

DOI: 10.18832/kp201714

## Optimalizace stanovení obsahu dimethylsulfidu v mladině a pivo

### Optimization of Determination of Dimethyl Sulfide in Wort and Beer

Zdeněk SVOBODA, Renata MIKULÍKOVÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ, Karolína BENEŠOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno

Research Institute of Brewing and Malting, Plc, Malting Institute, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic

e-mail: svoboda@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

**Svoboda, Z., Mikulíková, R., Běláková, S., Benešová, K., 2017: Optimalizace stanovení obsahu dimethylsulfidu v mladině a pivo.** Kvasny Prum. 63(3): 121–125

Sírné sloučeniny přítomné v ječmeni, sladu a pivo jsou většinou netěkavé látky (aminokyseliny, bílkoviny, anorganické sírany), ze kterých mohou za určitých podmínek vznikat těkavé sensoricky aktivní látky. Přítomnost těchto látek v pivo může negativně ovlivnit jeho organoleptické vlastnosti. Jednou z nejsledovanějších těkavých sírných sloučenin v pivo je dimethylsulfid (DMS), proto je nutné mít vhodnou analytickou metodu ke sledování jeho obsahu.

Ke stanovení obsahu DMS v mladině a pivo byla optimalizována a validována metoda statické headspace ve spojení s plynovou chromatografií s plamenovým fotometrickým detektorem (HS-GC-FPD). Optimální výtěžnost HS extrakce byla dosažena po 30 minutách při teplotě 50 °C. Obsahy DMS v analyzovaných mladinách se pohybovaly od 9,6 do 59,6 µg.l<sup>-1</sup>, v pivech od 6,1 do 34,9 µg.l<sup>-1</sup>.

**Svoboda, Z., Mikulíková, R., Běláková, S., Benešová, K., 2017: Optimization of determination of dimethyl sulfide in wort and beer.** Kvasny Prum. 63(3): 121–125

Sulphur compounds present in barley, malt and beer are mostly non-volatile substances (amino acids, proteins, inorganic sulphates) from which volatile sensory active substances can be produced under certain conditions. The presence of these substances in beer can adversely affect its organoleptic properties. Dimethyl sulfide (DMS) is one of the most studied volatile sulphur compounds in beer; therefore a suitable analytical method for monitoring DMS content is necessary.

The static headspace method coupled to gas chromatography with flame photometric detector (HS-GC-FPD) used for the determination of DMS content in wort and beer was optimized and validated. Optimal yield of HS extraction was achieved after 30 minutes at 50 °C. DMS contents moved from 9.6 to 59.6 µg.l<sup>-1</sup> in the analysed worts, from 6.1 to 34.9 µg.l<sup>-1</sup> in beers.

**Svoboda, Z., Mikulíková, R., Běláková, S., Benešová, K., 2017: Die Optimierung der Bestimmung des Gehalts an Dimethylsulfid in der Würze und im Bier.** Kvasny Prum. 63(3): 121–125

Die in der Gerste, im Malz und im Bier anwesende Schwefelverbindungen sind in der Regel nicht-flüchtige Substanzen (Aminosäuren, Proteine, anorganische Sulfate), aus deren unter bestimmten Bedingungen ein flüchtiger sensorischer Wirkstoff entstehen kann. Die Anwesenheit dieser Stoffe im Bier kann seine organoleptische Eigenschaften negativ beeinflussen. Zu den meist beachteteten flüchtigen Schwefelverbindungen gehört Dimethylsulfid (DMS), daher ist notwendig, ein geeignetes analytisches Verfahren zu haben, um seinen Inhalt überwachen zu können. Zur Bestimmung des Gehalts an DMS in der Würze und im Bier wurde eine Methode der statischen Headspace – Technik mit Gaschromatographie mit flammenphotometrischem Detektor (HS-GC-FPD) optimiert und validiert. Sie optimale Ausbeute an HS Extraktion wurde bei der Temperatur 50 °C nach 30 Minuten erreicht. Der Gehalt an DMS in den analysierten Würzen lag im Bereich von 9,6 bis 59,6 µg.l<sup>-1</sup>, im Bier von 6,1 bis 34,9 µg.l<sup>-1</sup>.

