because of a low content of volatile sulphur-containing compounds in beer, it is necessary to increase their concentration in the beer sample before performing the chromatographic analysis. A conventional method is extraction into a non-polar solvent or static headspace extraction, but these methods have some shortcomings and limitations such as time intensity, adverse effect of solvents and insufficient sensitivity. For some extremely volatile sulphur-containing compounds, these methods are even inapplicable. An alternative is a relatively new pre-concentration method called Solid-Phase Micro-Extraction (SPME). When using this method, volatile compounds are adsorbed on the surface of a thin fibre with applied layer of an active adsorption compound. The fibre is then desorbed in the injector of the gas chromatograph and the sample is analysed in a standard way. Even after increasing the concentration of the sulphur-containing compounds by the above-mentioned procedure, their content in the sample is still very low and therefore, selective detectors are used for the detection of these compounds after being separated (FPD – Flame Photometric Detector, SCD – Sulphur Chemiluminescent Detector or its innovated FPD version and PFPD – Pulsed Flame Photometric Detector, showing very high sensitivity for sulphur-containing compounds) [4].

The aim of this work was to optimise the method for the measurement of the profile of the sulphur-containing compounds in beer and to compare the content of the volatile sulphur-containing compounds in the beers of Slovak provenience. The dependence of the detector response on the sample volume used, temperature and time of extraction, process of preparation of the sample before analysis and addition of salts into the sample was analysed.

2 MATERIALS AND METHODS USED

2.1 Samples

12 samples of draft beers and 11 lager beers from eight Slovak breweries were used for the analysis. The samples were bought in the trade network.

2.2 SPME

For extracting sulphur-containing compounds from the headspace, the SPME fibre 50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS Stableflex (57348-4) from company Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used, the gas chromatograph (GC) was equipped with a modified autosampler Combi PAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) allowing to work in the SPME mode.

2.3 Chromatography

Analyses were performed on the Agilent 6890A gas chromatograph equipped with a flame photometric detector in the mode for the selective detection of sulphur-containing compounds (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with subsequent flow of gases into the detector: hydrogen 50 ml/min, air 60 ml/min, nitrogen 60 ml/min. Ca-

ver s objemom 20 ml obsahujúcej 0,6 g NaCl a sklené magnetické miešadlo. Pred zatvorením vzorkovnice uzáverom s PTFE septom sa ku každej vzorke pridalo 10 μ l roztoku vnútorného štandardu s obsahom etylmetylsulfidu (EMS) a 1-propyltioacetátu (PrSAc) v etanole (50 % v/v) s takou koncentráciou, aby bol výsledný obsah EMS vo vzorke 20 μ g/l a PrSAc 5 μ g/l [1].

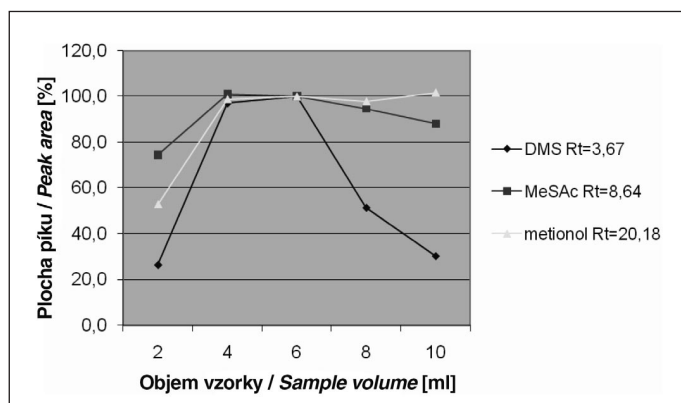
2.5 Extrakcia a separácia

Pred vlastnou extrakciou boli vzorky počas miešania 5 minút temperované na teplotu extrakcie. Extrahovalo sa z priestoru nad miešanou vzorkou a následne desorbovalo 10 minút v injektore plynového chromatografu v *splitless* móde pri 270 °C. Ako nosný plyn bolo použité hélium s prietokom 1,8 ml/min. Pre začiatok teplotného programu separácie bola zvolená teplota 35 °C, pri ktorej sa zotrvalo 2 min, nasledoval prechod na 90 °C rýchlosťou 5 °C/min, 2 min pri 90 °C, ďalej prechod na 110 °C rýchlosťou 5 °C/min, 2 min pri 110 °C a napokon prechod rýchlosťou 25 °C/min na teplotu 280 °C a 3 min pri 280 °C.

