

Rune Jæger Wexsahl

# Kvantitativ analyse av 3-metyl-2-buten-1-tiol i øl

Bachelorprosjekt i kjemi  
Veileder: Rudolf Schmid

**April 2020**

## **NTNU**

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for kjemi

**Bacheloroppgave**

**2020**





Rune Jæger Wexsahl

# Kvantitativ analyse av 3-metyl-2-buten-1-tiol i øl

Bachelorprosjekt i kjemi  
Veileder: Rudolf Schmid

Bacheloroppgave  
April 2020

**NTNU**

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for kjemi



Kunnskap for en bedre verden



## **Sammendrag**

For å kunne svare på bacheloroppgavens spørsmål sees det nærmere på hvordan 3-metyl-2-buten-1-tiol dannes i øl, og fra dette finne en egnet kvantitativ analysemetode for 3-metyl-2-buten-1-tiol i øl. Det oppnås ved å først se på den naturlige dannelsen av stoffet og den sensoriske effekten det har på øl. Videre undersøkes analysemetoder som tidligere har blitt tatt i bruk for analyse av stoffet. I diskusjonen vurderes analysemetodene opp mot hverandre for å kunne se på deres nøyaktighet og omfang av nødvendig preparativt arbeid. Dette blir oppsummert i konklusjonen.

# Innhold

<b>1</b>	<b>Introduksjon</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teori</b>	<b>3</b>
2.1	Dannelse av 3-metyl-2-buten-1-tiol . . . . .	3
2.2	Analysemetoder . . . . .	5
2.2.1	Headspace gasskromatografi . . . . .	6
2.2.2	Purge-and-Trap . . . . .	6
2.2.3	Fastfase mikroekstraksjon . . . . .	7
2.2.4	Gasskromatografi - Olfaktometri . . . . .	7
2.2.5	Flammefotometrisk detektor . . . . .	9
2.2.6	Time-of-flight-massespektrometri . . . . .	9
<b>3</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>10</b>
3.1	Separasjonsmetoder . . . . .	10
3.2	Detektorer . . . . .	11
3.3	Preparativt arbeid og prøveopparbeidelse . . . . .	12
<b>4</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>13</b>
	<b>Referanser</b>	<b>15</b>



## 1 Introduksjon

At øl er følsomt for sollys er svært godt kjent. Det fører til at ølet blir irreversibelt lysskadet, noe som kjennetegnes ved en aroma og smak som minner om stinkdyr, derav begrepet “skunking” av øl. Følsomheten ovenfor sollys er en av grunnene til at øl har redusert lagringstid. Sollys fører til en reduisering av kvalitet, uten å påvirke trykgheten. Denne kvalitetsreduksjonen er et problem for bryggeriindustrien og er hovedgrunnen til at øl hovedsakelig tappes på brune flasker.

Ølets følsomhet for sollys var kjent så tidlig som 1875, men de grunnleggende årsakene til “skunking” av øl ble ikke beskrevet før tidlig på sekstitallet [1]. Studier, som tok i bruk modellsystemer, kom fram til at den lysskadete aromaen var produsert i en ikke-enzymatisk reaksjon som involverte en passende svovelkilde, riboflavin (**5**) og isohumuloner (**2a-c**) [2]. Denne uønskede aromaen og smaken ble identifisert som 3-metyl-2-buten-1-tiol (MBT) (**1**), som er ansvarlig for en stikkende usmak i øl. Smaksgrensen til MBT er på under 1 til 4 nanogram per liter, avhengig av øltype [3] [4]. Senere ble det også påvist at direkte interaksjon mellom eksitert riboflavin og isohumuloner danner radikale forgjengere av MBT [5], men inntil nyere tid var mekanismen for dannelsen ukjent.

Øl er en kompleks blanding som hovedsakelig er basert på vann og etanol. I tillegg inneholder det en fraksjon med fast stoff på rundt 0,5%, som består av over 200 ulike stoffer som har opphav i de ulike råvarene. Under bryggeprosessen dannes en karbohydratløsning ved enzymatisk nedbrytning av stivelse, og løsningen betegnes som vørter. Videre kokes vørteren opp, og under koking tilsettes humle før vørteren kjøles ned og fermenteres ved tilsetning av gjær.

For å kunne beskrive prosessen for hvordan øl bli lysskadet, er vi med tanke på råvarene som brukes hovedsakelig interessert i humle, og hva som foregår under koking av ølet.