**Klíčová slova:** dimethylsulfid, HS-GC-FPD, mladina, pivo

**Keywords:** dimethyl sulfide, HS-GC-FPD, wort, beer

## 1 ÚVOD

V poslední době je celosvětově a rovněž v České republice věnována zvýšená pozornost sensoricky aktivním látkám ovlivňujícím kvalitu piva. Na sensorickém charakteru i analytickém složení piva se spolupodílí kvalita pivovarských surovin, technologie výroby sladiny a mladiny i technologie kvašení a zrání piva (Landaud et al., 2008; Basařová et al., 2010). Mezi sensoricky aktivními látkami ovlivňujícími kvalitu piva hrají významnou úlohu heterocyklické a sírné sloučeniny, z nichž některé se vyznačují vysokou sensorickou aktivitou i v extrémně nízkých koncentracích (Miracle et al., 2005; Basařová et al., 2015).

Dimethylsulfid (DMS) je v současné době nejsledovanější sírnou sloučeninou, která výrazně ovlivňuje sensorické vlastnosti piva. Jeho obsah se pohybuje v rozmezí jednotek až stovek µg.l<sup>-1</sup> v závislosti na typu piva, použité technologii a surovinách, především sladu. Nároky na prahovou koncentraci dimethylsulfidu se liší, ale většinou se považuje za hranici hodnota okolo 50 µg.l<sup>-1</sup> (Basařová et al., 2010). Protože v nižších koncentracích je považován za aromatickou složku ležáckých piv, je jeho určitá koncentrace nezbytná, ba dokonce žádoucí. Charakteristická vůně dimethylsulfidu je udávána po vaření zelenině (kapustě či zelí).

Přímá analýza sírných sensoricky aktivních látek je možná jen zřídka, protože se nacházejí v analyzovaných maticích (slad, pivo) ve velmi nízkých koncentracích (µg.l<sup>-1</sup> – ng.l<sup>-1</sup>). Před vlastní analýzou je třeba analyty extrahovat z matrice a zakoncentrovat (Scarlati a Ebeler, 1999). Výběr vhodné metody přípravy vzorku pak výrazně ovlivňuje rychlost, spolehlivost a přesnost analýzy.

## 1 INTRODUCTION

Recently, worldwide as well as in the Czech Republic, increased attention has been devoted to sensorially active substances that affect beer quality. Quality of brewing materials, hopped and unhopped wort production technology, fermentation technology and beer maturation contribute to the beer organoleptic characters and analytical composition (Landaud et al., 2008; Basařová et al., 2010). Among sensorially active substances affecting beer quality, heterocyclic and sulphur compounds, some of them with high sensorial activity even at extremely low concentrations, play a role (Miracle et al., 2005; Basařová et al., 2015).

Dimethyl sulfide (DMS) has recently been the most studied sulphur compound that significantly affects sensorial properties of beer. Its content moves in the range of units to hundreds of µg.l<sup>-1</sup> depending on a beer type, technology used and raw materials, namely malt. Opinions about the threshold dimethyl sulphide concentration differ but the value about 50 µg.l<sup>-1</sup> is mostly considered a limit (Basařová et al., 2010). As at lower concentrations, DMS is an aromatic component of lager beers, its certain concentration is necessary or even desirable. The characteristic smell of dimethyl sulfide is given after cooked vegetables (cabbage).

Direct analysis of sensory active sulphur substances is possible only seldom as they are found in analyzed matrices (malt, beer) at very low concentrations (µg.l<sup>-1</sup> – ng.l<sup>-1</sup>). Prior to the analysis, analytes need to be extracted from the matrix and concentrated. (Scarlati, Ebeler, 1999). The selection of an appropriate method for the sample preparation then greatly influences the speed, reliability and accuracy of the analysis.

Těkavé látky lze z kapalných vzorků izolovat šetrnou extrakcí plynem, tedy s využitím tzv. headspace techniky (HS). Podstatou těchto metod je analýza plynné fáze, která byla v kontaktu s extrahovaným materiálem, v ideálním případě až do ustavení rovnovážné distribuce těkavých látek mezi plynnou a kondenzovanou (kapalnou) fází, která je popsána distribuční konstantou jednotlivých složek v dané soustavě (Kolb, 1999).

Rozlišují se dva způsoby uspořádání headspace analýzy:

a) Statická headspace

V tomto uspořádání se analyzuje vzorek plynu odebraný z prostoru nad kondenzovanou fází ve statickém uzavřeném systému.

b) Dynamická headspace

Kondenzovaná fáze se kontinuálně extrahuje proudem inertního plynu (tzv. stripování), z něhož jsou vynášeny páry těkavých látek vhodným způsobem zachycovány.