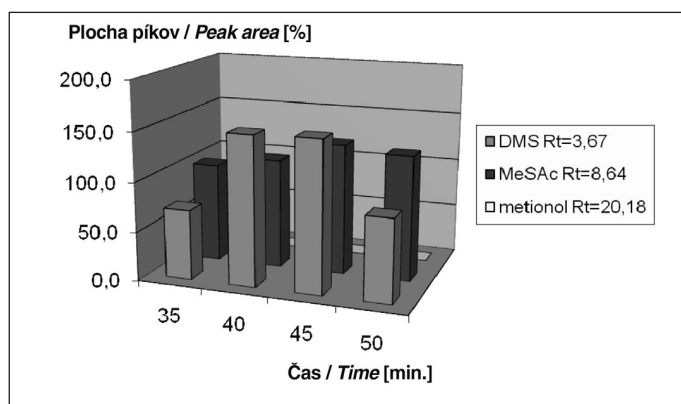
3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Meraním vzoriek piva pri rôznych podmienkach a analýzou získaných údajov sa zvolila optimálna teplota, objem vzorky a prídavok NaCl pre stanovenie prchavých sírnych zlúčenín v pive. Ako vyplýva z obr. 1, optimálny objem vzorky pri použití 20 ml vzorkovnice je 5–6 ml. Preto sa v ďalšej sérii experimentov pracovalo s objemom vzorky 6 ml.

Zo série grafov na obr. 2a–2d je zrejmé, že so zvyšujúcou sa teplotou a časom extrakcie sa zvyšuje efektívnosť extrakcie látok s vyšším bodom varu, ako sú 3-metyltiopropanol a 3-metyltiopropylacetát, na úkor prchavejších látok – metánliol, dimetylsulfid.



Obr. 1 / Fig. 1 Závislosť plochy píkov od objemu vzorky pre látky s rôznym retenčným časom. Podmienky extrakcie: 40 min pri 40 °C. Hodnoty pre 6 ml zodpovedajú 100 %. / Dependence of peak area on sample volume for compounds with different retention times. Extraction conditions: 40 minutes at 40 °C. Values for 6 ml correspond to 100 %.



Obr. 2a / Fig. 2a Závislosť plochy píkov od času extrakcie pri 35 °C pre objem vzorky 6 ml. 100 % predstavujú hodnoty namerané po extrakcii 45 minút pri 40 °C. / Dependence of peak area on extraction time at 35 °C for sample volume of 6 ml. 100 % represent the values measured for the extraction for 45 minutes at 40 °C.

pillary chromatographic column Varian (CP 8946) FactorFour VF-5MS 30 m X 0.25 mm ID DF=1.0 (Varian, Darmstadt, Germany).

2.4 Sample preparation

Before the analysis, beer samples were cooled down in a refrigerator to 4 °C to avoid volatile fractions to escape [5]. After opening the samples 6 ml of the sample were pipetted into a glass sampler with a pressable closure with a volume of 20 ml containing 0.6 g of NaCl and a glass magnetic stirrer. Before closing the sampler with a closure with PTFE septum, the samples were added 10 μ l of the internal standard solution containing ethyl methyl sulphide (EMS) and 1-propyl thioacetate (PrSAc) in ethanol (50 % v/v) with such a concentration so that the final content of EMS in the sample was 20 μ g/l and the content of PrSAc was 5 μ g/l [1].

2.5 Extraction and separation

Before extraction, the samples were stirred and tempered for 5 minutes to the temperature of extraction. The extraction was performed from the space above the stirred sample, followed by desorption for 10 minutes in the injector of the gas chromatograph in the splitless mode at 270 °C. Helium as the carrier gas with a flow rate of 1.8 ml/min was used. For the beginning of the temperature program of separation, the temperature of 35 °C for 2 minutes was selected, then the sample was warmed to 90 °C at a rate of 5 °C/min, with a rest time of 2 minutes at 90 °C, the sample was further warmed to 110 °C at a rate of 5 °C/min, with a rest time of 2 minutes at 110 °C and finally, the sample was warmed to 280 °C at a rate of 25 °C/min with a rest time of 3 minutes.

