

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lucie Zavoralová

**PŘÍMÉ KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ TĚKAVÝCH SLOŽEK
V PIVU POMOCÍ METODY HEADSPACE GC-FID**

**Direct quantitative determination of volatile compounds in
beer using headspace GC-FID**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Anton Korban, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Tomáš Vrzal, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne 16. května 2025.

Podpis:

Abstrakt

Pro stanovení těkavých látek v pivu byly porovnány dvě metody interního standardu. Navrhovaná metoda s interním standardem ethanolem byla porovnána s metodou s tradičním interním standardem, v tomto případě n-butanolem. Nová metoda byla navržena, protože díky použití ethanolu, přítomného v každém vzorku piva, ke kvantifikaci analytů, není nutné každý vzorek manuálně upravovat. V případě použití této metody jsou tak očekávány lepší výsledky pro některé validační parametry, a navíc je v rutinních analýzách ušetřen čas i finance.

V případě použití navrhované metody bylo ale nejprve potřeba v každém vzorku piva stanovit obsah ethanolu, protože při udávání koncentrace analytů v pivu se používají jednotky mg/l. Pro ostatní alkoholické produkty se zpravidla používají jednotky mg/l přepočtené na absolutní alkohol, a tedy není nutné znát koncentraci ethanolu. Bylo ovšem zjištěno, že stanovení ethanolu plynovou chromatografií ve vzorcích piva neposkytuje přesné a správné výsledky. Aby tedy bylo možné metody objektivně porovnávat, bylo stanovení ethanolu dále prováděno také pomocí infračervené spektroskopie. Po zhodnocení jednotlivých zkoumaných parametrů bylo potvrzena domněnka, že metoda s IS ethanolem poskytuje lepší výsledky opakovatelnosti. Metoda s IS n-butanolem však poskytla lepší výsledky pro výtěžnost a limity detekce a kvantifikace.

Abstract

Two internal standard methods were compared for the quantitative determination of volatile compounds in beer. The suggested method with ethanol as an internal standard was compared to the traditional internal standard method which uses n-butanol. The reason this method was suggested lies in the absence of sample pre-treatment procedure. Thus, as ethanol always presents in beer sample there is no need to add it manually. Therefore, better results for some validation parameters are expected and moreover, time and financial resources are saved in routine analyses.

While using the suggested method, it was first necessary to determine the ethanol content in each beer sample, because the concentration of analytes in beer is expressed in mg/l. For instance, in case of other alcoholic products, mg/l of absolute alcohol units are usually used, and therefore it is not necessary to know the ethanol volumetric concentration. It was found out that the gas chromatography determination of ethanol in beer samples does not provide accurate results. Therefore, in order to compare the methods objectively, the determination of ethanol was also carried out by using infrared spectroscopy. After evaluating the examined parameters, it was confirmed that the results provided by method with IS ethanol have better repeatability. However, the method with IS n-butanol provided better results for recovery and limits of detection and quantification.

Klíčová slova

Headspace

Kontrola kvality

Pivo

Plynová chromatografie

Těkavé látky

Keywords

Beer

Gas chromatography

Headspace

Quality control

Volatile compounds

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Antonovi Korbanovi, Ph.D. za odborné vedení, podnětné rady a připomínky při psaní této práce a jeho ochotu, vstřícnost a čas při konzultacích.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Tomášovi Vrzalovi, Ph.D. z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského za jeho čas a ochotu při zpracování experimentální části práce a za poskytnuté konzultace.

Mé poděkování patří také Mgr. Nikole Hurychové za pomoc a odborný dohled při práci v laboratoři.

Obsah

1. Úvod	10
2. Teoretická část	12
2.1 Headspace analýza.....	13
2.1.1 Statická headspace analýza	14
2.1.2 Dynamická headspace analýza	14
2.1.3 Kvantifikace	15
2.1.4 Základní fyzikálně-chemické parametry HS technik.....	16
2.1.5 Reakce v HS vialce	19
2.1.6 Využití GC-HS v praxi	20
2.2 Analýza piva a vstupních surovin	21
2.2.1 Plynová chromatografie v analýze piva a vstupních surovin.....	22
2.2.2 Analýza těkavých látek v pivu	23
2.3 Metoda „Ethanol jako interní standard“	23
3. Experimentální část	25
3.1 Seznam použitých chemikálií.....	25
3.2 Seznam měřených vzorků	25
3.3 Instrumentace, experimentální podmínky analýzy	26
3.4 Příprava roztoků a vzorků.....	27
3.5 Stanovení ethanolu v pivu	28
3.6 Sledované metrologické parametry pro stanovení těkavých látek v pivu	29
3.6.1 Linearita	29
3.6.2 Opakovatelnost	30
3.6.3 Limity detekce a kvantifikace	30
3.6.4 Výtěžnost	31
3.7 Statistické zpracování dat	31
4. Výsledky a diskuse	33
4.1 Stanovení ethanolu v pivu	33
4.2 Sledované metrologické parametry pro stanovení těkavých látek v pivu	36

4.2.1	Linearita	36
4.2.2	Limity detekce a kvantifikace	42
4.2.3	Opakovatelnost	44
4.2.4	Výtěžnost	45
4.2.5	Statistické zpracování výsledků a porovnání jednotlivých metod	47
5.	Závěr	52

Seznam zkratek a symbolů

A_i	plocha píku [mV.min]
AA	absolutní alkohol
ABV	obsah ethanolu v alkoholickém nápoji (alcohol by volume)
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
β	fázový poměr
c_i	koncentrace [mol.dm ⁻³]
ECD	detektor elektronového záchytu (electron capture detector)
f	přepočítávací faktor
FID	plamenově ionizační detektor (flame ionization detector)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HS	headspace
IS	interní standard
K	distribuční koeficient
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NIR	blízká infračervená spektroskopie (near-infrared spectrometry)
QC	kontrola kvality (quality control)
R^2	koeficient determinace
ρ	hustota [kg.m ⁻³]
r	opakovatelnost (repeatability)
R_x	výtěžnost (recovery)
RRF	relativní odezvový faktor (relative response factor)
s	směrodatná odchylka
SPE	extrakce tuhou fází (solid phase extraction)
U	nejistota
\bar{x}	aritmetický průměr

1. Úvod

Pivo je již po několik staletí oblíbeným nápojem. Podle Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů se dokonce jedná o nejvíce konzumovaný alkoholický produkt na světě [1]. Od ostatních alkoholických nápojů se odlišuje vyšší nutriční hodnotou, která je dána skladbou vstupních surovin (tradičně se jedná o chmel, ječmen, kvasnice a samozřejmě vodu) a „bezpečností“, která souvisí s relativně nízkým obsahem ethanolu – typicky 3–5 objemových procent [2-3].

V pivu se v různé míře vyskytují různé těkavé a tzv. semitěkavé látky, mezi které patří alkoholy, estery, fenoly, furan a jeho deriváty (furfurylalkohol a furfural) a karbonylové sloučeniny. Jejich zdrojem jsou buď použité suroviny, nebo proces kvašení, kterým pivo během výroby prochází [1,4]. Většina z těchto látek je pevně svázána s chutí a vůní piva a jejich obsah je tedy spolehlivým ukazatelem kvality. Mezi látky, které chuť piva ovlivňují pozitivně, patří vyšší alkoholy a některé estery – ethylacetát, isoamyl acetát, ethyl hexanoát a ethyl oktanoát, po kterých pivo získává ovocnou chuť [5]. Vyskytovat se ale mohou i nežádoucí látky, například některé karbonylové sloučeniny, které chuť ovlivňují negativně a v pivu vznikají při nevhodném skladování. Dalšími nechtěnými látkami mohou být acetaldehyd nebo deriváty furanu, které jsou ve vysokých koncentracích toxické [2].

Žádná z výše zmíněných látek však nemá v současné době legislativně stanoveny jakékoli koncentrační limity a v pivu se tedy nemusí rutinně analyzovat. Některé pivovary nicméně kontroly přesto provádějí, protože, jak již bylo zmíněno výše, analýza těkavých látek jim poskytuje informace o kvalitě jejich produktu. Stanovení se nejčastěji provádí plynovou chromatografií spojenou s headspace nebo mikroextrakcí tuhou fází, a protože je pivo komplexní matrice, kvantifikuje se pomocí interního standardu (IS) [6]. Při jeho použití je však nutné každý vzorek manuálně upravit, což zvyšuje časové i finanční nároky na provedení analýzy, a navíc to může způsobit vznik zbytečných chyb. Byla proto navržena metoda, která jako interní standard používá ethanol přítomný v každém vzorku piva, i v tom nealkoholickém, a vzorky tak není třeba před analýzou vůbec upravovat. Fungování metody bylo již dříve ověřeno na vybraných alkoholických produktech a bylo prokázáno, že v daných případech metoda poskytuje lepší nebo stejné výsledky ve srovnání s klasickým interním standardem [7-9].

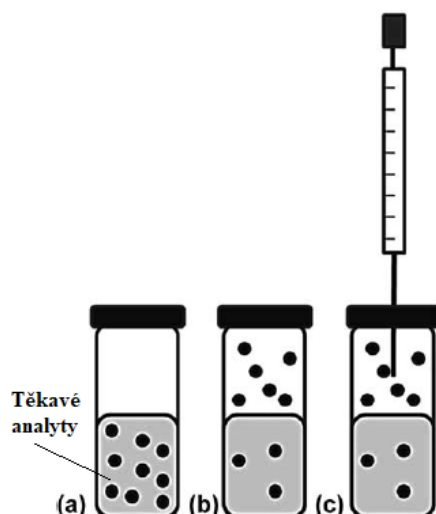
Cílem diplomové práce bylo ověřit vhodnost použití navrhované metody pro analýzu vybraných těkavých látek ve vzorcích piva pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí a headspace nástřikem. Navrhovaná metoda byla porovnávána se stávající kvantifikační metodou, kde se jako interní standard využívá n-butanol.

2. Teoretická část

Analýza těkavých látek plynovou chromatografií (GC, z anglického „gas chromatography“) je důležitou součástí nejrůznějších odvětví výzkumu i průmyslové výroby. Nejčastěji se lze s analýzou těkavých látek setkat v potravinářském průmyslu, v medicíně, v environmentální analýze, ve farmaceutickém průmyslu a některých ostatních oborech, ve kterých legislativa nařizuje kontrolu kvality (QC, z anglického „quality control“) [10]. Je zřejmé, že vzorky analyzované při kontrole kvality nejrůznějších výrobků, mají často složité komplexní matrice, které obsahují velké množství netěkavých látek. Stanovovat těkavé analyty v těchto vzorcích bez jakékoli úpravy pak může být obtížné [10-11].

Existuje několik možných přístupů, kterými lze tento problém vyřešit, většina z nich pracuje s různými možnostmi oddělení analytů od zbytku matrice [12]. Typicky se používá organické rozpouštědlo, do kterého se analyty extrahují, a do GC injektoru se nastříkne pouze tento extrakt, díky čemuž nehrozí ucpání jednotlivých částí chromatografu netěkavými látkami nebo degradace stacionární fáze kolony [10-11]. Problémem je, že je tento postup časově náročný, což je při rutinních analýzách nežádoucí. Také může být obtížné najít vhodné rozpouštědlo, ve kterém se rozpustí všechny analyty, přičemž ostatní složky matrice jsou v něm naopak zcela nerozpustné. Používání rozpouštědel je navíc v poslední době, s rozvojem tzv. „zelené chemie“, kontroverzním tématem [11]. Další možností oddělení analytů z matrice je například extrakce tuhou fází (SPE, z anglického „solid phase extraction“), při které odpadají potíže s rozpustností a lze ji s použitím moderních přístrojů automatizovat. Může být ale problém s výběrem vhodné stacionární fáze, na kterou se analyty extrahují, zvláště pokud je potřeba látku stanovit kvantitativně [12].

Další variantou, která odstraňuje některé výše popsané problémy, je využití headspace analýzy (HS, z anglického „headspace“). Vzorek (případně jeho roztok) je v tomto případě umístěn do plynotěsné vialky uzavřené víčkem s pružným septem. Vialka se vzorkem je pak zpravidla po určitou dobu zahřívána, i když podmínkou k vytvoření rovnováhy to vždy není. Nad hladinou kapaliny (nebo nad pevným vzorkem) se vytvoří plynná fáze, která bude mít za daných podmínek stejný obsah těkavých analytů jako vzorek [11,13]. Do injektoru chromatografu je nastříknuta pouze nově vytvořená plynná fáze (obrázek 2.1). I tato metoda má samozřejmě své limity. Pomocí HS metod lze totiž analyzovat pouze menší a dostatečně těkavé molekuly [10].



Obrázek 2.1: Schéma headspace analýzy. (a) Vzorek je umístěn do plynotěsné vialky. (b) Vialka je zahřívána a po určitém čase přejdou analyty do plynné fáze, která se vytvoří nad vzorkem. (c) Alikvot této plynné fáze je nasťříknut do GC systému. (Převzato a upraveno podle [13]).

2.1 Headspace analýza

Headspace je v podstatě, stejně jako přímý nástřik nebo SPE, metoda nástřiku vzorku do chromatografu, kdy jsou analyty nejprve extrahovány do plynné fáze a poté přímo nasťříknuty do injektoru právě v této plynné fázi. Oproti tradičnímu přímému nástřiku tedy odpadá proces zplynění celého vzorku přímo v chromatografu [14-15]. Tradičně je headspace spojován s plynovou chromatografií, setkat se ale lze i se spojením headspace a některých spektroskopických metod. Používá se například přímé spojení s hmotnostní spektrometrií, které je výhodnější, pokud není nutné analyty nejprve separovat pomocí GC. Vzácněji se lze také setkat s analýzami, které spojují headspace a infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací [11].

Headspace techniky lze v zásadě rozdělit na dvě varianty. Na ty, které jako vzorek použijí část plynné fáze, která se po určitém čase, za dané teploty a po ustanovení rovnováhy, vytvoří nad kapalným nebo pevným vzorkem. Pak se jedná o statické HS metody. Druhou variantou jsou dynamické headspace metody, kdy je vytvořená plynná fáze nejprve zachytávána v tzv. pasti, kde se analyty ještě oddělí od ostatních plynných složek a zachytí se na vlákno s vhodnou stacionární fází. Z tohoto vlákna jsou poté analyty vymývány proudem mobilní fáze na kolonu. Jedná se tedy v podstatě o spojení statické HS analýzy a SPE [10-12, 14].

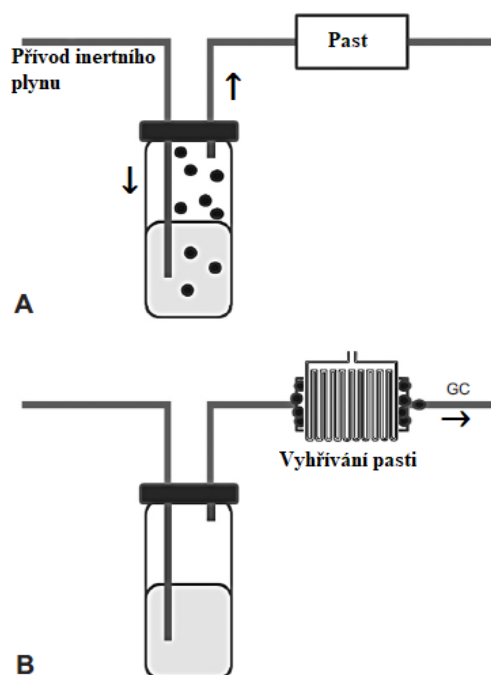
2.1.1 Statická headspace analýza

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1, statická HS analýza je v takovou „základnější a jednodušší“ variantou HS technik, kdy jsou analyty nejprve extrahovány do plynné fáze a poté nastříknuty do injektoru. Tato technika má oproti klasickému přímému nástřiku mnoho výhod. Tou nejvýraznější je, že kolona a celý systém nejsou zanášeny případnými netěkavými složkami matrice [11]. Stejně jako u jiných technik, i zde lze nástřik provést buď manuálně, nebo automaticky. Při manuální HS analýze, je vialka se vzorkem zahřívána například v termobloku a plynotěsnou stříkačkou je přes septum odebrána malá část plynné fáze, která je potom ručně nastříknuta do injektoru. Druhou variantou je použití automatických HS autosamplerů, kde se množství dávkované plynné fáze řídí buď dobou nástřiku, nebo nastříknutým objemem [11, 13-14].