K separaci sirmých těkavých látek bývá nejčastěji využívána plynová chromatografie ve spojení se selektivními detektory (Xiao et al., 2005; Hill a Smith, 2000). Selektivní detektory jsou obzvláště výhodné při analýzách rozmanitých sirmých látek ve složitých maticích. Tyto detektory mohou redukovat časově náročné čištění vzorků, které může být příčinou znečištění vzorků dalšími kontaminanty, nebo dokonce ztráty stanovených analytů.

Stále nejvíce používaným detektorem pro analýzu sirmých látek je plamenový fotometrický detektor (FPD). Tento detektor sice vykazuje nelineární (exponenciální) odezvu na sirmé látky v závislosti na jejich koncentraci, ale je poměrně levný, robustní a postačující pro mnoho aplikací (Wardencki, 1998; Mestres et al., 1997).

Alternativou k plamenově fotometrickému detektoru je pulzní plamenový fotometrický detektor (PFDP). Detektor využívá zdroje plynu plamene v dávkování tak, aby plamen nebyl trvalý. Pulzní zapalování je viditelné a plamen sám zhasíná. Tento cyklus se opakuje 2–4 krát za sekundu. Selektivita je zabezpečena vhodným filtrem a časovou dimenzí (Hill a Smith, 2000).

Další možností je sirmý chemiluminiscenční detektor (SCD). Nejnovější aplikace metod založených na detekci tímto detektorem dokazují, že jeho nízký detekční limit, stabilita a lineární odezva pro sirmé látky jsou důvodem, proč je tento detektor doporučován pro analýzu extrémě složitých matic (Wardencki, 1998; Miracle et al., 2005).

V posledních letech se začal pro stanovení sirmých látek využívat atomový emisní detektor (AED). V AED vstupuje plyn z chromatografické kolony do plazmové hlavice, atomizuje se a emituje záření. To se po rozkladu mřížkou analyzuje diodovým polem a určí se obsahy prvků. Tento detektor se používá k posouzení elementárního složení látek (Wardencki, 1998).

Kombinace plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je vhodné při identifikaci těkavých sirmých látek v různých maticích (Wardencki, 1998). K separaci těkavých sirmých látek metodou plynové chromatografie se používají kolony s polární stacionární fází polyethylenglykolu nebo s mírně polární fází 5% – fenyl-95% – dimethylpolysiloxanu.

## 2 MATERIÁL A METODY

Ke stanovení obsahu volného DMS ve vzorcích mladiny a piva byla použita optimalizovaná metoda headspace (HS) v kombinaci s plynovou chromatografií s plamenově fotometrickým detektorem. Pro HS extrakci byla optimalizována teplota a doba extrakce.

### 2.1 Použité chemikálie a přístroje

Standardy: (dimethylsulfid, ethylmethylsulfid), ethanol.

Pro stanovení obsahu DMS ve vzorcích mladiny a piva byl použit plynový chromatograf Trace GC Ultra s FPD detektorem. Separace byla provedena na kapilární koloně GS-Gaspro (60 m x 0,32 mm), nosným plynem bylo helium.

### 2.2 Optimalizace doby headspace extrakce

Při optimalizaci doby HS extrakce DMS z analyzovaného vzorku byly výtěžnosti extrakce testovány v čase 10 až 50 minut v desetiminutových intervalech při teplotě 40 °C. Jako optimální čas byla vybrána doba extrakce 30 minut.

### 2.3 Optimalizace teploty headspace extrakce

Při optimalizaci teploty HS extrakce DMS z analyzovaného vzorku byly výtěžnosti extrakce testovány při teplotách 30 až 70 °C v desetiminutových intervalech při optimalizované době extrakce (30 min). Jako optimální teplota HS extrakce DMS ze vzorku byla vybrána teplota 50 °C.

The volatile components from the liquid samples can be isolated by extraction with gas, i.e. using the so-called headspace technique (HS). These methods are based on the analysis of the gas phase that was in contact with the extracted material, ideally until the equilibrium distribution of the volatile substances between the gaseous and the condensed (liquid) phases was reached, as described by the distribution constant of the individual components in the given system (Kolb, 1999).

Two set-ups of the headspace analysis are used:

c) Static headspace

In this system set-up, the analyzed sample of gas is taken from the space above the condensed phase in the static close space.

d) Dynamic headspace

The condensed phase is continuously extracted with a stream of inert gas (so-called stripping) from which volatile vapours are trapped.