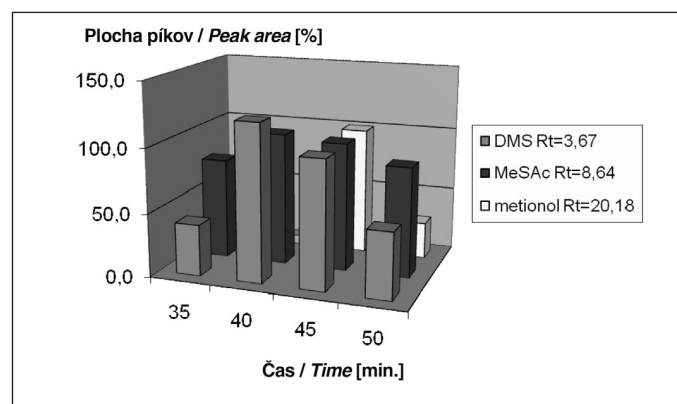
3 RESULTS AND DISCUSSION

Based on the measurement of the beer samples under various conditions and the analysis of the gained data, optimum temperature, sample volume and NaCl addition were chosen for the determination of the volatile sulphur-containing compounds in beers. As it can be seen from Fig. 1, the optimum sample volume, when using a 20 ml sampler, is 5 to 6 ml. Therefore, the sample volume of 6 ml was used in the following series of experiments.

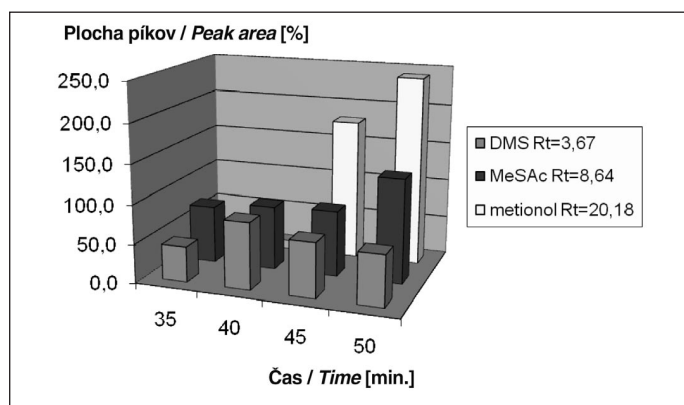
It is obvious from the series of graphs on Fig. 2a to 2d that the efficiency of the extraction of the compounds with a higher boiling point increases with growing temperature and time (3-methyl thio-propanol and 3-methyl thiopropyl acetate), unlike more volatile compounds such as methanethiol and dimethyl sulphide.

Further to this, the effect of sample preparation on determination was studied. The beer samples, from which carbon dioxide was removed by ultrasound, provided comparable results similar to the non-treated samples, but the reproducibility proved to be higher in case of the non-treated samples.

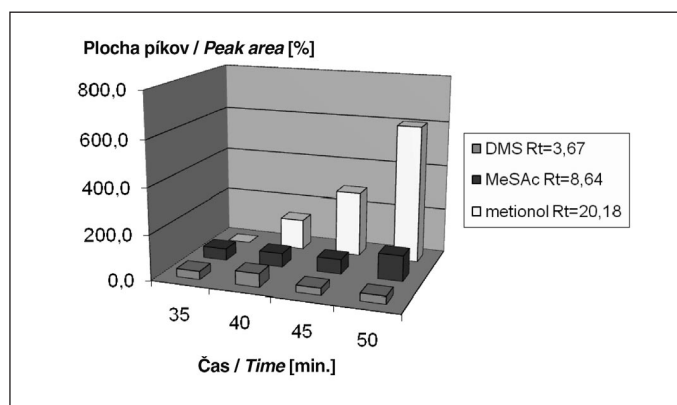
The addition of inorganic salts decreases the boiling point of the compounds in the sample, which in some cases increases the efficiency of extraction. For this reason, the addition of 10 % of NaCl or Na₂SO₄ to the sample was tested. The addition of salts significantly increases the amount of the compounds with a higher boiling point, which are adsorbed on the SPME fibre under same conditions of ex-



Obr. 2b / Fig. 2b Závislosť plochy píkov od času extrakcie pri 40 °C pre objem vzorky 6 ml. 100 % predstavujú hodnoty namerané po extrakcii 45 minút pri 40 °C. / Dependence of peak area on extraction time at 40 °C for sample volume of 6 ml. 100 % represent the values measured for the extraction for 45 minutes at 40 °C.