2.1.2 Dynamická headspace analýza

Dynamická HS analýza je variantou klasických HS technik, základní princip je tedy stejný. Extrakce analytů do plynné fáze je zde však prováděna kontinuálně, prouděním inertního plynu nad kapalným nebo pevným vzorkem, případně je vzorek tímto inertním plynem probubláván (tato technika bývá někdy označována jako „purge and trap“) [13, 16-17]. Těkavé analyty, které jsou takto ze vzorku vytěsněny, jsou zachytávány v tzv. pasti, kde dochází k zakoncentrování na vhodnou stacionární fázi. Past je následně rychle zahřáta a analyty se uvolní na kolonu (obrázek 2.2) [11].

Díky zakoncentrování je možné dosáhnout ještě nižších hodnot limitů detekce (LOD, z anglického „limit of detection“) a kvantifikace (LOQ, z anglického „limit of quantification“) než u statické HS analýzy. Nevýhodou, nebo problémem, pak může být přítomnost vodní páry, která se může do pasti dostat při zahřívání na vysoké teploty a může pak některé analyty zastínit. Další nevýhodou, a důvodem, proč se tato technika nevyužívá tak často jako statický HS, je obtížnější kvantifikace. U statického HS stačí optimalizovat čas zahřívání tak, aby se ustanovila rovnováha mezi plynou fází a vzorkem. Zde je však nutné probublávat nebo proudit inertním plynem dostatečně dlouho, aby se vymyly všechny analyty, a navíc zvolit vhodnou stacionární fázi v pasti [14, 18].



Obrázek 2.2: Schéma dynamické headspace analýzy. (A) Vialka se vzorkem je promývána inertním plynem, analyty jsou proudem plynu vymývány do pasti. (B) Past je vyhřáta na vysokou teplotu, analyty jsou uvolněny do GC systému. (Převzato a upraveno podle [13]).

2.1.3 Kvantifikace

Plynovou chromatografií s headspace nástřikem lze využít jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu. Převažuje však využití při kvantitativních analýzách, a to jak pevných, kapalných, tak i plyných vzorků. I při využití headspace je však stále separační technikou plynová chromatografie a pro kvantifikaci se tak uplatňují v zásadě stejné varianty jako pro všechny ostatní typy nástřiku. Typicky se používá metoda externího standardu, kdy se koncentrace odečítá ze sestavené kalibrační křivky. Tato metoda je sice jednoduchá, ale pro vzorky s komplexní maticí nemusí být zcela přesná. Další variantou je metoda interního standardu. Ta díky přidavku další látky ke všem vzorkům pomáhá lépe balancovat případné změny v naměřených koncentracích způsobených komplexní maticí, je však časově náročnější. Ještě přesnější je v tomto ohledu metoda přidavku standardu, která je ale opět náročnější na provedení, a navíc je na přípravu potřeba velké množství vzorku [11, 19].

Zajímavou variantou pro HS-GC je metoda **interní normalizace**, kde se zkoumá celkové složení vzorku. V plynové chromatografii se obecně příliš nevyužívá, protože málo kdy lze zajistit, že všechny látky obsažené ve vzorku bude možné zplynit. Při použití headspace však

může mít metoda význam pro sledování složení plynné fáze, která se vytvoří v headspace prostoru. Koncentrace jednotlivých analytů je vypočítána ze sumy ploch všech píků na chromatogramu, jako poměr plochy daného píku k celkové ploše. Metoda předpokládá, že všechny analyty poskytují stejnou odezvu při stejné koncentraci, čehož v podstatě nelze dosáhnout a je tedy nutné pro výpočet zavádět přepočítávací faktory (f), které rozdílly v odezvách analytů eliminují [11]. Koncentraci analytu v procentech pak lze vyjádřit podle vztahu 2.1.

$$c_x = \frac{A_x \times f_x}{A_{celk}} \times 100, \quad (2.1)$$

kde c_x je koncentrace analytu v procentech, A_x je plocha analytu, f_x je přepočítávací faktor analytu a A_{celk} je suma ploch všech píků na chromatogramu korigovaných přepočítávacími faktory daných analytů [11].

Speciální kvantifikační technikou, kterou lze využít právě pro HS-GC, je tzv. **vícenásobná headspace extrakce**. Metoda funguje na principu opakované extrakce analytu do headspace prostoru, kdy je po každém kroku část plynné fáze odebrána a ustanovuje se nová rovnováha. Proces je opakován tak dlouho, než je všechn analyt převeden do plynné fáze – tj. je ověřeno, že s dalším krokem už se odezva analytu nezvyšuje. Kvantifikace je pak provedena, podobně jako u ostatních technik, z odezvy analytu pomocí předem stanoveného koncentračního faktoru. Výhodou zde je, že díky odstranění veškerého analytu ze vzorku je metoda odolná vůči jakýmkoli matricovým efektům [11, 20-21].

2.1.4 Základní fyzikálně-chemické parametry HS technik

Při HS analýzách, zejména těch kvantitativních, je důležitějším parametrem množství analytu, které se vyskytuje v plynné, a které v pevné nebo kapalné fázi vzorku. Případně tedy čas, po který je potřeba vialku se vzorkem zahřívat, aby se mezi těmito fázemi ustavila rovnováha a bylo možné analyty kvantitativně stanovit [11]. Velmi zjednodušeně lze říci, že množství analytu v plynné fázi v poměru ke kapalné nebo tuhé fázi vzorku, záleží na jeho těkavosti, tedy bodu varu. Čím více těkavý analyt, tím snáze bude přecházet do plynné fáze a tím dříve se ustanoví rovnováha [15]. V praxi tedy k optimalizaci metody většinou postačí zvolit dostatečně dlouhý čas a dostatečně vysokou teplotu, a několika experimenty se ujistit, že se zvyšujícími se parametry se již množství analytu v plynné fázi nemění – tedy rovnováha se ustanovila [15, 16].

Distribuce analytu mezi obě fáze však záleží na řadě dalších faktorů, zejména jeho termodynamických vlastnostech nebo na afinitě k pevné nebo kapalně fázi, tedy k rozpouštědlu, které bylo použito k rozpuštění vzorku. Nejlépe lze všechny tyto parametry vyjádřit a shrnout pomocí **distribučního koeficientu (K)** daného analytu, který je vyjádřen vztahem 2.2.

$$K = \frac{c_{vz}}{c_g}, \quad (2.2)$$

kde K je distribuční koeficient daného analytu, c_{vz} je koncentrace analytu ve fázi (pevné nebo kapalně) vzorku při ustanovení rovnováhy a c_g je koncentrace analytu v plynné fázi při ustanovení rovnováhy. Ze vztahu 2.2 lze snadno vyvodit, že čím vyšší K , tím obtížněji bude analyt přecházet do plynné fáze a bude mít relativně vyšší limit detekce a kvantifikace. A obráceně – analyt s nízkou hodnotou K přejde do plynné fáze snadno a prakticky všechen a bude mít díky tomu, při použití HS metody, nižší limity detekce i kvantifikace [15].

Jak již bylo zmíněno dříve, hodnota distribučního koeficientu není pouze vlastností dané látky, ale závisí také na matici vzorku (tu nejčastěji reprezentuje použité rozpouštědlo) a na teplotě, při které je vialka se vzorkem zahřívána (tabulka 2.1). Aby bylo možné vztah takto použít, je nutné vzorek nastříknout do systému až po ustanovení rovnováhy – tedy metoda statické HS analýzy (kapitola 2.1.1) [11, 15].

Tabulka 2.1: Přehled hodnot distribučního koeficientu pro vybrané analyty za různých teplot. Převzato a upraveno podle [15], [16]

	K , voda/vzduch, 40 °C	K , voda/vzduch, 60 °C
cyklohexan	0,08	0,04
n-hexan	0,14	0,04
tetrachlorethylen	1,48	1,27
o-xylen	2,44	1,31
toluen	2,82	1,77
benzen	2,90	2,27
ethyl acetát	62,4	29,3
2-propanol	825	286
ethanol	1355	511
dioxane	1618	642

Tabulka 2.1 poskytuje přehled vybraných analytů a jejich distribučních koeficientů mezi vodou a vzduchem při dvou teplotách. Na příkladu ethanolu lze pozorovat, že při zvýšení teploty o 20 °C klesne jeho distribuční koeficient téměř třikrát a ethanol tedy mnohem snadněji přechází do plynné fáze. Konkrétně u ethanolu je toto dáno vodíkovými vazbami, které jsou při vyšších teplotách porušeny. I u ostatních analytů lze jednoduše vypočítat, že teplota má na distribuční koeficient značný vliv [11].

Další možností, jak lze snížit hodnotu K , je v případě vodných roztoků použití anorganických solí, které sníží rozpustnost polárních látek ve vodě, a tedy usnadní jejich přechod do plynné fáze. Nejčastěji se k tomuto účelu používá chlorid amonný nebo chlorid sodný. Ovšem efekt zde není tak jednoznačný jako u zvyšování teploty a je v praxi použitelný zejména pro látky, které mají vysoké hodnoty K . Látky s nízkými hodnotami K , jako třeba cyklohexan nebo n-hexan, ovlivněny téměř nebudou [11, 16, 22].

Druhým parametrem, který je při popisu teorie headspace technik důležitý, je **fázový poměr (β)**, který lze vyjádřit vztahem 2.3.

$$\beta = \frac{V_g}{V_{vz}}, \quad (2.3)$$

kde β je fázový poměr, V_g objem plynné fáze nad vzorkem po dosažení rovnováhy a V_{vz} je objem fáze pevného nebo kapalného vzorku po dosažení rovnováhy [11]. Ideální jsou nízké hodnoty β , při kterých budou mít těkavé sloučeniny větší odezvu – se snižováním V_g totiž poroste hodnota c_{vz} a větší koncentrace bude v teorii znamenat větší odezvu. Nicméně snížení hodnoty β , tedy v podstatě zvětšení objemu vzorku, nepovede ke zvýšení odezvy vždy. Pokud se zvětší objem vzorku (zvětší se i β), budou látky s vysokými hodnotami K hůře přecházet do plynné fáze, koncentrace zde se tedy příliš nezvýší a vyšší nebude ani odezva. U látek s nízkými hodnotami K , by byla situace opačná [11, 23].

Výslednou koncentraci analytu v plynné fázi po ustanovení rovnováhy lze popsat vztahem 2.4.

$$c_g = \frac{c_0}{K + \beta}, \quad (2.4)$$

kde c_g je koncentrace v plynné fázi, c_0 je počáteční koncentrace ve vzorku, K je rozdělovací koeficient daného analytu a β je fázový poměr. Ze vztahu 2.3 vyplývá, že nejlepší odezvu bude dosaženo při současném snižování K i β [11, 23].

2.1.5 Reakce v HS vialce

Protože je některé méně těkavé látky obtížné stanovit i pomocí HS-GC, využívají se v plynové chromatografii derivatizace a další podobné reakce poměrně často. Při většině reakcí dochází ke generování těkavějších derivátů původních analytů. Velkou výhodou HS technik je možnost provedení těchto reakcí přímo ve vialce, v termostatu autosampleru [16]. Při nástřiku vzorku do chromatografu navíc dochází k odeběrání produktů reakce z headspace prostoru, což pomáhá posouvat rovnováhu ve prospěch produktů a urychlovat reakci [11].

Typickým příkladem derivatizace v GC je esterifikace mastných kyselin. Při provedení takové reakce v HS analýzách tedy stačí do vialky se vzorkem, který obsahuje mastnou kyselinu, přidat například methanol a kyselinu sírovou (pro vznik kyselého prostředí, jako katalyzátor) a vialku dostatečně dlouho (podle typu reakce, typicky 30-60 minut) zahřívat v termostatu. Do GC injektoru se poté nastříkne rovnou plynná fáze se vzniklými methyl estery stanovovaných kyselin, což výrazně snižuje časové nároky na provedení a umožňuje i takové analýzy plně automatizovat. Dalšími derivatizačními reakcemi jsou například transesterifikace, acetylace, silylace nebo alkylace [12, 16].

Provedení derivatizace je v headspace metodách jednodušší než u klasického přímého nástřiku, kde se zpravidla provádí „ručně“, mimo přístroj. Je však potřeba dávat pozor na některá omezení, která toto přináší. Prvním problémem je, že sama derivatizační činidla jsou z velké většiny těkavé látky, a protože se přidávají v nadbytku, je téměř jisté, že se objeví na chromatogramu, kde mohou interferovat s jinými analyty. Dalším problémem může být zvyšování tlaku ve vialce, způsobené zahříváním přidaných těkavých látek. Řešením jsou však speciální septa, která umožňují během derivatizace přetlak uvolnit [11, 16].

Kromě klasických derivatizačních reakcí se lze setkat i s některými speciálními aplikacemi. Příkladem může být stanovení kyanidu v krvi, který je ze své vázané formy uvolněn pomocí ledové kyseliny octové jako těkavý kyanovodík. Dále lze zmínit stanovení 3-hydroxybutyrátu v plazmě, který je po provedení enzymatické reakce analyzován jako aceton [11].

Nakonec je možné tyto reakce v HS-GC využít i úplně opačně – tedy ke generování netěkavých látek z těch těkavých. To se využívá v případě, že píky těchto látek zastiňují na chromatogramu stanovované analyty. Příkladem může být tvorba sodných solí mastných kyselin pomocí NaOH [11].

2.1.6 Využití GC-HS v praxi

S analýzou těkavých látek se lze, v rámci kontroly kvality produktů, setkat v mnoha výrobních odvětvích, nejtypičtěji v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Přestože existuje více možností, jak lze těkavé látky analyzovat (například pomocí SPE nebo jiných typů extrakce), je headspace nejvíce zastoupenou technikou [13]. Hlavním důvodem, který má své opodstatnění zejména při rutinních analýzách, je fakt, že vzorek často není nutné vůbec upravovat. To pomáhá šetřit čas, snižovat riziko vzniku nejrůznějších systematických chyb, snižovat finanční náklady na provedení analýz, a navíc jsou analýzy ještě trochu šetrnější k přírodě. HS metody bývají také často charakteristické dobrou opakovatelností výsledků a nižšími hodnotami LOD a LOQ než ostatní analytické techniky vhodné pro analýzu těkavých látek [24, 25].

Jak již bylo zmíněno, důležitou oblastí pro využití HS metod v praxi je potravinářský průmysl. Mezi často analyzované produkty patří alkoholické nápoje, které obsahují poměrně velké množství těkavých látek, a to i těch nežádoucích – jako například methanol nebo různé aldehydy, jejichž množství nesmí překročit stanovené limity [26-29]. Dalším příkladem mohou být analýzy aroma profilů aromatických potravin, které pomáhají odhalit jejich

původ a jsou tak důležité pro ochranu spotřebitele. Lze tedy nalézt výzkumy zabývající se analýzou těkavých složek sýrů, fermentovaných potravin nebo třeba sušeného masa [17, 30-31].

Dalším odvětvím je farmaceutický průmysl a zdravotnictví. V hotových léčích nebo i jednotlivých excipientech a účinných látkách se těkavé látky vyskytují často jako zbytková rozpouštědla, která byla přidávána během výroby. HS metody pro stanovení zbytkových rozpouštědel v excipientech nebo účinných látkách léčiv jsou i součástí lékopisů jako referenční metody [32-34]. Ve zdravotnictví lze headspace využít například pro stanovení ethanolu v krvi nebo jiných těkavých látek v moči, kdy je velmi výhodné, že díky nízkým nárokům na úpravu a manipulaci se vzorkem nedochází k nebezpečným kontaminacím [13, 22, 35]. Zajímavou průmyslovou aplikací může být také kontrola kvality motorové nafty, kdy se pomocí HS-GC stanovují těkavé sloučeniny které negativně ovlivňují tzv. cetanové číslo, které slouží jako ukazatel kvality nafty [13, 36].

HS-GC lze, kromě všech aplikací pro přímé kvalitativní nebo kvantitativní stanovení, využít také pro určení fyzikálně-chemických parametrů látek nebo reakcí. Je tak možné stanovit například parciální tlak, čehož lze využít při sledování těkavosti toxických látek. Dále lze určit aktivní nebo rozdělovací koeficienty, které jako základní parametry látek poslouží pro další fyzikálně-chemické výpočty [11].