Gas chromatography coupled with selective detectors is most frequently used for the separation of sulphur volatile substances (Xiao et al., 2005; Hill and Smith, 2000). The selective detectors are namely suitable for the analyses of various sulphur substances in complex matrixes. These detectors can reduce time-consuming cleaning of samples that may cause contamination of samples by other contaminants, or even loss of the analytes determined.

The flame photometric detector (FPD) is still the most widely used detector for sulphur analysis. Although this detector exhibits a non-linear (exponential) response to sulphuric substances depending on their concentrations, it is relatively inexpensive, robust and sufficient for many applications (Wardencki, 1998; Mestres et al., 1997).

The pulsed flame photometric detector (PFDP) is an alternative to the flame photometric detector. The detector uses flame gas sources in the dosage so that the flame is not sustained. Pulse ignition is visible and the flame itself goes out. This cycle is repeated 2–4 times per second. Selectivity is ensured by an appropriate filter and time dimensionality. (Hill and Smith, 2000).

Another option is a sulphur chemiluminescence detector (SCD). The latest application of methods based on the detection with this detector proves that its low limit of detection, stability and linear response for sulphuric substances are the reason why this detector is recommended for analyzing extremely complex matrixes (Wardencki, 1998; Miracle et al., 2005).

Recently the atomic emission detector (AED) has been used for the determination of sulphuric substances. In AED, the gas from the chromatographic column enters the plasma head, atomizes and emits radiation. This radiation is analyzed by the grid and the diode array and the contents of the elements are determined. This detector is used to assess the elemental composition of substances (Wardencki, 1998).

Combination of gas chromatography with mass spectrometry is useful for the identification of volatile sulphur compounds in various matrixes (Wardencki, 1998). The separation of volatile sulphur compounds by gas chromatography uses columns with a polar stationary phase of polyethylene glycol or a slightly polar phase of 5% -phenyl-95% -dimethylpolysiloxane.

## 2 MATERIAL AND METHODS

The optimized headspace (HS) method coupled with gas chromatography with the flame photometric detector was used for the determination of free DMS content in wort and beer samples. For the HS extraction, the temperature and extraction time were optimized.

### 2.1 Chemicals and instrumentation

Standards (dimethyl sulfide, ethyl methyl sulfide), ethanol.

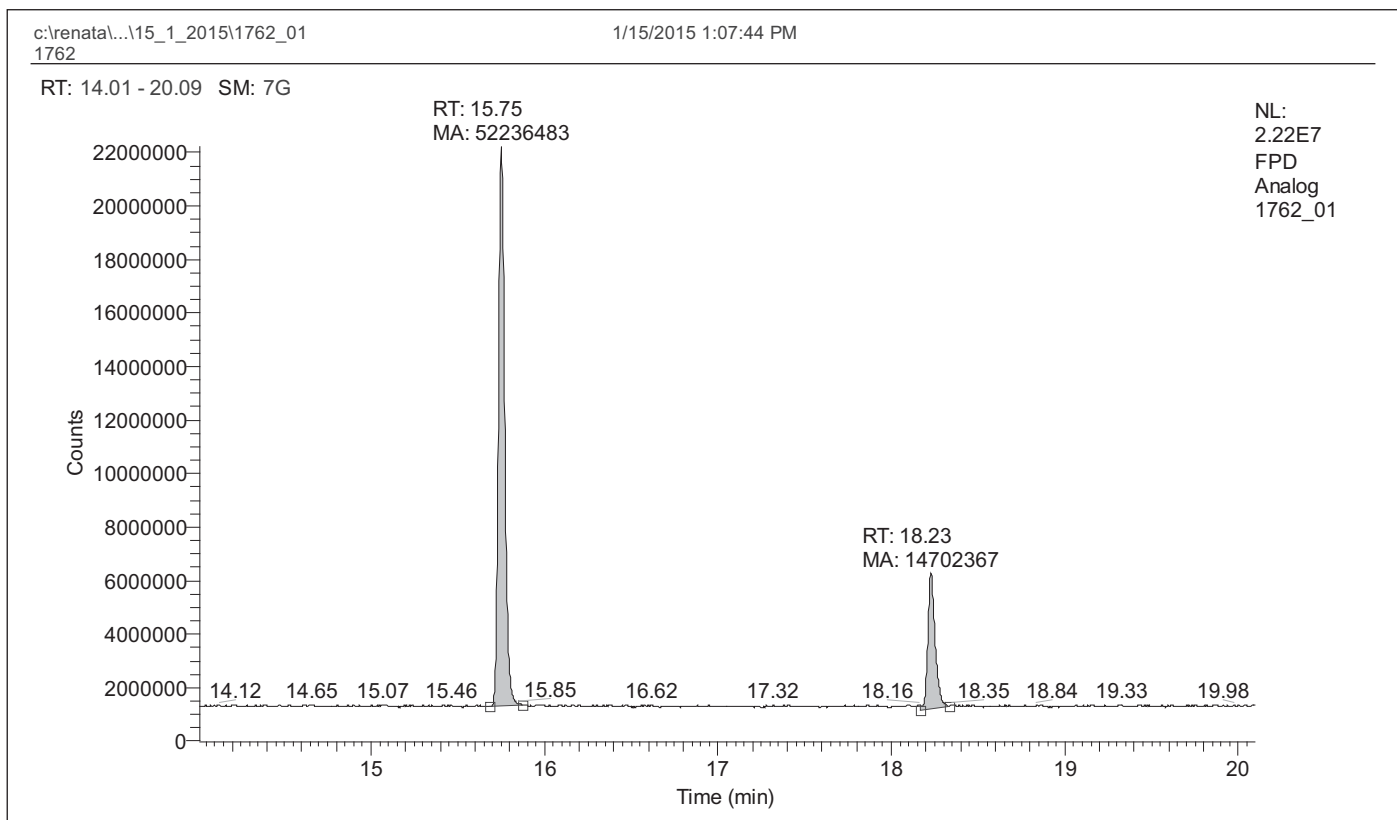
Trace GC Ultra gas chromatograph with FPD detector was used for the determination of DMS content in wort and beer samples. Separation was performed on the capillary column GS-Gaspro (60 m x 0.32 mm), carrier gas was helium.