Obr. 2c / Fig. 2c Závislosť plochy píkov od času extrakcie pri 45 °C pre objem vzorky 6 ml. 100 % predstavujú hodnoty namerané po extrakcii 45 minút pri 40 °C. / Dependence of peak area on extraction time at 45 °C for sample volume of 6 ml. 100 % represent the values measured for the extraction for 45 minutes at 40 °C.



Obr. 2d / Fig. 2d Závislosť plochy píkov od času extrakcie pri 50 °C pre objem vzorky 6 ml. 100 % predstavujú hodnoty namerané po extrakcii 45 minút pri 40 °C. / Dependence of peak area on extraction time at 50 °C for sample volume of 6 ml. 100 % represent the values measured for the extraction for 45 minutes at 40 °C.

Ďalej sa sledoval vplyv úpravy vzorky na stanovenie. Vzorky piva, v ktorých bol oxid uhličitý odstránený účinkom ultrazvuku, poskytovali porovnateľné výsledky ako vzorky neupravené, avšak reprodukovateľnosť sa ukázala byť vyššia pri vzorkách bez úpravy.

Prídavok anorganických solí znižuje bod varu látok vo vzorke, čo v niektorých prípadoch zvyšuje efektivitu extrakcie. Z tohto dôvodu bol testovaný prídavok 10 % NaCl alebo Na₂SO₄ k vzorke. Prídavok solí významne zvyšuje množstvo látok s vyšším bodom varu, ktoré sa adsorbujú na SPME vlákno pri rovnakých podmienkach extrakcie ako bez prídavku soli. NaCl sa v tomto smere ukázal byť efektívnejší ako Na₂SO₄.

Na základe výsledkov meraní sa zistilo, že optimálne podmienky času a teploty extrakcie sú 40 minút pri 40 °C, resp. 30 minút pri 45 °C, avšak s prídavkom NaCl, ktorý výrazne zvyšuje množstvo extrahovaných látok na SPME vlákno. Z hľadiska efektívneho využitia prístroja je vhodnejšie použiť časovo menej náročný variant, pretože čas analýzy je takisto 30 minút. Preto boli pre SPME extrakciu pri použití vzorkovník s objemom 20 ml zvolené nasledovné podmienky: objem vzorky: 6 ml, teplota extrakcie: 45 °C, čas extrakcie: 30 minút, prídavok NaCl: 0,6 g.

Obr. 3 znázorňuje typický FPD chromatogram SPME vzorky piva. Vyskytujú sa tam píky všetkých bežných sírnych zlúčenín obsiahnutých v pive a píky vnútorných štandardov etylmetylsulfidu a propyltioacetátu.