2.2 Analýza piva a vstupních surovin

Přestože počátky výroby a konzumace piva mohou být datovány až 8000 let zpět, je jeho analýza stále mnohdy náročný a nejasný proces, a to zejména kvůli proměnlivému složení a neúplné legislativě [37]. Pivo je tradičně vyráběno (vařeno) ze čtyř základních ingrediencí – sladového ječmene (případně jiného zdroje škrobu), kvasnic, chmele a vody. Variant zpracování těchto surovin a samotného procesu vaření piva je však nespočet. Díky tomu se rozlišuje několik druhů piv a zároveň je tím způsobeno proměnlivé chemické složení. Zastoupení různých látek se také mění v čase, což často bývá nežádoucí proces, který chuť piva ovlivňuje negativně [37-38]. K analýze piva lze v zásadě přistupovat dvěma způsoby – buď se kontrolují vstupní suroviny, nebo konečný produkt. V praxi se samozřejmě v různé míře využívají oba způsoby, hlavně v závislosti na tom, který analyt se sleduje [37].

Problémem při kontrole kvality piva je, že v České republice, potažmo ani Evropské unii, neexistuje žádné závazné nařízení, které by výrobce přimělo analyzovat pivo konkrétními

předepsanými metodami a zároveň dodržovat limitní koncentrace a obsahy daných látek. Pivovary jsou pouze povinny řídit se vyhláškami (případně nařízeními Evropské komise), které upravují limity některých nebezpečných látek v surovinách, které se pro výrobu piva používají. Příkladem mohou být třeba dusičnany, alifatické chlorované uhlovodíky nebo benzen v pitné vodě a vybrané pesticidy v obilovinách [39].

2.2.1 Plynová chromatografie v analýze piva a vstupních surovin

Plynovou chromatografií lze analyzovat hned několik skupin látek běžně se vyskytujících v pivu nebo ve vstupních surovinách. Typickým příkladem jsou těkavé látky, které jsou zodpovědné za chuť a aroma. Dále to mohou být například mastné kyseliny, vicinální diketony, nebo esenciální oleje přítomné v chmelu [6].

Existuje velké množství odrůd chmele, které se pro výrobu piva běžně používají. Každá z nich je charakteristická složením těkavých látek, které je ovlivněno i geografickou polohou pěstování a klimatem [40-41]. Esenciální oleje chmele obsahují až 1000 různých terpenů, z nichž pouze asi 400 bylo identifikováno. V praxi se ale stanovují jen látky, které mají na vůni chmele největší vliv a nacházejí se ve většině odrůd. Jedná se o myrcen, linalool, humulen a β -karyofylen [42-43]. Tyto látky se zpravidla analyzují pomocí GC-MS (MS, z anglického „mass spectrometry“), vzorek je ale nutné nejprve upravit. Možností jsou různé typy extrakcí – používá se například extrakce organickým rozpouštědlem nebo tekutým oxidem uhličitým [41, 43]. Další možností je využití HS technik [40, 44].

Další skupinou látek, analyzovaných v pivu pomocí GC, jsou mastné kyseliny v hotovém produktu. Jejich obsah je ovlivněn výběrem chmele a sladu, konkrétními výrobními procesy a metabolismem a zráním kvasnic. Některé mastné kyseliny se také mohou objevovat v hotovém pivu až po čase, vlivem nevhodného skladování [45, 46]. Pro GC analýzu musí být vzorek opět vhodně upraven, používá se například extrakce z kapaliny do kapaliny nebo parní destilace [46, 47].

Nejběžnějšími vicinální diketony vyskytujícími se v pivu jsou 2,3-butandion a 2,3-pentadion. Jejich přítomnost se vyznačuje chutí po másle. Bylo také zjištěno, že jejich poměr souvisí s obsahem mikroorganismů během kvašení [48]. Analýza se provádí typicky pomocí HS-GC-ECD (ECD, z anglického „electron capture detector“), případně se používá MS detektor nebo FID (FID, z anglického „flame ionization detector“) [49].

2.2.2 Analýza těkavých látek v pivu

Kvašením, což je jeden z důležitých kroků při výrobě piva, vzniká ethanol a další těkavé látky – některé ostatní alkoholy, estery nebo kyseliny [50]. Tyto látky jsou v pivu zodpovědné zejména za vůni, která poté výrazně ovlivňuje i chuť, a proto je důležité je v pivu sledovat, porozumět jejich původu a případně podle toho i vybírat vhodné vstupní suroviny [51]. Tradičně se těkavé látky, nejen v pivu, stanovují plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí nebo s plamenově ionizační detekcí. Protože ale pivo obsahuje velké množství ostatních netěkavých látek, bývá problém s přímým nástřikem (viz kapitola 2.1), kdy může být injektor nebo ostatní části plynového chromatografu ucpávány. Analyty tedy musí být nejprve z matrice extrahovány, čehož je dosaženo při použití HS, SPE nebo kombinaci obojího [52-56].

Kvalitativní analýzou těkavých látek v pivu, bylo zjištěno, že jednotlivé skupiny analytů ovlivňují chuť i vůni piva různě, a proto může být pro sládky zajímavé zkoumat jejich množství a poměr, přestože neexistují žádné závazné limity [56]. Například estery jsou zodpovědné za ovocnou chuť, alkoholy, hlavně ethanol, za typickou chuť alkoholických produktů, karbonylové sloučeniny, které se objevují při dlouhém stání piva, zase mohou být zodpovědné za zatuchlý zápach a karboxylové kyseliny zvýrazňují ovocnou nebo hořkou až žluklou chuť [56]. Některé tyto látky (například ethyl acetát, isoamyl acetát a mnoho dalších) byly tedy vybrány jako markery chuti a aroma a bývají rutinně analyzovány v pivovarech pomocí HS-SPE-GC-FID při kontrole kvality [52, 57].

2.3 Metoda „Ethanol jako interní standard“

Pro stanovení těkavých látek v alkoholických produktech byla již dříve navržena metoda, která jako interní standard používá ethanol, přítomný v každém alkoholickém nápoji [7]. Její největší výhodou oproti metodám využívajícím tradiční interní standard je, že vzorky není před analýzou potřeba upravovat (přidávat interní standard). To by v teorii mělo zaručit správnější a přesnější výsledky, neboť jakákoli úprava a manipulace se vzorkem mohou být zdroji vzniku systematických chyb a zvyšují také nejistotu výsledku stanovení. Tato domněnka byla potvrzena na několika desítkách vzorků alkoholických nápojů, kdy navrhovaná metoda poskytla lepší nebo minimálně stejné výsledky jako tradiční metody interního standardu [8-9].

Další výhodou metody je možnost zjednodušení výpočtu koncentrace těkavých látek ve vzorku. Výpočet koncentrace analytu ve vzorku při použití metody interního standardu popisuje následující rovnice:

$$c_x(\text{mg/kg}) = RRF_x^{IS} \times \frac{A_x}{A_{IS}} \times c_{IS}(\text{mg/kg}), \quad (2.5)$$

kde c_x je koncentrace analytu, RRF_x^{IS} je relativní odezvový faktor analytu k internímu standardu, A_x je plocha analytu, A_{IS} je plocha interního standardu a c_{IS} je koncentrace interního standardu. U většiny alkoholických nápojů se hodnoty koncentrace uvádějí v jednotkách mg/l AA (absolutní alkohol) a hodnotu získanou ze vzorce 2.5 je tedy dále nutné přepočíst pomocí rovnice:

$$c_x(\text{mg/l AA}) = \frac{c_x(\text{mg/kg}) \times \rho_{vz} \times 100\%}{ABV(\%)}, \quad (2.6)$$

kde c_x je koncentrace analytu, ρ_{vz} je hustota vzorku a ABV (z anglického „alcohol by volume“) je obsah ethanolu v destilátu. Pro stanovení koncentrace těkavých látek je tedy ještě nutné stanovit hustotu vzorku a obsah ethanolu. Při použití metody „ethanol jako interní standard“ je ale možné upravit vzorec 2.5 dosazením hodnoty hustoty ethanolu (789300 mg/l) za c_{IS} v jednotkách mg/l AA. Koncentrace analytu je pak vypočtena jako:

$$c_x(\text{mg/l AA}) = RRF_x^{EtOH} \times \frac{A_x}{A_{EtOH}} \times 789300, \quad (2.7)$$

kde RRF_x^{EtOH} je relativní odezvový faktor analytu k ethanolu jako internímu standardu a A_{EtOH} je plocha ethanolu. Pro stanovení koncentrace analytu tedy není nutné znát hustotu vzorku ani obsah ethanolu [7].

3. Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

Acetaldehyd (99,5 %, Fluka™, USA)
n-butanol (99,7 %, Sigma-Aldrich, s.r.o., USA)
Butyl acetát (99 %, Sigma-Aldrich, s.r.o., USA)
Deionizovaná voda, systém Milli-Q (Millipore, USA)
Ethanol (99,8 %, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
Ethyl acetát (99,5 %, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
Isoamyl acetát (97 %, SAFC®, USA)
Isobutanol (99 %, Fluka™, USA)
Isobutyl acetát (99,8 %, Sigma-Aldrich, s.r.o., USA)
Ethyl butyrát (99 %, Sigma-Aldrich, s.r.o., USA)
Ethyl hexanoát (99 %, Sigma-Aldrich, s.r.o., USA)
2-methylbutanol (99,8 %, Sigma-Aldrich, s.r.o., USA)
3-methylbutanol (98 %, Sigma-Aldrich, s.r.o., USA)
1-propanol (99,7 %, Sigma-Aldrich, s.r.o., USA)

3.2 Seznam měřených vzorků

Vzorek č.1 - světlý ležák 11° (4,6 % obj.)
Vzorek č.2 - světlý ležák 12° (5,2 % obj.)
Vzorek č.3 - prémiový světlý ležák 11,4° (5,0 % obj.)
Vzorek č.4 - světlé nealkoholické pivo IPA (<0,5 % obj.)
Vzorek č.5 - světlé výčepní pivo 10° (4,1 % obj.)
Vzorek č.6 - světlý ležák 11° (4,6 % obj.)
Vzorek č.7 - tmavý nepasterizovaný ležák 12° (5,0 % obj.)
Vzorek č.8 - polotmavý ležák speciál (5,7 % obj.)
Vzorek č.9 - New England IPA 15° (6,5 % obj.)

Pozn. - pro přehlednější uvádění výsledků byly vzorky očíslovány a všechny výsledky byly dále prezentovány pouze pod těmito čísly.

3.3 Instrumentace, experimentální podmínky analýzy

Všechny analýzy byly prováděna v laboratořích Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem a headspace nástřikem Agilent 7890B (Agilent Technologies, Inc., USA). Separace byla prováděna na koloně DB-WAX s délkou 60 m, vnitřním průměrem 0,32 mm a tloušťkou filmu 0,25 μm . Nosným plynem bylo helium (Helium 5.0, Air Products and Chemicals, Inc., USA). Pro FID byl dále použit stlačený vzduch a vodík, pro make-up detektoru byl použit dusík (vše Air Products and Chemicals, Inc., USA). Sběr a vyhodnocování naměřených dat bylo prováděno v softwaru Clarity (DataApex s.r.o., Česká republika).

Experimenty byly prováděna za těchto konkrétních podmínek:

Nastavení plynového chromatografu:

- Teplota detektoru: 230 °C
- Teplota injektoru: 220 °C
- Teplotní program: 47 °C, držení 3 min, po 10 °C/min do 77 °C, po 50 °C/min do 150 °C, držení 1,5 min
- Počáteční průtokový objem plynu: 3,04 ml/min
- Tlak plynu: 150 kPa
- FID průtoková rychlost vzduchu: 400 ml/min
- FID průtoková rychlost vodíku: 30 ml/min
- FID průtoková rychlost make-up dusíku: 25 ml/min
- Split poměr: 10:1

Nastavení headspace autosampleru:

- Teplota termostatování: 70 °C
- Teplota jehly: 85 °C
- Doba termostatování: 12 min

3.4 Příprava roztoků a vzorků

Pro sestavení kalibrační závislosti a následná další stanovení byla připravena sada zásobních a kalibračních roztoků. Analyty byly rozděleny do dvou skupin (a tedy byly připraveny dva roztoky), podle toho, jaká měla být jejich výsledná koncentrace v roztoku. Koncentrace analytů v těchto dvou skupinách se lišily o jeden až dva řády, protože se tyto skupiny látek v pivu vyskytují v různých koncentracích a bylo tedy cílem, aby vytvořená kalibrační závislost spolehlivě pokryla běžný rozsah koncentrací pro každý analyt.

Roztok A byl připraven do 100ml odměrné baňky a obsahoval: 100 μ l acetaldehydu, 50 μ l isoamyl acetátu, 100 μ l ethyl acetátu, 100 μ l 1-propanolu, 100 μ l isobutanolu, 400 μ l 3-methylbutanolu a 200 μ l 2-methylbutanolu. Odměrná baňka byla po rysku doplněna vodou. (Pozn. – isomery 2-methylbutanolu a 3-methylbutanolu byly dále vyhodnocovány jako jeden analyt (ve výše popsanych podmínkách není možné je separovat), a tedy všechny výsledky jsou následně udávány jako součet obou koncentrací, přičemž analyt je souhrnně označován jako isoamylol).

Roztok B byl připraven stejným způsobem jako roztok A, a obsahoval: 100 μ l ethyl hexanoátu, 20 μ l ethyl butyrátu, 20 μ l butyl acetátu a 20 μ l isobutyl acetátu.

Následně byl připraven zásobní roztok C, který vznikl smícháním 16 ml roztoku A, 2 ml roztoku B a 40 ml ethanolu (pro následnou kvantifikaci pomocí metody „ethanol jako interní standard“) a doplněním vodou do 200ml odměrné baňky. Všechny výše popsané pipetované objemy (včetně doplňované vody) byly váženy na analytických vahách (Sartorius TE214S-0CE, Sartorius AG, Německo, s maximální váživostí 210 g a přesností na 0,1 mg). Výsledná koncentrace pak byla, pomocí získaných navážek, vyjádřena v jednotkách mg/l.

Sada kalibračních roztoků byla připravena ředěním (a opět vážením) zásobního roztoku vodou do 50ml odměrných baněk. Objemy zásobního roztoku byly následující: 0,25 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml a 30 ml. Roztoky byly označeny čísly 1-8, kdy roztok č. 1 byl ten s nejnižšími koncentracemi analytů.

Dále byl připraven zásobní roztok interního standardu 1-butanolu. Roztok byl připraven přidáním 100 μ l 1-butanolu do 100ml odměrné baňky s ethanolem. Do každého měřeného vzorku pak bylo přidáno 100 μ l tohoto roztoku a výsledná koncentrace n-butanolu odpovídala 8,08 mg/l. Všechny výsledky pro metodu „ethanol jako interní standard“ byly na tento přírůstek ethanolu zpětně korigovány.

Vzorky byly připraveny pipetováním 10 ml piva do vialky s odváženými 4 g síranu amonného, který pomáhá k uvolnění analytů z matrice do headspace prostoru.

3.5 Stanovení ethanolu v pivu

Koncentrace těkavých analytů v pivu jsou uváděny v jednotkách mg/l, zatímco metoda „ethanol jako interní standard“ tak, jak je popsána v kapitole 2.3 poskytuje výsledky v jednotkách mg/l AA. Pro přepočítání mezi těmito jednotkami tak bylo třeba v každém stanovovaném vzorku zároveň stanovit ethanol v jednotkách mg/l. Pro toto stanovení byla tedy nejprve sestrojena kalibrační závislost v rozsahu 1–9 objemových procent (celkem pět kalibračních bodů), což víceméně pokrývá rozsah nejběžněji prodávaných a analyzovaných piv. Koncentrace z objemových procent byla následně převedena na jednotky mg/l pomocí nástroje [58], který počítá i s objemovou kontrakcí.

Aby však každý vzorek nemusel být analyzován dvakrát, nejprve stanovení ethanolu a až poté stanovení analytů, byla obě stanovení zkombinována do jedné metody. Tedy v připravené sadě kalibračních roztoků se měnila koncentrace ethanolu i analytů stejně, tak, jak je popsáno v kapitole 3.4 o přípravě roztoků. Pro vyhodnocení všech dat byl nejprve vždy stanoven ethanol dle sestrojené kalibrační závislosti a až následně (vzhledem k ethanolu) byly stanoveny analyty.