### 2.2 Optimization of headspace extraction time

For the optimization of the HS extraction time of DMS from the analyzed sample, extraction yields were tested at 40 °C at 10 to 50 minutes at ten minute intervals. The extraction time at 30 minutes was selected as the optimal time.

### 2.3 Optimization of headspace extraction temperature

For the optimization of the HS extraction temperature of DMS from the analyzed sample, extraction yields were tested at temperatures



Obr. 1 Chromatogram analyzovaného vzorku mladiny (koncentrace DMS  $59,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) – DMS (RT 15.75 min), EMS (RT 18.23 min) / Fig. 1 Chromatogram of the analyzed hopped wort sample (concentration of DMS  $59,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) – DMS (RT 15.75 min), EMS (RT 18.23 min)

## 2.4 Příprava vzorku pro headspace analýzu

Do 10 ml vialky bylo odměřeno 0,5 ml ethanolu, zazátkovaná vialka byla 15 min vychlazena na teplotu  $5^\circ\text{C}$ . Do připravené vychlazené vialky bylo napipetováno  $5 \pm 0,1$  ml vychlazeného vzorku mladiny (piva), přidáno 2 ml roztoku vnitřního standardu EMS a vialka byla uzavřena víčkem se septem. Takto připravený vzorek byl použit pro headspace extrakci za optimálních podmínek ( $50^\circ\text{C}$ , 30 min).

## 2.5 Instrumentace a chromatografické stanovení

Vlastní stanovení DMS bylo prováděno na plynovém chromatografu Trace Ultra s FPD detektorem, identifikace byla provedena na plynovém chromatografu Trace Ultra s MSD detektorem. K separaci byla použita kapilární kolona GS-Gaspro (60 m x 0,32 mm) s následujícím teplotním programem: počáteční teplota  $40^\circ\text{C}$  po dobu 1 min, nárůst teploty  $4^\circ\text{C.min}^{-1}$  do  $240^\circ\text{C}$ , doba setrvání 15 min. Konstantní průtok nosného plynu  $\text{He}$   $1,5 \text{ ml.min}^{-1}$ . Teplota FPD detektoru  $180^\circ\text{C}$ , průtok vzduchu  $105 \text{ ml.min}^{-1}$ , průtok vodíku  $90 \text{ ml.min}^{-1}$ .

Identifikace analyzovaného DMS byla provedena na základě porovnání retenčních časů se standardem (obr. 1), kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky (obr. 2).

## 2.6 Validace metody

Byly stanoveny následující validační parametry: kalibrační závislost, kombinovaná standardní nejistota mez stanovení.