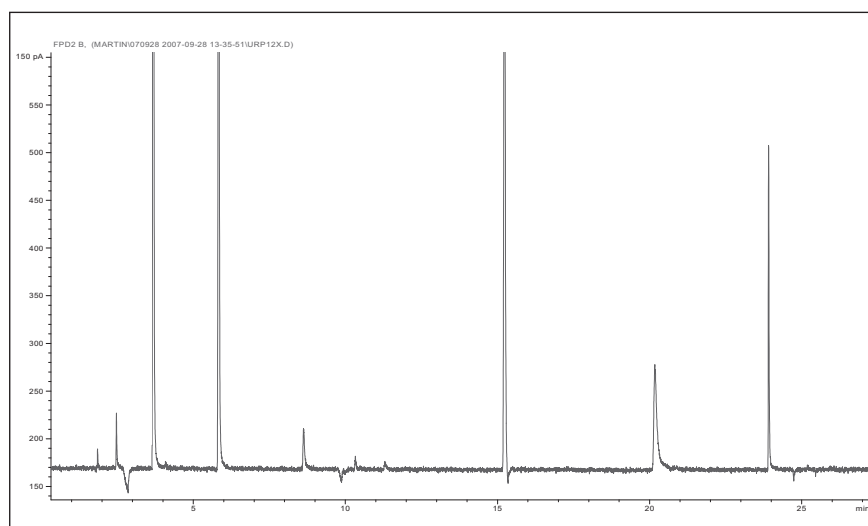
Pri meraní vzoriek piva je nevyhnutné zabezpečiť, aby bola meraná vždy čerstvo pripravená vzorka, z dôvodu výrazných zmien v pive počas státia pri izbovej teplote. Metánthiol podlieha dimerizácii na dimetyldisulfid, časom dochádza aj k tvorbe sulfidu uhličitého. Tento fakt vedie aj k problémom pri kvantifikácii, napr. pri metánthiole

traction as without the addition of the salts. In this case, NaCl proved to be more efficient than Na₂SO₄.

Based on the results of the measurement, it was found that the optimum conditions of time and temperature are 40 minutes at 40 °C or 30 minutes at 45 °C, but with the addition of NaCl, which significantly increases the amount of the extractable compounds on the SPME fibre. From the point of the efficient use of the analytical device it is more appropriate to use less time-consuming alternatives, since the time of analysis is 30, too. Therefore, the following conditions were chosen for SPME extraction using 20 ml samplers: sample volume of 6 ml, extraction temperature of 45 °C, extraction time of 30 minutes and addition of NaCl of 0.6 g.

Fig. 3 shows a typical FPD chromatogram of an SPME beer sample. Here can be found peaks of all usual sulphur-containing compounds contained in beer as well as peaks internal standards of ethyl methyl thiosulphide and propyl thioacetate.

For the measurement of the beer samples is absolutely necessary to ensure that always a fresh prepared sample is measured due to significant changes in beer samples during resting at room temperature. Methanethiol dimerises to dimethyl sulphide, carbon disulphide is also formed after a certain period of time. This can cause problems for quantification and for example, the standard sample of methanethiol dimerises immediately. The values measured for some volatile sulphur-containing compounds significantly depend on the concentration of ethanol in the sample being analysed. Ethanol binds these compounds in the solution, which effects the extraction and therefore, their concentration measured is lower than the real one. This problem can be resolved by using internal standards. Each sample was measured at least three times.



Obr. 3 / Fig. 3 Typický FPD chromatogram SPME vzorky piva / Typical FPD SPME-chromatogram of a beer sample

Identifikované píky

1. Metánthiol (MeSH)
2. Dimetylsulfid (DMS)
3. Sulfid uhličitý (CS₂)
4. Etylmetylsulfid (EMS) / vnútorný štandard
5. Metyltioacetát (MeSAc)
6. Dimetyldisulfid (DMDS)
7. Etyltioacetát (EtSAc)
8. Propyltioacetát (PrSAc) / vnútorný štandard
9. 3-metyltiopropanol (metionol)
10. 3-metyltiopropylacetát (3-MeSPrAc)

Identified peaks

1. Methanethiol (MeSH)
2. Dimethyl sulphide (DMS)
3. Carbon disulphide (CS₂)
4. Ethyl methyl sulphide (EMS) / internal standard
5. Methyl thioacetate (MeSAc)
6. Dimethyl disulphide (DMDS)
7. Ethyl thioacetate (EtSAc)
8. Propyl thioacetate (PrSAc) / internal standard
9. 3-methyl thiopropanol (methionol)
10. 3-methyl thiopropyl acetate (3-MeSPrAc)

dochádza k okamžitej dimerizácii väčšiny štandardu. Namerané hodnoty niektorých prchavých sírnych zlúčenín výrazne závisia od koncentrácie etanolu vo vzorke. Etanol viaže tieto látky v roztoku, čo vedie k ovplyvneniu extrakcie, a preto je ich nameraná koncentrácia nižšia ako skutočná. Tento problém sa rieši použitím vnútorných štandardov. Každá vzorka bola meraná minimálne trikrát.