Pro ověření správnosti stanovení ethanolu v pivu byla určena výtěžnost této metody, kdy hodnoty naměřené pomocí plynové chromatografie byly porovnány s hodnotami naměřenými pomocí přístroje Alcoalyzer Beer (Anton Paar Czech Republic s.r.o., Česká republika), který je určen přímo ke stanovení ethanolu v alkoholických nápojích a pracuje na principu infračervené spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR, z anglického „near-infrared spectrometry“). Pro přepočítání výsledků na jednotky mg/l byla dále měřena hustota vzorků piva pomocí přístroje Density meter DMA 4500 m (Anton Paar Czech Republic s.r.o., Česká republika). Výtěžnost byla hodnocena pro šest vzorků piva pokrývajících co největší rozsah obsahu ethanolu. Konkrétně se jednalo o vzorky č. 4–9, pokrývající rozsah ethanolu <0,5 – 6,5 objemových procent. Výtěžnost metody v procentech poté byla stanovena jako:

$$R_x = \frac{c_{GC}}{c_{Paar}} \times 100 \%, \quad (3.1)$$

kde R_x je výtěžnost metody (z anglického „recovery“), c_{GC} je koncentrace ethanolu stanovená plynovou chromatografií v mg/l a c_{Paar} je koncentrace ethanolu stanovená pomocí infračervené spektroskopie v mg/l.

Pro metodu stanovení ethanolu v pivu byly také určeny hodnoty LOD a LOQ, které byly vypočteny ze směrodatných odchylek (s) koncentrace ethanolu stanoveného ve vzorku nealkoholického piva měřeného desetkrát.

$$LOQ = 10 \times s \quad (3.2).$$

$$LOD = 3 \times s \quad (3.3).$$

Dále byla pro stanovení ethanolu určena opakovatelnost výsledků. 3 vzorky piva (č. 4, 6 a 9) byly měřeny šestkrát a z výsledků koncentrace ethanolu byla opakovatelnost stanovena jako:

$$r = s \times 2,8, \quad (3.4)$$

kde r je hodnota opakovatelnosti (repeatability) v jednotkách mg/l a s je směrodatná odchylka ze šesti získaných výsledků.

3.6 Sledované metrologické parametry pro stanovení těkavých látek v pivu

Pro obě sledované metody (tradiční a navrhovaný interní standard) byly měřeny a vyhodnoceny následující metrologické parametry. Ty byly zvoleny tak, aby bylo možné obě metody alespoň hrubě porovnat, a určit, zda výsledky, které poskytují, jsou správné a přesné. Stanovení byla prováděna pro oba interní standardy najednou (v jedné vialce), ale vyhodnocována zvlášť.

3.6.1 Linearita

Pro ověření lineárního rozsahu obou metod interních standardů byla proměřena a vyhodnocena sada osmi připravených kalibračních roztoků (kapitola 3.4). Každý roztok byl měřen třikrát a výsledky byly zpracovány z průměrných hodnot z těchto třech stanovení. Linearita pro interní standard n-butanol byla hodnocena vynesáním poměrů ploch analytu a interního standardu na osu y a poměrů koncentrací analytu a interního standardu na osu x . Pro každý analyt byl pak z těchto hodnot určen koeficient determinace R^2 .

Pro interní standard ethanol byl zvolen mírně odlišný postup, neboť, jak je zmíněno v kapitole 3.5, pro následné vyhodnocení analytů ve vzorcích bylo potřeba nejprve stanovit

koncentraci ethanolu a ta tedy byla v sadě kalibračních roztoků proměnná, a ne stále stejné, jako u interního standardu n-butanolu. Pokud by byl tedy zvolen postup popsany výše – vynášení poměrů ploch a koncentrací, nebyla by výsledkem žádná křivka, ale teoreticky pouze jeden bod. Poměr ploch, a tedy i poměr koncentrací všech analytů ku internímu standardu byl stále stejný, protože kalibrační roztoky byly připraveny ředěním zásobního roztoku vodou a koncentrace ethanolu i analytů tedy klesala vždy stejným poměrem. Lineární rozsah pro tuto metodu byl tedy hodnocen vnesením poměru ploch analytu a interního standardu na osu y a koncentrace analytu na osu x . Očekávaným výsledkem pro toto hodnocení pak byla „vodorovná“ závislost, protože pro každou vnesenou koncentraci na ose x by měl být poměr ploch na ose y stejný.

Ze sady proměřených kalibračních roztoků byly také pro obě metody a všechny analyty stanoveny relativní odezvové faktory, se kterými bylo dále počítáno ve všech dalších stanoveních.

3.6.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost výsledků byla hodnocena pro šestkrát měřený vzorek č. 6. Byl použit obdobný výpočet jako pro případ opakovatelnosti stanovení ethanolu (3.4), pouze byly hodnoty vyjádřeny relativně, v procentech, vůči naměřené koncentraci daného analytu ve vzorku.

$$r_{rel} = \frac{(s \times 2,8)}{\bar{x}} \times 100 \%, \quad (3.5)$$

kde r_{rel} je opakovatelnost výsledků vyjádřená v procentech, s je směrodatná odchylka ze souboru hodnot a \bar{x} je aritmetický průměre těchto hodnot. Pokud nebyl analyt ve vzorku detekován nebo jeho koncentrace byla pod limitem kvantifikace, byla pro porovnání metod použita hodnota ze šestkrát měřeného kalibračního roztoku č. 5.

3.6.3 Limity detekce a kvantifikace

Limity detekce a kvantifikace byly stanoveny ze směrodatných odchylek koncentrací analytů naměřených v připraveném roztoku s nízkými koncentracemi. Celkem bylo provedeno 9 stanovení a limity detekce a kvantifikace pak byly z vypočtených koncentrací analytů a jejich směrodatných odchylek (s) stanoveny stejně jako v případě stanovení LOD a LOQ pro ethanol, podle vzorců 3.2 a 3.3

3.6.4 Výtěžnost

Výtěžnost, byla pro obě metody hodnocena z koncentrací analytů naměřených ve vzorcích a vzorcích s přidavkem. Pro analýzu byly použity vzorky č. 1-3. Vzorky s přidavkem byly připraveny smísením 9 ml vzorku a 1 ml roztoku C, tak aby byl zachován výsledný objem ve vialce. Pro vzorky s přidavkem byla pomocí směšovací rovnice vypočtena očekávaná koncentrace analytu a výtěžnost metody byla vypočtena jako poměr naměřené a vypočtené koncentrace ve vzorku s přidavkem:

$$R_x = \frac{c_{změř}}{c_{teor}} \times 100 \%, \quad (3.6)$$

kde R_x je výtěžnost, $c_{změř}$ je koncentrace analytu naměřená ve vzorku s přidavkem v mg/l a c_{teor} je vypočtená koncentrace analytu ve vzorku s přidavkem v mg/l.

3.7 Statistické zpracování dat

Pro zpracování výsledků byl použit program Microsoft Excel (Microsoft Corporation s.r.o., USA).

Výsledky pro stanovené koncentrace těkavých látek v pivu byly, tam kde to bylo možné, hodnoceny pomocí Deanova-Dixonova testu na výskyt odlehlých hodnot a v případě pozitivního výsledku byly tyto hodnoty odstraněny z dalšího zpracování.

Pro vyjádření koncentrace analytů v kalibračních roztocích byla pro všechny analyty ve všech kalibračních roztocích vypočtena nejistota U . Nejprve byla podle vztahu 3.7 vypočtena hodnota U pro koncentraci každé složky roztoku.

$$U = \left(\frac{0,1}{\sqrt{3}}\right)/m, \quad (3.7)$$

Kde 0,1 je přesnost vah v mg a m je navážka přidávané složky v mg. Výsledná nejistota pro koncentraci analytu v kalibračních roztocích byla následně vypočtena z nejistot všech přidávaných složek roztoku (3.8).

$$U = 2 \times \sqrt{U_A^2 + U_B^2 + U_{voda}^2 + U_{EtOH}^2 + U_x^2} \quad (3.8)$$

Kde U_A je nejistota pro hodnotu koncentrací z roztoku A, U_B je nejistota pro hodnotu koncentrací z roztoku B, U_{voda} je nejistota pro koncentraci přidávané vody, U_{EtOH} je nejistota pro koncentraci přidávaného ethanolu a U_x je nejistota koncentrace analytu.

Pro uvádění výsledků koncentrací ve vzorcích byla pro každý analyt vypočtena rozšířená nejistota měření podle vzorce 3.9.

$$u_i = \sqrt{r_i^2 + \left(\sqrt{\frac{\sum(\bar{x}-x_n)^2}{n}}\right)^2} \times 2, \quad (3.9)$$

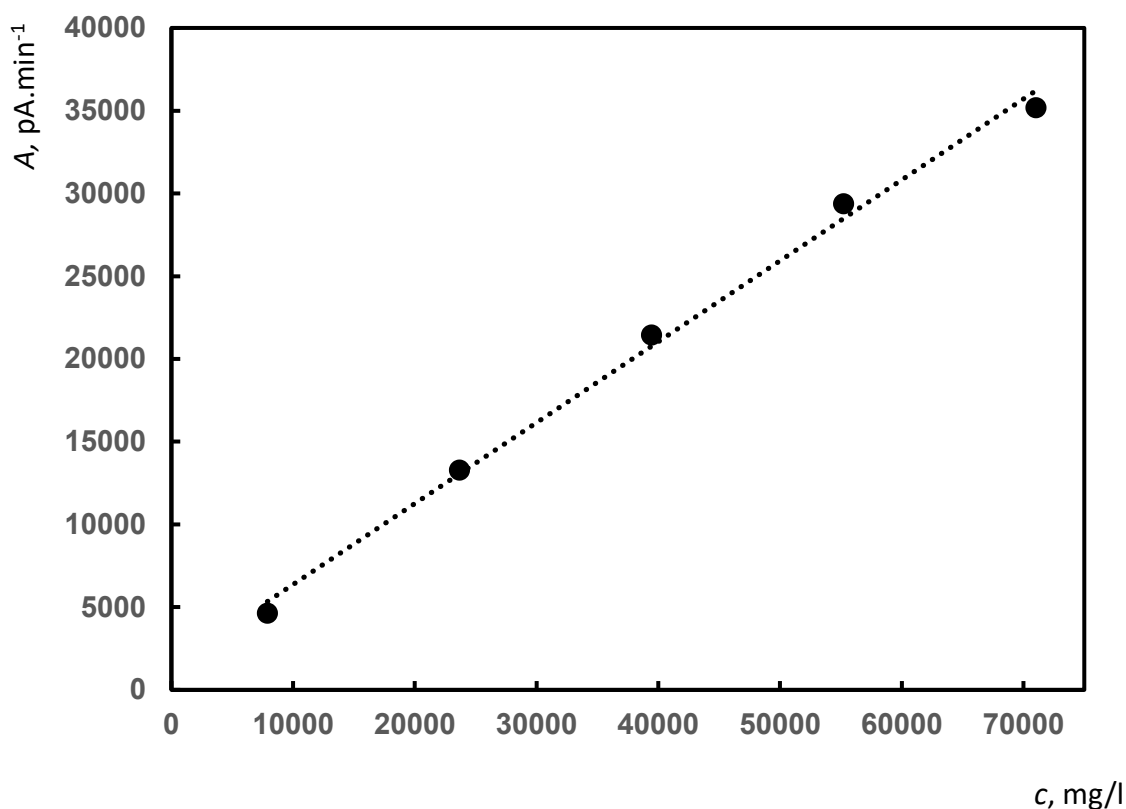
Kde u_i je nejistota výsledku pro koncentraci daného analytu v mg/l, r_i je hodnota opakovatelnosti pro daný analyt v mg/l, \bar{x} je aritmetický průměr z výsledků stanovení koncentrace v mg/l, x_n je koncentrace analytu v mg/l a n je počet opakování.

Výsledky koncentrací analytů ve vzorcích byly pro obě metody a 5 vzorků piva porovnány pomocí analýzy rozptylu (ANOVA, z anglického „analysis of variance“), která byla provedena v softwaru Microsoft excel. Narozdíl od jiných běžně používaných statistických nástrojů, jako například studentův t-test, ANOVA umožňuje porovnávat i hodnoty z více skupin, které jsou ovlivněny více než jedním parametrem. Tedy bylo možné porovnat výsledky pro jeden konkrétní analyt naměřený v pěti vzorcích piva a třemi různými metodami (IS n-butanol, IS ethanol a NIR), přičemž ještě každé stanovení proběhlo minimálně dvakrát. Díky tomuto zhodnocení bylo možné porovnat výsledky jednotlivých metod a určit, zdali jsou výsledky shodné a metody by tedy bylo možné používat v praxi s vědomím, že poskytují rovnocenné výsledky. Výsledným parametrem pro porovnání výsledků byla p-hodnota. Pokud nabyla hodnoty menší než 0,05 (pro hladinu spolehlivosti 95 %) bylo závěrem, že výsledky analýzy jsou statisticky významné a nemohou tak být považovány za statisticky shodné. Pokud byla naopak p-hodnota větší než 0,05, bylo výsledkem, že naměřené hodnoty jsou statisticky nevýznamné, a tedy statisticky shodné.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Stanovení ethanolu v pivu

Pro stanovení ethanolu v pivu byla sestrojena kalibrační závislost odezvy ethanolu na jeho koncentraci (obrázek 4.1). Z naměřených hodnot byl pro kalibrační závislost určen koeficient determinace $R^2 = 0,9953$, směrnice přímky $(0,489 \pm 0,19)$ a úsek na ose y (intercept, $1481,5 \pm 465,4$). Pro hodnoty směrnice přímky a úseku na ose y jsou v závorkách uvedeny směrodatné odchylky. Byla také určena směrodatná odchylka pro stanovení ethanolu pomocí této kalibrační závislosti, která byla ± 3619 mg/l. Protože byla hodnota chyby pro nízké koncentrace poměrně vysoká (nealkoholické pivo obsahuje kolem 3500 mg/l ethanolu, tedy chyba by byla v tomto případě kolem 100 %), bylo s touto hodnotou dále počítáno při dalších stanoveních ethanolu a následně i stanoveních analytů právě pomocí IS ethanolu.



Obrázek 4.1: Kalibrační závislost pro ethanol, $R^2 = 0,9953$, $y = 0,489x + 1481,5$

Dalším parametrem pro kontrolu metody stanovení ethanolu v pivu byla výtěžnost, která byla kontrolována pomocí přístroje pro stanovení ethanolu v pivu pomocí NIR. V tabulce

4.1 jsou uvedeny i hodnoty výtěžnosti v případě, kdy hodnota koncentrace ethanolu byla počítána s rozsahem chyby střední hodnoty 3619 mg/l. Pro koncentrace ethanolu stanovené pomocí NIR jsou výsledky uvedeny s nejistotou měření, která byla stanovena z nejistoty instrumentu 0,04 % obj.

Tabulka 4.1: Přehled koncentrací ethanolu v různých vzorcích piva naměřených pomocí GC a NIR a vypočtená výtěžnost metody

Vzorek č.	Ethanol GC [mg/l]	Ethanol NIR (±nejistota) [mg/l]	R_x %	Rozsah výtěžnosti s nejistotou stanovení ethanolu %
4	309,82	3162,53±321,97	9,8	-104,6 - 124,2
5	25848,67	32038,50±317,97	80,7	69,4 - 92,0
6	32660,53	35738,07±318,61	91,4	81,3 - 101,5
7	30602,25	36167,31±319,73	84,6	74,6 - 94,6
8	37881,39	40916,34±318,84	92,6	83,7 - 101,4
9	36554,19	47203,08±320,37	77,4	65,2 - 85,1

Pro všechny měřené vzorky piva byla výtěžnost stanovení ethanolu nižší než 100 % (bez započítané chyby), což může poukazovat na to, že správnému a přesnému stanovení ethanolu v pivu brání matriční efekt. Kalibrační závislost byla sestrojena pouze pomocí roztoků ethanolu ve vodě, proti čemuž je pivo poměrně komplexní matrice, což může do stanovení vnášet nepřesnosti. Trochu lepší je situace po započtení chyby stanovené z kalibrační závislosti ethanolu, kdy pro všechny vzorky přesahuje hodnota výtěžnosti 85 % (na horním rozsahu tohoto intervalu). Zvláštní chování vykazovaly vzorky nealkoholického piva, kde byla výtěžnost metody pouze kolem 10 %. Vzorek nealkoholického piva byl měřen desetkrát a ve všech případech byla stanovená koncentrace ethanolu srovnatelná, tedy nejednalo se o náhodnou chybu. Nízká výtěžnost zde může být způsobena nedostatečně pokrytým rozsahem kalibrační závislosti, který začíná až kolem 7000 mg/l (obrázek 4.1) nebo poměrně velkou chybou stanovení ethanolu, jak je zmíněno výše. Dalším příspěvkem k nepřesnosti tohoto stanovení by mohla být také poměrně vysoká hodnota LOQ (popsáno níže), která je v tomto případě dokonce vyšší než koncentrace ethanolu v nealkoholickém pivu naměřená

pomocí GC. Z ostatních experimentů byly následně výsledky pro nealkoholické pivo (vzorek č. 4) vyřazeny, neboť výsledky pro metodu s IS ethanolem by byly zkreslené a porovnání obou metod by nebylo rovnocenné. Protože i pro ostatní vzorky byla výtěžnost nízká, byly některé následující experimenty prováděny i s použitím hodnot koncentrací ethanolu stanovených pomocí NIR. Experimenty, které byly prováděny měřením připravených vodných roztoků (LOD, LOQ a linerita), takto hodnoceny nebyly, neboť ve vodném roztoku nebyla předpokládána takto nízká výtěžnost.