Kalibrační závislost koncentrace DMS na odezvě FPD detektoru byla exponenciální. Po analýze kalibračních roztoků standardu DMS v koncentračním rozmezí od 6,7 do  $118,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  byla sestavena kalibrační křivka. Na obr. 2 je znázorněna kalibrační křivka s regresní rovnicí a hodnotou spolehlivosti.

Kombinovaná standardní nejistota metody byla vypočítána z opakovatelnosti měření obsahu DMS v analyzovaných vzorcích. Počet opakování pro výpočet nejistoty bylo 10 pro mladinu i pivo. Kombinovaná standardní nejistota metody byla 5,9%.

Mez stanovení je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s definovanou přesností kvantitativně stanovit. Je to mez, kdy analyt vyvolá odezvu měřicího přístroje (S) větší než je desetinásobek úrovně šumu pozadí (N), tedy  $S/N = 10$ . Mez stanovení obsahu DMS v analyzovaných vzorcích mladiny a piva byla stanovena výpočtem z chromatogramu a její hodnota byla  $3,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

$30$  to  $70^\circ\text{C}$  in ten-minute intervals at the optimized extraction time (30 min). The temperature of  $50^\circ\text{C}$  was selected as the optimal temperature of HS extraction of DMS from the sample.

## 2.4 Sample preparation for headspace analysis

0.5 ml of ethanol was transferred to a vial (10 ml), the capped vial was cooled to  $5^\circ\text{C}$  for 15 minutes.  $5 \pm 0.1$  ml of the chilled wort sample (beer) was pipetted into the prepared chilled vial, 2 ml of the internal EMS standard solution was added, and the vial was septum-capped. The prepared sample was used for headspace extraction under the optimum conditions ( $50^\circ\text{C}$ , 30 min).

## 2.5 Instrumentation and chromatographic determination

DMS was determined using the gas chromatograph Trace Ultra with a FPD detector, the identification was carried out using the gas chromatograph Trace Ultra with a MSD detector. The separation was conducted with a capillary column GS-Gaspro (60 m x 0,32 mm) with the following thermal programme: initial temperature  $40^\circ\text{C}$  for 1 min, increase in temperature  $4^\circ\text{C.min}^{-1}$  to  $240^\circ\text{C}$ , maintained for 15 min. Constant flow of the carrier gas  $\text{He}$   $1.5 \text{ ml.min}^{-1}$ . The FPD detector temperature  $180^\circ\text{C}$ , air flow  $105 \text{ ml.min}^{-1}$ , hydrogen flow  $90 \text{ ml.min}^{-1}$ , nitrogen flow (make-up)  $20 \text{ ml.min}^{-1}$ .

The identification of the analyzed DMS was conducted based on the comparison of retention times with standard (Fig. 1), quantification was performed using the calibration curve (Fig. 2).

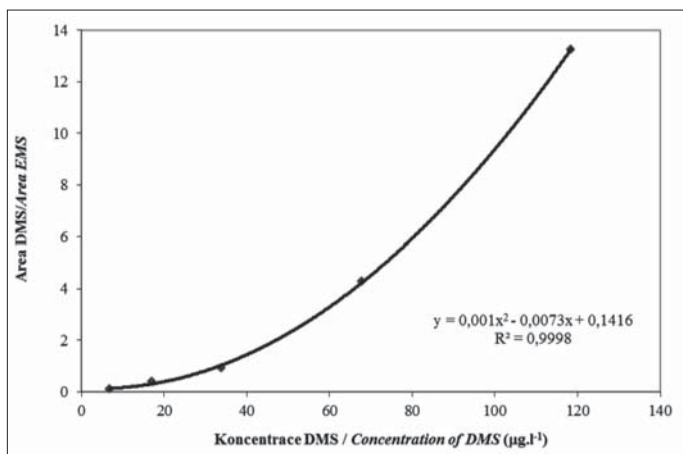
## 2.6 The method validation

The following validation parameters were determined: calibration dependence, combined standard uncertainty, limit of quantification.