Ako vidno z *tab. 1*, nie je možné na prvý pohľad určiť jednoznačný trend obsahu prchavých sírnych zlúčenín v pive v závislosti od pivovaru, ani od stupňovitosti piva. Aj rozdiely medzi jednotlivými značkami v produkcii jedného pivovaru sú značné.

Senzorickou analýzou sa zistilo, že sírne zlúčeniny ani v jednom prípade negatívne neovplyvňovali arómu piva.

POĎAKOVANIE

Práca bola vypracovaná vďaka podpore programu *Central European Exchange Program for University Studies* CII-HU-023-01-0607, CII-HU-023-02-0708 a Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA, reg. č. 1/0786/08.

*Zpracováno podle posteru na
22. Pivovarsko-sladařských dnech
v Praze, 1. a 2. 11. 2007
Lektoroval Mgr. Tomáš Horák
Do redakce došlo 14. 1. 2008*

Literatúra / Literature

- Hill, P. G., Smith, R. M.: Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. *J. Chromatogr. A* 872, 2000, 203–211.
- Fang, Y., Qian, M. C.: Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. *J. Chromatogr. A* 1080, 2005, 177–185.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G.: The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.* 95, 2006, 357–381.
- Vermeulen, C., Lejeune, I., Tran, T. T. H., Collin, S.: Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *J. Agric. Food. Chem.* 54, 2006, 5001–5068.
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Santos, L. H. M. L. M.: Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *J. Chromatogr. A* 1121, 2006, 145–153.

Tab. 1 Priemerné plochy pík sírnych zlúčenín vo vzorkách slovenských pív (N – namerané hodnoty) / *Average peak areas of sulphur-containing compounds in samples of Slovak beers (N – non-measurable values)*

Kód vzorky / Sample code	MeSH	DMS	MeSAc	DMDS	Methionol	3-MeSPrAc
A10A	105	2942	N	51	262	110
A12A	135	6808	N	35	393	167
A10B	203	5513	41	27	323	82
A12B	131	4876	N	41	596	130
A10C	129	2297	N	26	348	182
A12C	218	3108	N	N	312	257
A10D	160	4284	N	N	254	71
B10A	366	4152	104	61	182	92
B12A	208	2486	52	28	N	42
C10A	105	7104	70	30	1230	115
C12A	115	4110	N	29	1522	292
C10B	155	10515	63	N	1433	278
D10A	205	10785	75	60	628	20
D12A	159	5423	643	71	435	24
E10A	95	3406	171	37	N	39
E12A	238	1665	237	30	190	83
F10A	191	3927	179	N	269	73
F12A	173	4944	184	N	363	172
F12B	222	3239	310	N	204	52
G10A	69	2802	169	53	482	336
G12A	78	6167	137	32	620	673
H10A	48	1799	N	33	382	44
H12A	75	20181	N	N	776	78

As it can be seen from *Table 1* is not possible to immediately determine unequivocal trend of the content of the volatile sulphur-containing compounds in beer depending on in what brewery it was brewed or on beer gravity. Also differences between individual brands made by one brewery are considerable.

Based on the sensory analysis made, it was found that the sulphur-containing compounds in no single case adversely influenced the beer aroma.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was carried out thanks to the support of the *Central European Exchange Program for University Studies* CII-HU-023-01-0607, CII-HU-023-02-0708 and Scientific Grant Agency of Ministry of Education of the Slovak Republic and Slovak Academy of Sciences, registration number 1/0786/08.

Translated by Ladislav Kábrt

Česká společnost chemická, o.s. Kvasná chemie a biotechnologie, pobočka ČSCH v Plzni,
Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha,
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s. a Plzeňský Prazdroj, a. s.

dovolujú si Vás pozvať na 18. konferenci

TECHNOLOGIE A HODNOCENÍ VÝROBKŮ NÁPOJOVÉHO PRŮMYSLU

konanou 11. a 12. června 2008
v Reprezenačním koutku Plzeňského Prazdroje a.s. v Plzni

Více informací a přihlášku naleznete na www.vscht.cz nebo na www.kch.zcu.cz/cz/di/CSCH/index.shtml