Pro metodu stanovení ethanolu v pivu byly dále určeny hodnoty LOD a LOQ. Konkrétní hodnoty byly 108,48 mg/l pro limit detekce a 361,62 mg/l pro limit kvantifikace. Při zhodnocení těchto výsledků je nicméně potřeba vzít v potaz, že experiment byl proveden právě na vzorku nealkoholického piva (jakožto vzorku s nejnižší koncentrací ethanolu), pro které měla metoda, jak je popsáno výše, špatnou výtěžnost a výsledky tedy nemusí zcela korespondovat s realitou.

Poslední bodem pro hodnocení této metody byla kontrola opakovatelnosti pro šestkrát měřené vzorky č. 6 a 9. Přehled výsledků je v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2: Opakovatelnost pro výsledky koncentrací ethanolu v pivu

Vzorek č.	<i>s</i> [mg/l]	<i>r</i> [mg/l]	<i>c prům.</i> [mg/l]	<i>r_{rel}</i> %
6	1187,54	6794,14	30479,86	22,3
9	706,38	4044,76	36199,04	11,2
Průměr ± <i>s</i>	-	5419,45±1374,69	-	16,75±5,55

Pro dva měřené vzorky piva jsou výsledky opakovatelnosti rozdílné, nicméně obě hodnoty lze považovat za dostatečné. Zdrojem rozdílných výsledků při opakovaném stanovení ethanolu v pivu může být opět chyba z kalibrační závislosti nebo nepřesnosti při přípravě vzorků, neboť téměř všechny vzorky piva při pipetování pění, což může způsobit rozdíly ve výsledném množství vzorku ve vialce.

4.2 Sledované metrologické parametry pro stanovení těkavých látek v pivu

4.2.1 Linearita

Pro zhodnocení linearity obou metod a určení odezвовých faktorů byla proměřena sada připravených kalibračních roztoků. Koncentrace analytů v připravených roztocích jsou uvedeny v tabulkách 4.3 a 4.4.

Tabulka 4.3: Přehled koncentrací analytů v kalibračních roztocích č. 1-4, hodnoty nejistot vypočteny podle 3.7 a 3.8

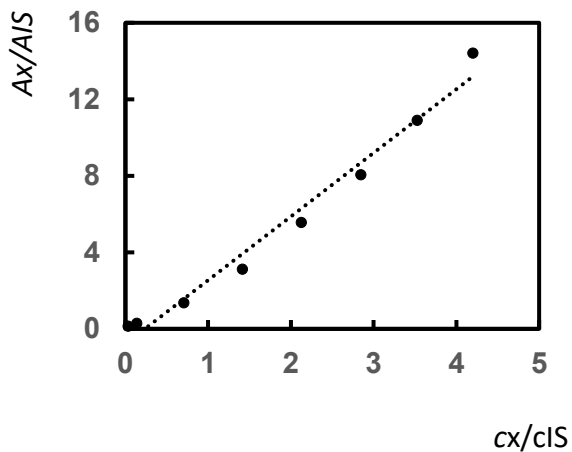
	Roztok č.1	Roztok č.2	Roztok č.3	Roztok č.4
	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
Acetaldehyd	0,294±0,136	1,152±0,152	5,728±0,360	11,473±0,682
Ethyl acetát	0,331±0,154	1,297±0,171	6,448±0,406	12,915±0,768
Isobutyl acetát	0,008±0,004	0,032±0,004	0,158±0,010	0,317±0,028
Ethyl butyrát	0,007±0,003	0,026±0,003	0,127±0,008	0,255±0,015
1-propanol	0,338±0,157	1,325±0,175	6,587±0,414	13,192±0,784
Butyl acetát	0,009±0,004	0,037±0,005	0,183±0,012	0,366±0,022
Isobutanol	0,294±0,136	1,152±0,152	5,731±0,361	11,447±0,682
Isoamyl acetát	0,160±0,074	0,627±0,083	3,120±0,196	6,249±0,372
Isoamylol	1,021±0,773	4,004±0,861	19,909±2,042	39,873±3,864
Ethyl hexanoát	0,042±0,019	0,164±0,022	0,815±0,051	1,632±0,097

Tabulka 4.4: Přehled koncentrací analytů v kalibračních roztocích č. 5-8, hodnoty nejistot vypočteny podle 3.7 a 3.8

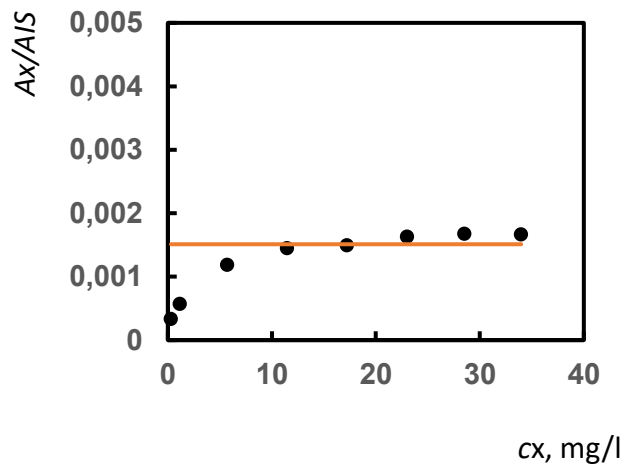
	Roztok č.5 [mg/l]	Roztok č.6 [mg/l]	Roztok č.7 [mg/l]	Roztok č.8 [mg/l]
Acetaldehyd	17,223±1,013	23,015±1,349	28,529±1,670	33,975±1,990
Ethyl acetát	19,388±1,140	25,908±1,518	32,115±1,880	38,245±2,239
Isobutyl acetát	0,476±0,028	0,635±0,038	0,788±0,046	0,938±0,055
Ethyl butyrát	0,383±0,023	0,511±0,030	0,634±0,038	0,755±0,045
1-propanol	19,804±1,165	26,464±1,551	32,804±1,920	39,066±2,288
Butyl acetát	0,549±0,032	0,733±0,043	0,909±0,054	1,083±0,064
Isobutanol	17,230±1,013	23,025±1,349	28,541±1,671	33,989±1,990
Isoamyl acetát	9,381±0,552	12,536±0,735	15,540±0,910	18,506±1,085
Isoamylol	59,859±5,737	79,989±7,638	99,152±9,459	118,079±11,268
Ethyl hexanoát	2,451±0,144	3,275±0,192	4,059±0,238	4,834±0,283

V tabulkách 4.3 a 4.4 si lze povšimnout rozdílných hodnot koncentrací pro dvě skupiny analytů, které se průměrně liší o dva řády. Protože koncentrace těchto látek v pivu nemají udávány žádné limity, byly hodnoty voleny tak, aby odpovídaly jejich průměrnému obsahu ve vzorcích piva.

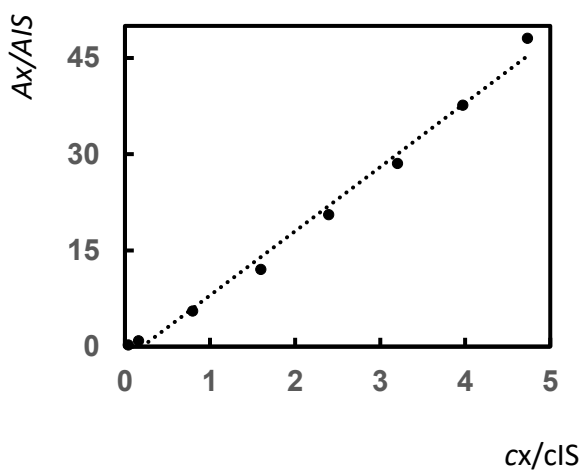
Jak již bylo popsáno výše, pro interní standard n-butanol byla z naměřených hodnot sestrojena kalibrační závislost poměru ploch analytu a interního standardu na poměru koncentrací analytu a interního standardu. Z této závislosti byl určen koeficient determinace a hodnoty směrnice a úseků na ose y , ze kterých byly poté pomocí reziduální analýzy hodnoceny jednotlivé body, a tedy i lineární rozsah metody. Pro metodu s interním standardem ethanolem nebylo, kvůli jeho měnící se koncentraci, podobné zpracování možné a lineární rozsah metody byl hodnocen pouze graficky, vynesemím závislosti poměru ploch analytu a interního standardu vůči koncentraci analytu. Na obrázcích 4.2 – 4.21 jsou jednotlivé kalibrační závislosti (a lineární rozsahy) znázorněny. Obrázky jsou popsány pomocí názvu analytu a použitého interního standardu. Na obrázcích pro IS ethanol je oranžově znázorněná průměrná hodnota z poměru ploch.