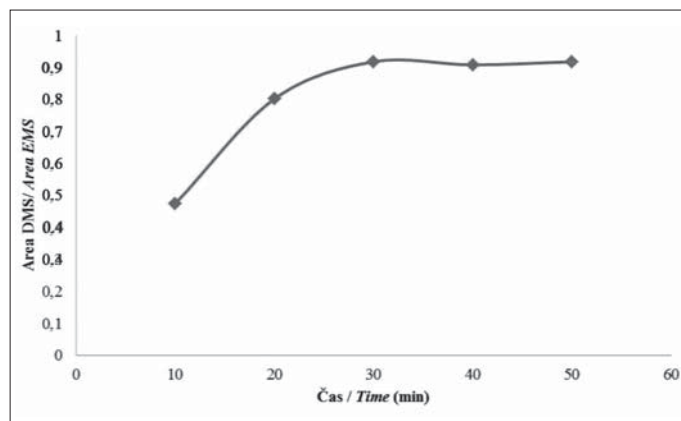
The calibration dependence of the DMS concentration on the FPD detector response was exponential. After analyses of the DMS calibration solution standards at the concentration range from 6.7 to  $118.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ , the calibration curve was constructed. Fig. 2 shows a calibration curve with a regression equation and confidence value.

The combined standard uncertainty of the method was calculated from the repeatability of the DMS content measurement in the analyzed samples. The number of iterations to calculate the uncertainty was 10 for both wort and beer. The combined standard uncertainty of the method was 5.9%.

The limit of quantification is the lowest concentration of the analyte that can be quantified with the defined precision. This is the limit at



Obr. 2 Kalibrační křivka DMS / Fig. 2 Calibration curve of DMS



Obr. 3 Optimalizace času HS – extrakce / Fig. 3 Optimization of the HS – extraction time

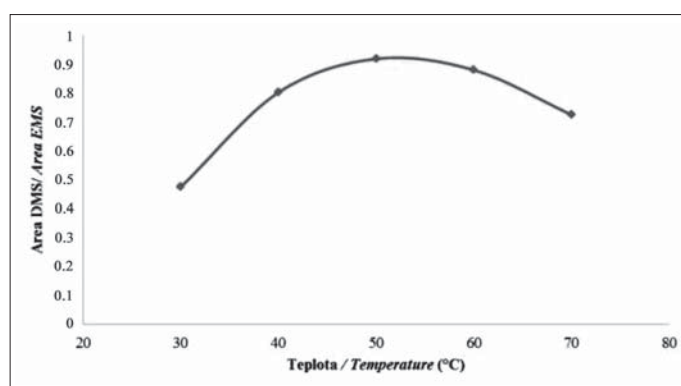
### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Optimalizovaná metoda HS extrakce ve spojení s plynovou chromatografií s FPD detektorem byla validována. Mez stanovení volného DMS ve vzorcích mladiny a piva byla  $3,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ , kombinovaná standardní nejistota 5,9%,  $R^2=0,9998$ .

Výtěžnost HS extrakce v závislosti na době extrakce byla testována v 10minutových intervalech od 10 do 50 min. Testovací teplota byla zvolena  $40^\circ\text{C}$ , což je teplota bodu varu DMS. Z grafické závislosti je patrné, že do 20 min dochází k prudkému nárůstu výtěžnosti, v době od 20 do 30 min je nárůst extrakce pozvolnější. Od 30 min dochází k ustálení extrakce. Z těchto závislostí vyplývá, že neoptimálnější doba extrakce je 30 min. Na obr. 3 je znázorněna závislost ploch píků DMS / EMS na době HS extrakce.

Výtěžnost HS extrakce v závislosti na teplotě extrakce byla testována po  $10^\circ\text{C}$  od  $30^\circ\text{C}$  do  $70^\circ\text{C}$ . Grafická závislost ukazuje strmý nárůst výtěžnosti od  $30^\circ\text{C}$  do  $50^\circ\text{C}$ , při teplotách nad  $50^\circ\text{C}$  dochází k mírnému poklesu. Nejvyšší výtěžnost HS extrakce byla při  $50^\circ\text{C}$  a tato teplota byla zvolena jako optimální. Na obr. 4 je znázorněna závislost ploch píků DMS / EMS na teplotě HS extrakce.

Optimalizovanou extrakční metodou HS ve spojení s plynovou chromatografií s FPD detektorem bylo analyzováno 80 vzorků mladiny a 25 vzorků piv. Obsahy DMS v analyzovaných mladínách se pohybovaly od 9,6 do  $59,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ , v pivech od 6,1 do  $34,9 \mu\text{g.l}^{-1}$ .



Obr. 4 Optimalizace teploty HS – extrakce / Fig. 4 Optimization of the HS – extraction temperature

### 4 ZÁVĚR

Z výsledků optimalizace a validace metody vyplývá, že metoda HS v kombinaci s plynovou chromatografií s plamenově fotometrickým detektorem je vhodná pro stanovení obsahu volného DMS v mladině a pivu.

### LITERATURA / REFERENCES

- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství teorie a praxe výroby piva. 1. vydání, VŠCHT, Praha, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7
- Basařová, G., Psota, V., Šavel, J., Basař, P., Paulů, R., Kosař, K., Dostálek, P., Basařová, P., Kellner, V., Mikulíková, R., Čejka, P., 2015: Sladařství – teorie a praxe výroby sladu. Havlíček Brain Team, Praha, 626 s. ISBN 978-80-87109-47-2
- Hill, P. G., Smith, R. M., 2000: Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. J. Chromatogr. A, 872: 2003–2013. doi: 10.1016/S0021-9673(99)01307-2.
- Kolb, B., 1999: Headspace sampling gas analysis by gas chromatography. J. Chromatogr. A, 842, pp. 163-205. ISSN 0021-9673, doi: 10.1016/S0021-9673(99)00073-4
- Landaud, S., Helinec, S., Bonnarme, P., 2008: Formation of volatile sulphur compounds and metabolism of methionine and other sulphur compounds in fermented food. Appl Microbiol Biotechnol., 77: 1191-1205. doi: 10.1007/s00253-007-1288-y
- Mestres, M., Busto, O., Guasch, J., 1997: Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static headspace

which the analyte produces a response of the meter (S) greater than ten-fold of the background noise level (N), i.e.  $S/N = 10$ . The limit of the DMS content in the analyzed wort and beer samples was determined by calculation from the chromatogram and its value was  $3,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The optimized HS extraction coupled with gas chromatography with a FPD detector was validated. The limit of quantification of free DMS in samples of hopped wort mladiny and beer was  $3.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ , combined standard uncertainty 5.9%,  $R^2=0.9998$ .

The yield of HS extraction, depending on the time of extraction, was tested at 10 minute intervals of 10 to 50 minutes. The test temperature was selected at  $40^\circ\text{C}$ , which is the boiling point of the DMS. It is evident from the graphical dependence that the yields raise sharply up to 20 min, the extraction rate is slower in the 20 to 30 min period. From 30 min, extraction is stabilized. These dependencies show that the optimal extraction time is 30 minutes. Fig. 3 shows the dependence of the DMS / EMS peak areas on the HS extraction time.

The yield of HS extraction, depending on the extraction temperature, was tested per  $10^\circ\text{C}$  from  $30^\circ\text{C}$  to  $70^\circ\text{C}$ . The graphical dependence shows a steep increase in yield from  $30^\circ\text{C}$  to  $50^\circ\text{C}$ , and a slight decrease at temperatures above  $50^\circ\text{C}$ . The highest yield of HS extraction was at  $50^\circ\text{C}$  and this temperature was chosen as optimal. Fig. 4 shows the dependence of the DMS/EMS peak areas on the HS extraction temperature.

The optimized HS extraction method coupled with FPD gas chromatography was used for the analysis of 80 samples of wort and 25 samples of beers. The DMS content of the analyzed worts ranged from 9.6 to  $59.6 \mu\text{g.l}^{-1}$ , in beers from 6.1 to  $34.9 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

- technique with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A*, 773: 261–269. doi: 10.1016/S0021-9673(97)00188-X
- Miracle, R. E., Ebeler, S. E., Bamforth, C. W., 2005: The Measurement of Sulfur-Containing Aroma Compounds in Samples from Production-Scale Brewery Operations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 63: 129–134. doi: 10.1094/ASBCJ-63-0129
- Scarlata, Ch. J., Ebeler, S. E., 1999: Headspace Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Dimethyl Sulphide in Beer. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 2505–2508. doi: 10.1021/jf990298g
- Wardencki, W., 1998: Problems with the determination of environmental sulphur compounds by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 793: 1–19. doi: 10.1016/S0021-9673(97)00997-7
- Xiao, Q. Z. Ch., Xing, J., Hu, B., 2005: Comparison of headspace and direct singledrop microextraction and headspace solid-phase microextraction for the measurement of volatile sulphur compounds in beer and beverage by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A*, 1125: 133–137. doi: 10.1016/j.chroma.2006.06.096

*Do redakce došlo / Manuscript received: 23/2/2017*  
*Přijato k publikování / Accepted for publication: 24/4/2017*

#### 4 CONCLUSION

The results of the optimization and validation of the method show that the HS method in combination with gas chromatography with a flame photometric detector is suitable for the determination of free DMS content in wort and beer.

*Translated by Vladimíra Nováková*