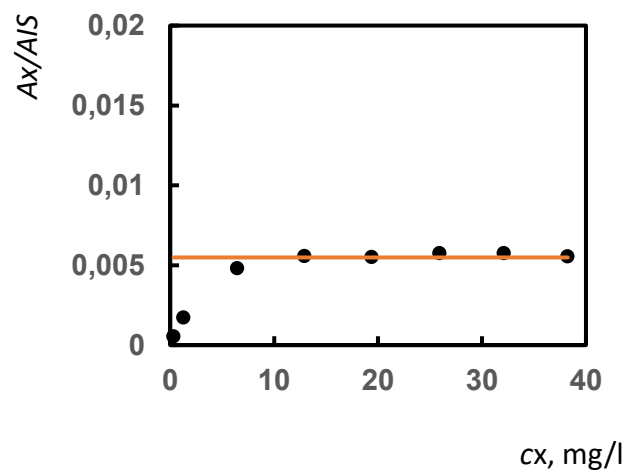
Obrázek 4.2: Acetaldehyd, n-butanol



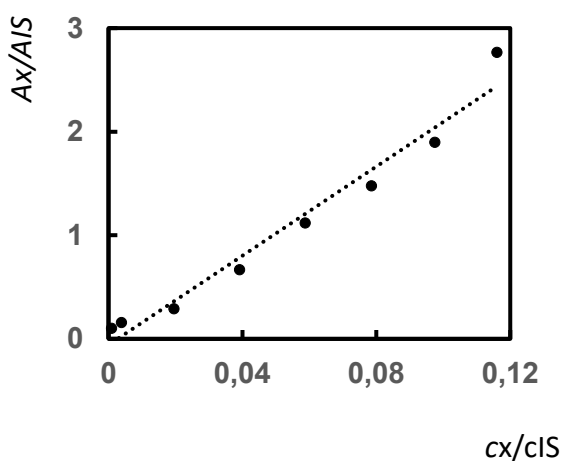
Obrázek 4.3: Acetaldehyd, ethanol



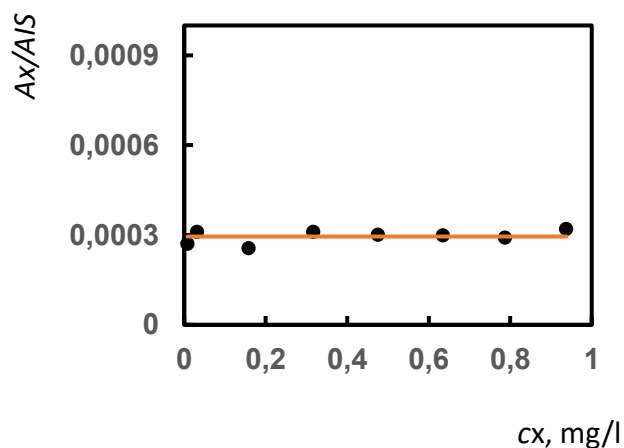
Obrázek 4.4: Ethyl acetát, n-butanol



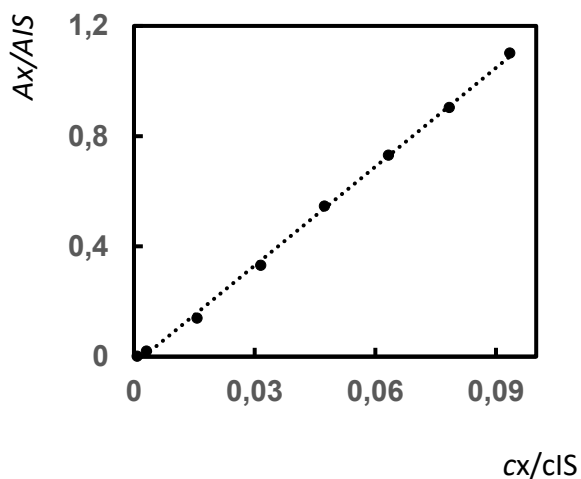
Obrázek 4.5: Ethyl acetát, ethanol



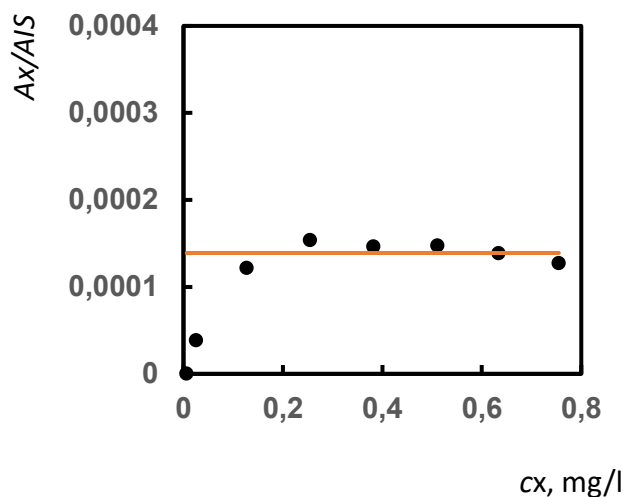
Obrázek 4.6: Isobutyl acetát, n-butanol



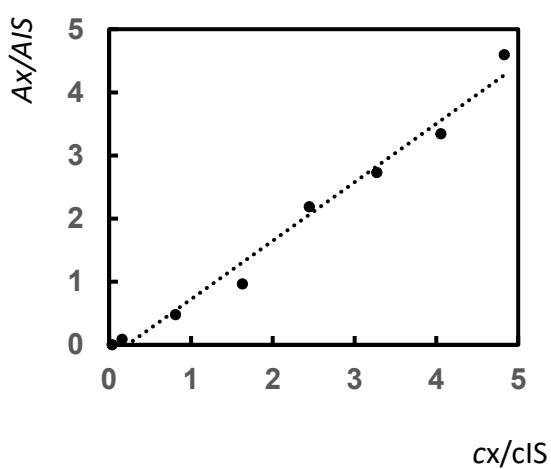
Obrázek 4.7: Isobutyl acetát, ethanol



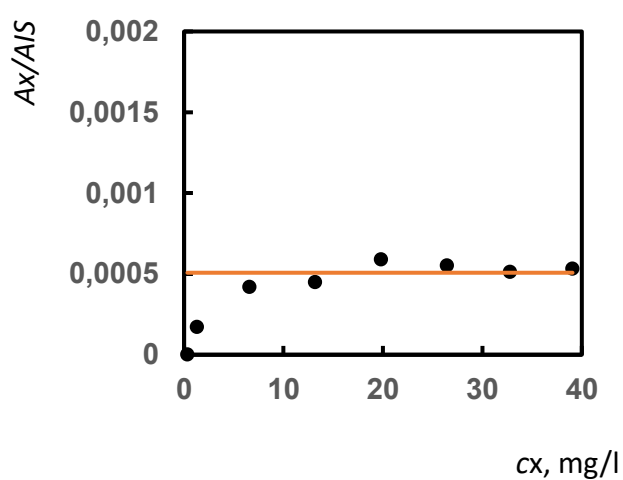
Obrázek 4.8: Ethyl butyrát, n-butanol



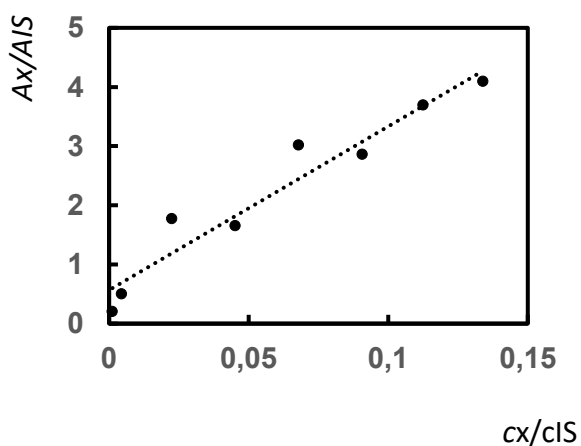
Obrázek 4.9: Ethyl butyrát, ethanol



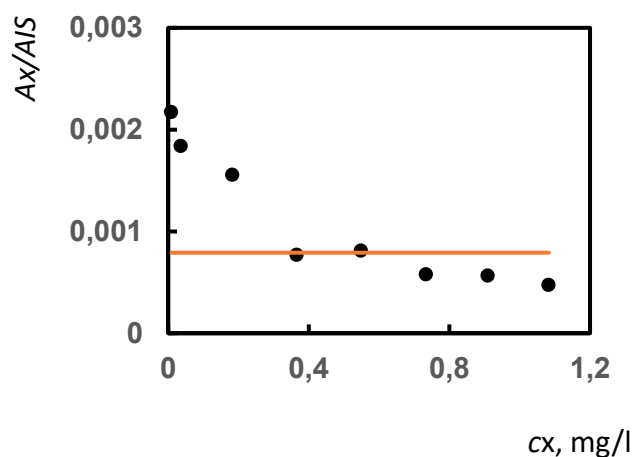
Obrázek 4.10: 1-propanol, n-butanol



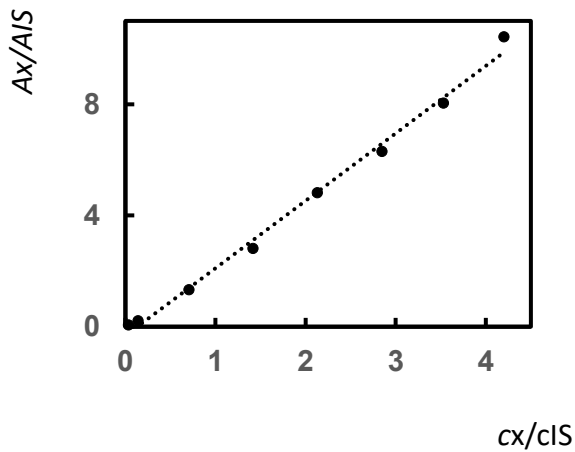
Obrázek 4.11: 1-propanol, ethanol



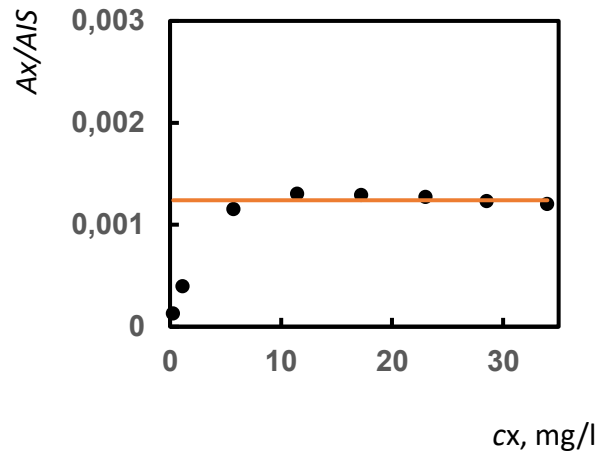
Obrázek 4.12: Butyl acetát, n-butanol



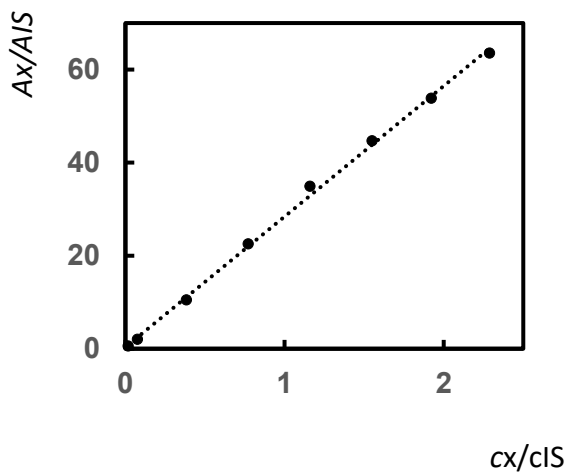
Obrázek 4.13 Butyl acetát, ethanol



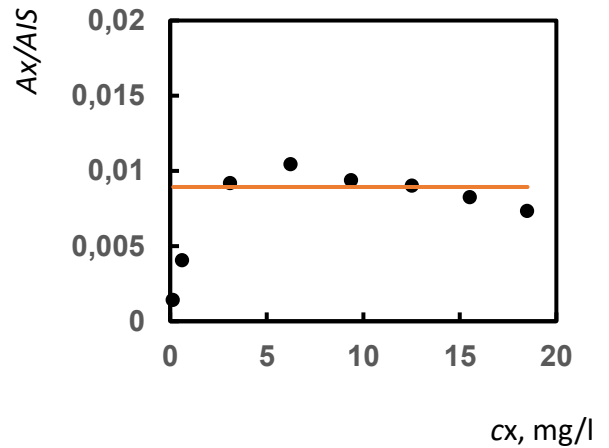
Obrázek 4.14: Isobutanol, n-butanol



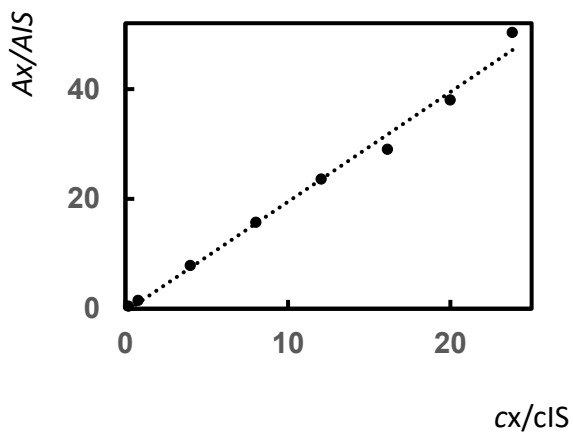
Obrázek 4.15: Isobutanol, ethanol



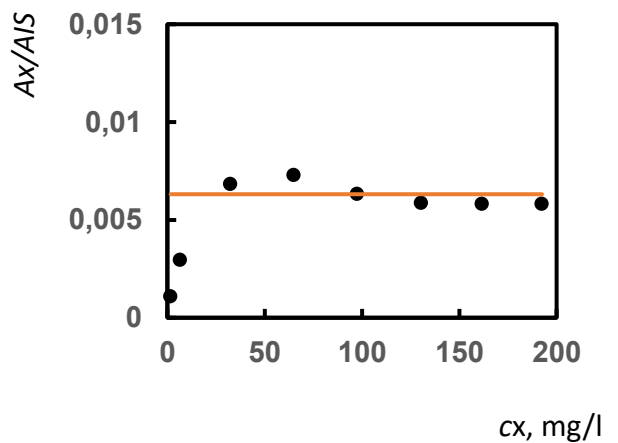
Obrázek 4.16: Isoamyl acetát, n-butanol



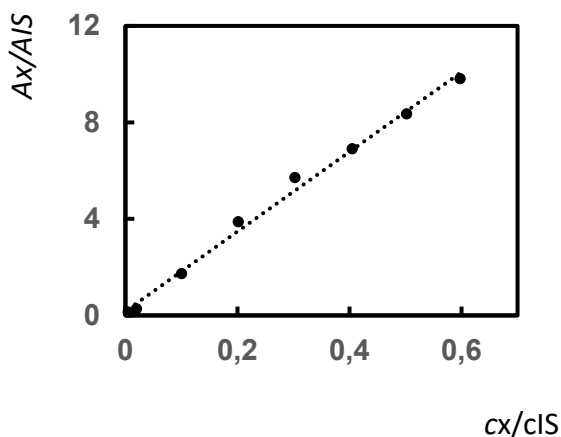
Obrázek 4.17: Isoamyl acetát, ethanol



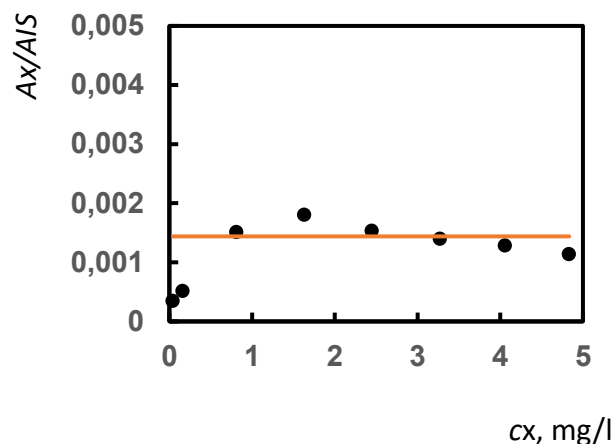
Obrázek 4.18: Isoamylol, n-butanol



Obrázek 4.19: Isoamylol, ethanol



Obrázek 4.20: Ethyl hexanoát, n-butanol



Obrázek 4.21 Ethyl hexanoát, ethanol

Hodnocení lineárního rozsahu metody při použití interního standardu ethanolu bylo provedeno pomocí grafického znázornění a hodnocení jednotlivých bodů. Grafy byly, alespoň přibližně, sestrojeny tak, aby byl na ose y relativně stejný rozsah hodnot a k hodnocení lineárního rozsahu metody byly použity také hodnoty vypočtených odezvových faktorů, které by teoreticky pro každý bod měly být stejné. Jak je vidět z obrázků 4.2 – 4.21 pro nejnižší dvě koncentrační hladiny se pro většinu analytů (pro obě metody interních standardů) naměřené hodnoty velmi odchylovaly od lineárního průběhu a v některých případech nebyla pro nejmenší píky ani odečtena plocha. Proto byly výsledky z těchto dvou kalibračních roztoků vyřazeny a bylo dále počítáno pouze se šesti kalibračními roztoky. Odezvové faktory byly poté vypočteny jako průměr z těchto šesti roztoků a jejich přehled je uveden v tabulce 4.5.

Tabulka 4.5: Odezvové faktory analytů pro obě metody interního standardu a determinační koeficienty pro metodu s IS n-butanolem

	RRF	R^2	RRF
	IS n-butanol	IS n-butanol	IS ethanol
Acetaldehyd	2,84	0,9786	4,87
Ethyl acetát	18,87	0,9904	32,41
Isobutyl acetát	17,14	0,9658	29,36
Ethyl butyrát	28,98	0,9988	49,63
1-propanol	11,59	0,9825	14,56
Butyl acetát	1,80	0,9508	3,10
Isobutanol	0,84	0,9937	1,43
Isoamyl acetát	8,94	0,9983	15,31
Isoamylol	31,56	0,9908	54,33
Ethyl hexanoát	2,22	0,9939	3,81

Kvůli již výše popsaným odlišnostem nebylo v tomto bodě možné metody objektivně porovnat, ale při zohlednění grafického posouzení a posouzení odchylek z odezvových faktorů bylo zjištěno, že obě metody mají v daném rozsahu lineární odezvu mezi poměry ploch a koncentrací a bylo tak dále pracováno s koncentracemi analytů v rozsahu kalibračních roztoků č. 3-8.

4.2.2 Limity detekce a kvantifikace

Pro stanovení limitů detekce a kvantifikace byl zvolen roztok č. 3, který byl devětkrát změřen a z výše uvedených odezvových faktorů byla v tomto roztoku stanovena koncentrace jednotlivých analytů. Ze směrodatných odchylek koncentrací pak byly stanoveny hodnoty LOD a LOQ, jejichž přehled je v tabulce 4.6 a 4.7.

Tabulka 4.6: Limity detekce

	LOD IS n-butanol [mg/l]	LOD IS ethanol [mg/l]
Acetaldehyd	0,141	0,268
Ethyl acetát	0,105	0,171
Isobutyl acetát	0,340	0,187
Ethyl butyrát	0,008	0,005
1-propanol	0,049	0,064
Butyl acetát	0,987	1,377
Isobutanol	0,053	0,707
Isoamyl acetát	0,381	0,449
Isoamylol	0,104	0,168
Ethyl hexanoát	1,648	1,067

Tabulka 4.7: Limity kvantifikace

	LOD IS n-butanol [mg/l]	LOD IS ethanol [mg/l]
Acetaldehyd	0,470	0,894
Ethyl acetát	0,350	0,571
Isobutyl acetát	1,132	0,623
Ethyl butyrát	0,027	0,017
1-propanol	0,164	0,214
Butyl acetát	3,288	4,591
Isobutanol	0,175	2,358
Isoamyl acetát	1,269	1,497
Isoamylol	0,347	0,560
Ethyl hexanoát	5,493	3,557

Pro metodu s IS n-butanolem vychází hodnoty LOD a LOQ nižší pro šest analytů z deseti. Rozdíly jsou však ve většině případů malé. Velký rozdíl, více než 50 %, je pouze pro limity detekce a kvantifikace isobutanolu. Při analýze reálných vzorků se třikrát stalo, že v případě ethyl butyrátu a isobutyl acetátu nebyly výsledky pro metodu s IS ethanolom vyhodnoceny, protože byly pod limitem kvantifikace, zatímco pro metodu s IS n-butanolem vyhodnoceny v těchto případech byly. Na základě těchto dat by tak bylo možné soudit, že metoda pro IS n-butanol poskytuje lepší výsledky pro limity detekce a kvantifikace. Hlavní zdroj chyby pro výsledky metody s IS ethanolom zde byl pravděpodobně fakt, že se v každém nástřiku roztoku č. 3 nejprve samotný ethanol stanovoval a už toto stanovení vnášelo do výsledku chybu cca 10 %.

4.2.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost výsledků koncentrací naměřených v šestkrát měřeném vzorku č. 6 byla hodnocena pro všechny tři varianty kvantifikačních metod – IS n-butanol a IS ethanol stanovený jak pomocí GC přímo ve vzorku, tak i stanovený pomocí NIR v samostatné analýze. Přehled získaných hodnot je v tabulce 4.7. Pokud nebyl daný analyt ve vzorku detekován, byla použita hodnota z šestkrát měřeného kalibračního roztoku č. 5 a tyto výsledky byly označeny symbolem *.

Tabulka 4.7: opakovatelnost výsledků pro vzorek č. 6

	r	r %	r	r %	r	r %
	IS	IS	IS ethanol	IS ethanol	IS ethanol	IS ethanol
	n-butanol	n-butanol	GC	GC	NIR	NIR
Acetaldehyd	2,10	25,86	0,54	7,45	0,80	9,34
Ethyl acetát	1,17	25,17	0,41	9,89	0,51	10,30
Isobutyl acetát	0,22*	8,62*	0,17*	5,17*	-	-
Ethyl butyrát	0,06	132,64	0,02	52,91	0,01	41,82
1-propanol	0,57	83,92	0,18	27,21	0,13	19,60
Butyl acetát	0,03 *	22,73 *	0,04 *	5,59 *	-	-
Isobutanol	7,26	26,91	2,16	8,89	3,05	10,63
Isoamyl acetát	1,18	25,36	0,35	8,39	0,59	12,00
Isoamylol	1,01	28,49	0,31	9,88	0,44	11,68
Ethyl hexanoát	0,82*	5,92*	0,79*	4,35*	-	-

Z výsledků v tabulce 4.7 je patrné, že nejlepší výsledky pro opakovatelnost výsledků koncentrací naměřených v reálném vzorku poskytla metoda s interním standardem ethanolem a koncentracemi ethanolu stanovenými pomocí NIR. Jedinou vysokou hodnotou je zde 41,82 % pro ethyl butyrát, kde ale byla naměřena koncentrace téměř na hladině LOQ, což mohlo výsledek výrazně ovlivnit. Výsledky opakovatelnosti pro dvě metody, které používají IS ethanol, by teoreticky měly být stejné, protože jedinou rozdílnou hodnotou při výpočtu koncentrace analytu je koncentrace ethanolu, tedy v podstatě konstanta. Je však potřeba si uvědomit, že v každém ze šesti opakování byl ethanol, v případě vyhodnocení pomocí GC, stanovován zvlášť a koncentrace tedy pokaždé vyšla nepatrně odlišná, což právě způsobilo výsledný rozdíl v hodnotách opakovatelnosti. Opakovatelnost metody pro interní standard ethanol stanovený pomocí GC vyšla pro dva analyty vysoká, nicméně to zde může být opět dáno nízkými koncentracemi analytů. Pro ostatních osm analytů byly v některých bodech výsledky lepší než výsledky metody s ethanolem stanoveným pomocí NIR a opakovatelnost výsledků nepřesahovala 10 %, což je vzhledem k použité instrumentaci a matici vzorku dobrý výsledek. Metody s IS n-butanolem poskytla v tomto bodě nejhorší výsledky.

Vzhledem k výše popsaným komplikacím se stanovením ethanolu ve vzorcích pomocí GC, jsou horší výsledky opakovatelnosti pro IS n-butanol překvapivé. Zdrojem těchto vyšších hodnot zde může být již dříve zmíněný fakt, že koncentrace n-butanolu v každém vzorku je považována za konstantu, kdežto jeho plocha na chromatogramu se samozřejmě, v rámci odchylek způsobených instrumentací, mění. Ethanol se oproti tomu v každém roztoku nejprve stanovil, takže se s jeho plochou měnila i koncentrace, se kterou bylo ve výpočtech počítáno. I přes to, jsou ale výsledky opakovatelnosti pro IS butanol vysoké, nicméně důvod pro tyto výsledky se nepodařilo zjistit. Pravděpodobně zde hrála roli kombinace několik faktorů diskutovaných v předchozích kapitolách.

Pro klasickou aplikaci metody „ethanol jako interní standard“, kde se používají jednotky mg/l AA, jsou lepší výsledky opakovatelnosti při porovnání s klasickým interním standardem běžné a očekávané, protože je zde každý vzorek upravován právě přidavkem interního standardu a chyba tedy může být vnášena nepřesnostmi při přípravě vzorků.

4.2.4 Výtěžnost

Výtěžnost metody byla hodnocena pro vzorky č. 1–3 s přidavkem 1 ml roztoku C. Výtěžnost byla hodnocena pouze u analytů, u kterých bylo v samotném vzorku naměřeno

větší množství, než byly limity kvantifikace. V teorii by samozřejmě bylo možné stanovit výtěžnost i u vzorků s nulovou koncentrací analytu ve vzorku, protože výsledná koncentrace ve vzorku s přídavkem by odpovídala pouze množství analytu z přídavku. V tomto případě však byly výsledky pro obě metody velmi vysoké a rozdílné a nemělo by význam tyto hodnoty porovnávat.

Tabulka 4.8: Výtěžnost obou metod pro vzorky č. 1-3

	Vzorek č.1		Vzorek č.2		Vzorek č.3	
	R_x %	R_x %	R_x %	R_x %	R_x %	R_x %
	IS n-butanol	IS ethanol	IS n-butanol	IS ethanol	IS n-butanol	IS ethanol
Acetaldehyd	75,6	115,9	79,5	100,1	78,6	101,6
Ethyl acetát	74,0	109,8	82,2	97,3	84,4	98,7
Isobutyl acetát	-	-	-	-	-	-
Ethyl butyrát	-	-	-	-	-	-
1-propanol	77,4	120,7	77,7	98,7	80,4	97,4
Butyl acetát	85,3	151,2	81,2	120,6	90,6	125,0
Isobutanol	-	-	81,4	103,0	89,1	110,2
Isoamyl acetát	78,9	131,3	81,8	111,5	83,8	112,7
Isoamylol	79,7	119,9	77,0	93,5	85,9	102,2
Ethyl hexanoát	-	-	106,7	145,4	103,1	137,3

Pro výsledky výtěžnosti lze pozorovat zajímavý trend, kdy v případě IS n-butanolu téměř žádná hodnota nepřekračuje 100 %, zatímco pro IS ethanol je tomu naopak a v podstatě všechny hodnoty jsou větší než 100 %. V případě n-butanolu si tyto výsledky lze vysvětlit tím, že kvůli poměrně komplexní matici nemusí být veškeré množství analytů uvolněno z matrice do headspace prostoru a stanovené koncentrace se pak jeví nižší, než ve skutečnosti jsou. Toto tvrzení podporuje fakt, že výtěžnosti napříč různými vzorky pro všechny analyty jsou podobně nízké a nevyskytují se žádné velké výjimky. V praxi by tedy pak bylo potřeba tento výsledek brát v potaz a uvědomit si, že udávané výsledky pro koncentrace analytů mohou být nižší. Protože se však jedná o analýzu vesměs pouze senzoricky aktivních látek, které v těchto množstvích nejsou nebezpečné a zároveň nejsou stanoveny žádné krajní

hodnoty pro jednotlivé validační parametry ani pro maximální přípustné koncentrace, nejsou nižší hodnoty překážkou pro používání této metody v praxi.

Naopak vyšší hodnoty výtěžnosti pro IS ethanol jsou pravděpodobně způsobeny nepřesným stanovením ethanolu v pivu. Jak lze ale pozorovat v tabulce 4.1, samotné stanovení ethanolu v pivu má poměrně nízkou výtěžnost. Tedy stanovené množství ethanolu v pivu je nižší než ve skutečnosti a pokud jsou k tomuto množství pomocí metody interního standardu vztaženy hodnoty koncentrace analytů, bylo by naopak očekáváno, že výsledné koncentrace analytů budou také sníženy. Navíc pokud by platila teorie popsaná výše o nedostatečném uvolňování analytů z matrice do headspace prostoru, měly by být výsledky výtěžnosti pro IS ethanol také nižší. Roli ve vyšších hodnotách výtěžnosti pro metodu s IS ethanolem tedy pravděpodobně hrály i další faktory, jež byly už výše diskutovány, jako například hodnoty opakovatelnosti nebo matriční efekt.

4.2.5 Statistické zpracování výsledků a porovnání jednotlivých metod

Statistické zhodnocení výsledků pomocí nástroje ANOVA bylo provedeno pro následující analyty – acetaldehyd, ethyl acetát, 1-propanol, isobutanol, isoamyl acetát a isoamylol. Ostatní analyty hodnoceny nebyly, protože nebyly v některých vzorcích (č. 5-9) detekovány a jejich porovnání by tak bylo zavádějící. Hodnoty koncentrací v tabulkách 4.9-4.13 jsou uvedeny s hodnotami rozšířených nejistot. Označení 1 a 2 za pojmenováním metody popisují dvě paralelní stanovení.

Tabulka 4.9: Výsledky koncentrací [mg/l] acetaldehydu pro jednotlivé vzorky a tři různé metody

	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9
ethanol GC, 1	8,55±1,08	7,54±1,08	3,97±1,08	8,86±1,08	3,61±1,08
ethanol GC, 2	9,50±1,08	7,51±1,08	4,17±1,08	9,09±1,08	3,18±1,08
ethanol NIR, 1	5,80±1,62	8,11±1,62	4,89±1,62	9,30±1,62	4,43±1,62
ethanol NIR, 2	6,45±1,62	8,37±1,62	4,74±1,62	10,12±1,62	4,33±1,62
n-butanol, 1	5,14±4,58	6,84±4,58	3,68±4,58	5,71±4,58	3,35±4,58
n-butanol, 2	4,56±4,58	7,85±4,58	4,42±4,58	7,49±4,58	3,76±4,58

Tabulka 4.10: Výsledky koncentrací [mg/l] ethyl acetátu pro jednotlivé vzorky a tři různé metody

	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9
ethanol GC, 1	9,37±0,94	4,30±0,94	6,46±0,94	11,25±0,94	3,61±0,94
ethanol GC, 2	10,34±0,94	4,44±0,94	7,28±0,94	11,31±0,94	3,18±0,94
ethanol NIR, 1	6,36±1,02	4,63±1,02	7,95±1,02	11,80±1,02	4,43±1,02
ethanol NIR, 2	7,02±1,02	4,95±1,02	8,26±1,02	12,59±1,02	4,33±1,02
n-butanol, 1	5,65±2,42	3,91±2,42	6,00±2,42	7,27±2,42	3,35±2,42
n-butanol, 2	4,97±2,42	4,65±2,42	7,72±2,42	9,35±2,42	3,76±2,42

Tabulka 4.11: Výsledky koncentrací [mg/l] 1-propanolu pro jednotlivé vzorky a tři různé metody

	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9
ethanol GC, 1	0,71±0,36	0,57±0,36	0,83±0,36	0,85±0,36	2,18±0,36
ethanol GC, 2	0,94±0,36	0,53±0,36	0,92±0,36	0,83±0,36	2,10±0,36
ethanol NIR, 1	0,48±0,26	0,61±0,26	1,02±0,26	0,89±0,26	2,68±0,26
ethanol NIR, 2	0,63±0,26	0,60±0,26	1,04±0,26	0,93±0,26	2,85±0,26
n-butanol, 1	0,31±1,16	0,38±1,16	0,56±1,16	0,40±1,16	2,88±1,16
n-butanol, 2	0,33±1,16	0,41±1,16	0,71±1,16	0,50±1,16	1,48±1,16

Tabulka 4.12: Výsledky koncentrací [mg/l] isobutanolu pro jednotlivé vzorky a tři různé metody

	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9
ethanol GC, 1	33,47±5,26	25,05±5,26	32,71±5,26	32,68±5,26	40,39±5,26
ethanol GC, 2	29,55±5,26	25,05±5,26	36,43±5,26	31,91±5,26	40,69±5,26
ethanol NIR, 1	22,72±7,28	25,05±7,28	40,30±7,28	34,28±7,28	49,59±7,28
ethanol NIR, 2	20,06±7,28	25,05±7,28	41,36±7,28	35,52±7,28	55,40±7,28
n-butanol, 1	20,04±6,70	25,05±6,70	30,17±6,70	20,95±6,70	37,30±6,70
n-butanol, 2	14,10±6,70	25,05±6,70	38,36±6,70	26,16±6,70	47,80±6,70

Tabulka 4.13: Výsledky koncentrací [mg/l] isoamyl acetátu pro jednotlivé vzorky a tři různé metody

	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9
ethanol GC, 1	7,40±0,70	4,28±0,70	5,30±0,70	14,47±0,70	5,61±0,70
ethanol GC, 2	8,19±0,70	4,40±0,70	5,96±0,70	14,29±0,70	5,26±0,70
ethanol NIR, 1	5,02±1,20	4,60±1,20	6,53±1,20	15,18±1,20	6,89±1,20
ethanol NIR, 2	5,56±1,20	4,90±1,20	6,76±1,20	15,90±1,20	7,16±1,20
n-butanol, 1	4,45±2,44	3,88±2,44	4,91±2,44	9,32±2,44	5,20±2,44
n-butanol, 2	3,93±2,44	4,59±2,44	6,30±2,44	11,76±2,44	6,21±2,44

Tabulka 4.14: Výsledky koncentrací [mg/l] isoamylolu pro jednotlivé vzorky a tři různé metody

	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9
ethanol GC, 1	4,19±1,80	3,25±0,90	3,75±0,90	3,98±0,90	3,13±0,90
ethanol GC, 2	4,83±0,90	3,22±0,90	4,10±0,90	3,75±0,90	2,75±0,90
ethanol NIR, 1	2,84±3,02	3,50±1,51	4,63±1,51	4,17±1,51	3,85±1,51
ethanol NIR, 2	3,28±1,51	3,59±1,51	4,66±1,51	4,17±1,51	3,75±1,51
n-butanol, 1	2,53±3,00	2,96±1,50	3,50±1,50	2,57±1,50	2,92±1,50
n-butanol, 2	2,33±1,50	3,38±1,50	4,36±1,50	3,10±1,50	3,27±1,50

Tabulka 4.15: Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů

	p-hodnota pro proměnnou použité metody	Je výsledek statisticky významný?
acetaldehyd	$2,21 \times 10^{-5}$	ano
ethyl acetát	$5,39 \times 10^{-5}$	ano
1-propanol	$1,91 \times 10^{-2}$	ano
isobutanol	$1,53 \times 10^{-3}$	ano
isoamylacetát	$2,76 \times 10^{-5}$	ano
isoamylol	$4,91 \times 10^{-5}$	ano

Tabulka 4.16: Následné statistické zhodnocení jednotlivých metod, v záhlaví tabulky je uvedena kombinace dvou metod, které byly porovnány

	ethanol GC ethanol NIR	ethanol GC n-butanol	ethanol NIR n-butanol
acetaldehyd	$7,21 \times 10^{-1}$	$4,01 \times 10^{-4}$	$2,95 \times 10^{-4}$
ethyl acetát	$6,64 \times 10^{-1}$	$9,09 \times 10^{-4}$	$5,14 \times 10^{-4}$
1-propanol	$4,66 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^{-2}$	$2,49 \times 10^{-2}$
isobutanol	$3,21 \times 10^{-2}$	$2,58 \times 10^{-2}$	$3,35 \times 10^{-3}$
isoamylacetát	$3,09 \times 10^{-2}$	$1,29 \times 10^{-2}$	$2,67 \times 10^{-4}$
isoamylol	$5,03 \times 10^{-2}$	$1,91 \times 10^{-2}$	$1,32 \times 10^{-4}$

Výsledky v tabulce 4.15 ukazují, že pro ani jeden ze stanovovaných analytů se nepodařilo prokázat, že výsledky poskytnuté jednotlivými metodami jsou statisticky nevýznamné a tedy, že metody poskytují statisticky stejné výsledky. Výsledky v tabulce 4.15 jsou uvedeny vždy pro všechny tři metody a byly tedy dále obdobným způsobem provedeny i následné testy, kdy byly porovnávány vždy pouze dvě metody. Pro každý analyt tedy další tři kombinace (tabulka 4.16). V této tabulce si lze povšimnout celkem třech hodnot, které přesahují hranici 5×10^{-2} . Všechny tyto výsledky jsou pro kombinaci metod IS ethanolu stanoveného jak pomocí GC, tak pomocí NIR. To lze pravděpodobně vysvětlit tím, že pro výpočet koncentrací pomocí těchto metod byly použity stejné odezvové faktory a stejné plochy interního standardu, jediným rozdílem byla koncentrace ethanolu. Ta sice byla, jak je zmíněno výše, pro obě metody rozdílná, nicméně to pravděpodobně neměla ve výsledky tak velký vliv. Pro další dvě kombinace s interním standardem n-butanolem se opět nepodařilo stanovit statisticky nevýznamné výsledky.

Tyto výsledky statistického hodnocení jsou pravděpodobně dány souhrou několika různých faktorů. Jednak byl měřen poměrně malý soubor vzorků s málo opakováními, a tedy nemohly být vyloučeny žádné odlehlé hodnoty. Pokud by bylo výsledků větší množství, je pravděpodobné, že by alespoň pro některé analyty vyšla p-hodnota větší než 0,05. Dalším faktorem mohly být velké odchylky mezi výsledky v rámci jedné metody. Jak je prezentováno v tabulkách 4.9 – 4.14, výsledky pro některá dvě paralelní stanovení (označeno čísly 1 a 2 za pojmenováním metody) se lišily až o 30 %. V neposlední řadě byly výsledky ovlivněny také rozdílnými výtěžnostmi použitých metod. Jak je diskutováno v kapitole 4.5,

metoda s IS n-butanolem poskytuje výsledky nižší než ve skutečnosti, zatímco metoda pro IS ethanol naopak kvůli nepřesnému stanovení ethanolu poskytuje výsledky vyšší. Tento trend lze ve všech tabulkách (4.9 – 4.14) pozorovat, metoda s IS n-butanolem měla prakticky ve všech případech nižší naměřené koncentrace. Rozdíly mezi koncentracemi analytů ve vzorcích byly těmito odchylkami ovlivněny, a pravděpodobně i proto se výsledky jeví jako statisticky významné. Variantou, jak toto v praxi odstranit a prokázat statistickou nevýznamnost výsledků by mohlo být korigování výsledků ze vzorků právě na výtěžnost jednotlivých metod. V takovém případě by ale bylo potřeba provést rozsáhlé testování výtěžnosti na velké a různorodé skupině reálných vzorků piva, aby byl pokryt co největší rozsah obsahu ethanolu v pivu a složení matrice.

5. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala stanovením sensoricky aktivních těkavých látek v pivu pomocí HS-GC-FID. Pro kvantifikaci byla navržena metoda, která jako interní standard používá ethanol přítomný v každém vzorku piva. Tato metoda byla porovnána s běžně používanou metodou s interním standardem n-butanolem. Porovnání bylo provedeno sledováním vybraných validačních parametrů a analýzou celkem devíti vzorků piva.

Metoda s IS ethanolem byla navržena, protože díky tomu, že není nutné každý vzorek upravovat přidavkem interního standardu, jsou od ní očekávány správnější a přesnější výsledky. Tato hypotéza už byla dříve ověřena. Pro tuto konkrétní aplikaci však bylo nutné, kvůli jednotkám koncentrace, samotný ethanol v pivu nejprve stanovit, což se pomocí HS-GC ukázalo jako ne příliš přesné a správné. Aby mohly být obě metody objektivně porovnány, byl následně ethanol v pivu stanovován také pomocí NIR.

Po uvážení nepřesností vzniklými stanovováním ethanolu v každém vzorku piva, vyšly výsledky pro jednotlivé validační parametry podobné pro obě metody. V některých bodech však nebylo možné, kvůli odlišnostem, metody hodnotit rovnocenně. Jediným parametrem s rozdílnými výsledky byla opakovatelnost měřená pro reálné vzorky piva. Zde byly výsledky pro metodu s IS ethanolem lepší, což mohlo být způsobeno právě úpravou vzorků v případě metody s IS n-butanolem a tuto hypotézu se tak podařilo potvrdit. Pro výsledné zhodnocení obou metod je ale potřeba vzít v potaz fakt, že metoda s IS ethanolem je navrhována jako jednodušší na přípravu vzorků i kalibraci instrumentace, což v tomto případě zcela neplatí, neboť samotné stanovení ethanolu ve vzorku naopak přináší do analýzy další krok navíc. Na druhou stranu je pravdou, že opadá manuální úprava každého vzorku pomocí klasického interního standardu. Při použití navrhované metody v praxi je tak na zhodnocení každé laboratoře, který faktor je pro ni důležitější a tato navrhovaná metoda by mohla najít uplatnění například tam, kde je ethanol rutinně stanovován v rámci jiných zkoušek.

Na závěr lze kladně zhodnotit, že se povedlo metodu „ethanol jako interní standard“ optimalizovat pro další oblast použití, a to i přes komplikace s jednotkami koncentrací. Obě porovnávané metody navíc poskytly téměř srovnatelné výsledky, a protože pro kontrolu kvality piva neexistují žádné závazné předpisy, může být metoda „ethanol jako interní standard“ zajímavou a v praxi použitelnou alternativou.

Seznam literatury

- [1.] L. He, Y. Gao, L. Zhao: *Online coupling of bubbling extraction with gas chromatography-mass spectrometry for rapid quantitative analysis of volatiles in beer*, J Chromatogr., **1665**, 462-471 (2022)
- [2.] K. C. Hernandez, É. A. Souza-Silva, C. F. Assumpção, C. A. Zini, J. E. Welke: *Validation of an analytical method using HS-SPME-GC/MS-SIM to assess the exposure risk to carbonyl compounds and furan derivatives through beer consumption*, Food Addit., **36/12**, 1808–1821, (2019)
- [3.] S. Gerhards et al.: *Different dry hopping and fermentation methods: influence on beer nutritional quality*, J. Sci. Food. Agric., **101/7**, 2828–2835, (2021)
- [4.] T. Horák et al.: *Analysis of Selected Esters in Beer: Comparison of Solid-Phase Microextraction and Stir Bar Sorptive Extraction*, J. I. Brewing, **116/1**, 81–85, 2010
- [5.] L. Vera, L. Aceña, J. Guasch, R. Boqué, M. Mestres, O. Busto: *Characterization and classification of the aroma of beer samples by means of an MS e-nose and chemometric tools,* Anal. Bioanal. Chem., **399/6**, 2073–2081, (2011)
- [6.] H. E. Anderson, I. C. Santos, Z. L. Hildenbrand, K. A. Schug: *A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control*, Anal. Chim. Acta, **1085**, 1–20, (2019)
- [7.] S. Charapitsa, S. Sytova, A. Korban, N. Boyarin, I. Shestakovich, R. Cabala: *The establishment of metrological characteristics of the method 'Ethanol as Internal Standard' for the direct determination of volatile compounds in alcoholic products*, J. Chem. Metrol., **12**, 59–69, (2018)
- [8.] A. Korban, L. Zavoralová, R. Čabala, V. Egorov: *Perspectives on using ethanol as an internal standard for the quantification of volatile compounds in alcoholic products by headspace SPME–GC/FID without sample preparation*, Monatsh. Chem., **154/9**, 987–991, (2023)

- [9.] A. Korban, S. Charapitsa, R. Čabala, S. Lidia, S. Sytova: *The perspectives of ethanol usage as an internal standard for the quantification of volatile compounds in alcoholic products by GC-MS*, J. Mass Spectrom., **55/3**, (2020)
- [10.] C. Soria, M. J. García-Sarrió, M. L. Sanz: *Volatile sampling by headspace techniques*, Trends Anal. Chem., **71**, 85–99, (2015)
- [11.] Bruno Kolb, Leslie S. Ettre: *Static Headspace-Gas Chromatography*, 2nd ed. New Jersey Wiley, 2006.
- [12.] F. Falaki: Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography. In: *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*. Peter Kusch (Ed.), London: IntechOpen, (2019)
- [13.] I. Roman, M. Alonso, L. Bartolome, R. Alonso: *Headspace Gas Chromatography Methods and their Potential Industrial Applications*, Curr. Chromatogr., **1/2**, 100–121, (2014)
- [14.] B. Kolb: *Headspace sampling with capillary columns*, J. Chromatogr., **842/1**, 163–205, (1999)
- [15.] A. Tipler: *An Introduction to Headspace Sampling in Gas Chromatography: Fundamentals and Theory*. Dostupné z URL: https://resources.perkinelmer.com/corporate/pdfs/downloads/gde_intro_to_headspace.pdf [cit. 12.10.2024]
- [16.] Restek: *A Technical Guide for static headspace analysis using GC*. Dostupné z URL: <https://d11qgfmy9cwjff.cloudfront.net/csi/pdf/e/rk67.pdf> [cit. 12.10.2024]
- [17.] Y. S. Hwang, J. S. Yang, H. W. Lee, J. H. Ha: *Optimization and comparison of headspace hot injection and trapping, headspace solid-phase microextraction, and static headspace sampling techniques with gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile compounds in kimchi*, LWT-Food Sci. Technol., **134**, 110–155, (2020)

- [18.] T. Horák et al.: *Possibilities of Utilization of Modern Sample Preparation Methods for Gas Chromatographic Analysis of Beverages and Especially beer*, Kvasny. Prum., **56/9**, 358–366, (2010).
- [19.] Kevin Robards, Danielle Ryan: *Gas chromatography. In: Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, 145-245, Elsevier, 2022
- [20.] A. Maruti, E. Durán-Guerrero, C. G. Barroso, R. Castro: *Optimization of a multiple headspace sorptive extraction method coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of volatile compounds in macroalgae*, *J. Chromatogr. A*, **1551**, 41–51, May (2018)
- [21.] C. Cordero et al.: *Odorants quantitation in high-quality cocoa by multiple headspace solid phase micro-extraction: Adoption of FID-predicted response factors to extend method capabilities and information potential*, *Anal. Chim. Acta*, **1052**, 190–201, (2019)
- [22.] S. Strassnig, E. P. Lankmayr: *Elimination of matrix effects for static headspace analysis of ethanol*, *J. Chromatogr.*, **849/2**, 629–636, (1999)
- [23.] R. L. Grob, E. F. Barry: *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed. New Jersey, Wiley, 2004
- [24.] M. Bonino, R. Schellino, C. Rizzi, R. Aigotti, C. Delfini, C. Baiocchi: *Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS*, *Food Chem.*, **80/1**, 125–133, (2003)
- [25.] J. Zapata, L. Mateo-Vivaracho, J. Cacho, V. Ferreira: *Comparison of extraction techniques and mass spectrometric ionization modes in the analysis of wine volatile carbonyls*, *Anal. Chim. Acta.*, **660/1-2**, 197–205, (2010)
- [26.] N. Campillo, R. Peñalver, I. López-García, M. Hernández-Córdoba: *Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile organic sulphur and selenium compounds in beers, wines and spirits using gas chromatography and atomic emission detection*, *J. Chromatogr.*, **1216/39**, 6735–6740, (2009)

- [27.] C. Dong, W. Wang: *Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages*, Anal. Chim. Acta., **562/1**, 23–29, (2006)
- [28.] M. Nedjma, A. Maujean: *Improved chromatographic analysis of volatile sulfur compounds by the static headspace technique on water-alcohol solutions and brandies with chemiluminescence detection*, J. Chromatogr., **704/2**, 495–502, (1995)
- [29.] D. Saison, D. P. De Schutter, F. Delvaux, F. R. Delvaux: *Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry*, J. Chromatogr., **1190/1**, 342–349, (2008)
- [30.] C. Milo, G. A. Reineccius: *Identification and Quantification of Potent Odorants in Regular-Fat and Low-Fat Mild Cheddar Cheese*, J. Agric. Food Chem., **45/9**, 3590–3594, (1997)
- [31.] J. G. Wilkes, E. D. Conte, Y. Kim, M. Holcomb, J. B. Sutherland, D. W. Miller: *Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods*, J. Chromatogr., **880/1**, 3–33, (2000)
- [32.] Z. Li, L. K. Jacobus, W. P. Wuelfing, M. Golden, G. P. Martin, R. A. Reed: *Detection and quantification of low-molecular-weight aldehydes in pharmaceutical excipients by headspace gas chromatography*, J. Chromatogr., **1104/1**, 1–10, (2006)
- [33.] J. Tian, A. Rustum: *Development and validation of a fast static headspace GC method for determination of residual solvents in permethrin*, J. Pharm. Biomed. Anal., **128**, 408–415, (2016)
- [34.] M. Wang, S. Fang, X. Liang: *Natural deep eutectic solvents as eco-friendly and sustainable dilution medium for the determination of residual organic solvents in pharmaceuticals with static headspace-gas chromatography*, J. Pharm. Biomed. Anal., **158**, 262–268, (2018)

- [35.] B. Southon, G. Riley, P. Matatiele, B. Kgarebe: *Simultaneous analysis of acetone, methyl ethyl ketone (MEK), and methyl isobutyl ketone (MIBK) in urine by headspace gas chromatography-flame ionisation detection (HS GC-FID)*, *Results Chem.*, **2**, 100084 (2020)
- [36.] B. Dvořák, P. Bajeroová, A. Eisner, O. Nykodýmová, K. Ventura: *Determination of 2-ethylhexyl nitrate in diesel fuel*, *J. Sep. Sci.*, **34/14**, 1664–1668, (2011)
- [37.] J. U. Fangel, J. Eiken, A. Sierksma, H. A. Schols, W. G. T. Willats, J. Harholt: *Tracking polysaccharides through the brewing process*, *Carbohydr. Polym.*, **196**, 465–473, (2018)
- [38.] I. S. Hornsey: *A History of Beer and Brewing*, London, The Royal Society of Chemistry, 2003
- [39.] L. Černý: *Awaiting an amendment of legal regulations for beverage industry*, *Kvasny Prum.*, **41/1**, 17–19, (1995)
- [40.] J. L. Gonçalves et al: *A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials*,” *Food Chem.*, **160**, 266–280, (2014)
- [41.] J. Gonçalves, J. Figueira, F. Rodrigues, J. S. Câmara: *Headspace solid-phase microextraction combined with mass spectrometry as a powerful analytical tool for profiling the terpenoid metabolomic pattern of hop-essential oil derived from Saaz variety*, *J. Sep. Sci.*, **35/17**, 2282–2296, (2012)
- [42.] M. Steinhaus, W. Wilhelm, P. Schieberle: *Comparison of the most odour-active volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis*, *Eur. Food Res. Technol.*, **226/1-2**, 45–55, (2007)
- [43.] A. Aberl, M. Coelhan, *Determination of Volatile Compounds in Different Hop Varieties by Headspace-Trap GC/MS—In Comparison with Conventional Hop Essential Oil Analysis*, *J. Agric. Food Chem.*, **60/11**, 2785–2792, (2012)

- [44.] F. Van Opstaele, B. De Causmaecker, G. Aerts, L. De Cooman: *Characterization of Novel Varietal Floral Hop Aromas by Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry/Olfactometry*, *J. Agric. Food Chem.*, **60/50**, 12270–12281, (2012)
- [45.] T. Horák, J. Čulík, M. Jurková, P. Čejka, V. Kellner: *Determination of free medium-chain fatty acids in beer by stir bar sorptive extraction*, *J. Chromatogr. A*, **1196–1197**, 96–99, (2008)
- [46.] E. Bravi, O. Marconi, V. Sileoni, G. Perretti: *Determination of free fatty acids in beer*, *Food Chem.*, **215**, 341–346, (2017)
- [47.] B. Vanderhaegen, H. Neven, H. Verachtert, G. Derdelinckx: *The chemistry of beer aging – a critical review*, *Food Chem.*, **95/3**, 357–381, (2006)
- [48.] J. M. Leça, A. C. Pereira, A. C. Vieira, M. S. Reis, J. C. Marques: *Optimal design of experiments applied to headspace solid phase microextraction for the quantification of vicinal diketones in beer through gas chromatography-mass spectrometric detection*, *Anal. Chim. Acta*, **887**, 101–110, (2015)
- [49.] G. C. da Silva et al.: *Method development by GC–ECD and HS–SPME–GC–MS for beer volatile analysis*, *Food Chem.*, **167**, 71–77, (2015)
- [50.] G. Dragone, S. I. Mussatto, J. M. Oliveira, J. A. Teixeira: *Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation*, *Food Chem.*, **112/4**, 929–935, (2009)
- [51.] G. A. da Silva, F. Augusto, R. J. Poppi: *Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS–SPME–GC*, *Food Chem.*, **111/4**, 1057–1063, 2008
- [52.] G. Charry-Parra, M. DeJesus-Echevarria, F. J. Perez: *Beer Volatile Analysis: Optimization of HS/SPME Coupled to GC/MS/FID*, *J. Food Sci.*, **76/2**, 205-211, (2011)

- [53.] M. Kobayashi, H. Shimizu, S. Shioya: *Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation*, J. Biosci. Bioeng., **106/4**, 317–323, (2008)
- [54.] M. Riu-Aumatell, P. Miró, A. Serra-Cayuela, S. Buxaderas, E. López-Tamames: *Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME–GC-MS*, Food Res. Int., **57**, 196–202, (2014)
- [55.] J. Hrivňák, D. Šmogrovičová, P. Nádaský, J. Lakatošová: *Determination of beer aroma compounds using headspace solid-phase microcolumn extraction*, Talanta, **83/1**, 294–296, (2010)
- [56.] T. Cajka, K. Riddellova, M. Tomaniova, J. Hajslova: *Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint*, J. Chromatogr. A, **1217/25**, 4195–4203, (2010)
- [57.] J. Jiao, N. Ding, T. Shi, X. Chai, P. Cong, Z. Zhu: *Study of Chromatographic Fingerprint of the Flavor in Beer by HS-SPME-GC*, Anal. Lett., **44/4**, 648–655, (2011)
- [58.] *Alcohol amount in the aqueous alcohol solution calculator*. Online. PLANETCALC. 2018. Dostupné z: <https://planetcalc.com/1481/>. [cit. 2025-05-14]