Humle (*Humulus lupulus*) har en høy mengde av såkalte  $\alpha$ -syrer (konsentrasjonen varierer med type humle).  $\alpha$ -syrer foreligger i lupulinkjertlene hos humlens hunnplanter, og er en varierende blanding av humulon (**2a**), cohumulon (**2b**) og adhumulon (**2c**). Ved oppvarming under koking, vil disse undergå en termisk isomerering til cis- og trans-iso- $\alpha$ -syre (**3a-c, 4a-c**) [3]. Det er disse iso- $\alpha$ -syrene som er ansvarlig for den typiske bitterheten i øl. Man ønsker vanligvis å ha iso- $\alpha$ -syrer i en konsentrasjon fra 15 til 120 ppm (igjen avhengig av øltype), og det tilsvarer rundt 25 mg per liter. Iso- $\alpha$ -syrene har også en konserverende effekt, særlig mot gram-positive bakterier, som er hovedårsaken til den historiske bruken av humle i øl. Det kan legges til at humle også inneholder stoffer som påvirker sentrale variabler som har innvirkning på andre ønskede effekter, som for eksempel stabiliteten av skum.

Hovedproblematikken med iso- $\alpha$ -syrene er deres sensitivitet ovenfor sollys, spesielt stråling i UV-regionen. Selv om mekanismen ikke ble bestemt før i nyere tid, var det antatt at humle var årsaken. Bakgrunnen for denne antagelsen er at øl produsert uten humle ikke har denne spesifikke usmaken, og i øltyper med lite humle har usmaken redusert intensitet [6]. Det har også blitt påvist vesentlig høyere konsentrasjon av MBT i øl tappet på gjennomsiktige, grønne eller blå flasker i forhold til tradisjonelle brune flasker eller metallbokser. Det er også påvist en sammenheng mellom konsentrasjonen av iso- $\alpha$ -syrer og MBT [4] [6].

For de fleste ølbryggere, både private og industrielle, er en markant reduksjon i øl-kvalitet ved lagring en stor bekymring. Ved langtidslagring er det vanlig å se reduksjon av intensitet på ønskede smaker og avhengig av lagringsmetode kan diverse uønskede smaker oppstå. Ved bruk av en lagringsmetode med utilstrekkelig eliminering av både synlig lys og UV-stråling, er dannelse av MBT hovedårsaken til nye usmaker. Dette er relevant når selve ølet kommer i kontakt med lys og UV-stråling, som det vil gjøre ved bruk av gjennomsiktige flasker. Videre er det også relevant, basert på reaksjonsraten for dannelsen av MBT, når ølet nyttes fra vanlige glass utendørs.

Tidligere har det blitt brukt teknikker som GC-O (Gasskromatografi - olfaktometri) for kvalitativ bestemmelse av MBT og dets duftterskel for mennesker [7]. Da denne metoden krever trente dommere og baseres direkte på menneskers luktesans, virker ikke metoden tilstrekkelig for kvantitativ bestemmelse. Kvantitativ bestemmelse er viktig ved testing av nye og gamle metoder for å bremse dannelsen av MBT.

I nyere tid har GC med både PFPD ("pulsed flame photometric detection") og MS (massespektrometri) blitt tatt i bruk [8] [9].

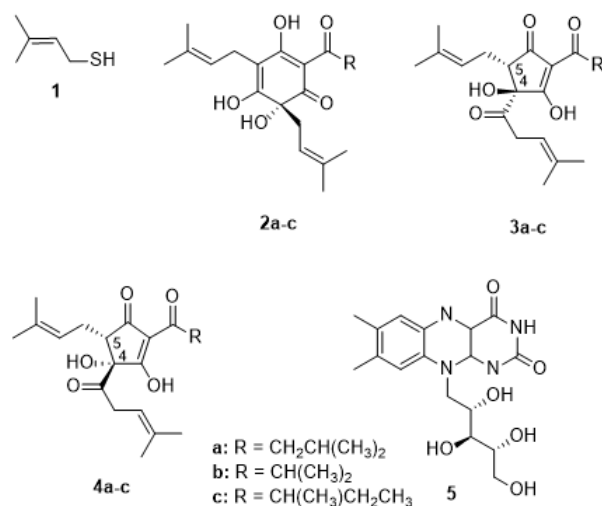
Målet videre i oppgaven er å se nærmere på hvordan MBT dannes, og se på ulike metoder som har blitt brukt for kvantitativ analyse av stoffet.

## 2 Teori

### 2.1 Dannelse av 3-metyl-2-buten-1-tiol

3-Metyl-2-buten-1-tiol (MBT) dannes dersom isohumuloner reagerer med svovelholdige stoffer forutsatt tilstedeværelse av lys. Isohumulonenes isopentylsidegreiner er en forutsetning for dannelse av MBT. Imidlertid vil ikke isohumuloner absorbere lys i området som kreves for reaksjonen (350-500 nm). Det viser at reaksjonen krever et fotosensibiliserende stoff [10]. Her introduseres riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) som finnes i øl i konsentrasjoner rundt 0,2-1,3 mg per liter. Det er kjent at riboflavin absorberer synlig lys og kan overføre den absorberte energien til isohumuloner [2]. Det har også blitt vist at konsentrasjonen av MBT er lavere dersom riboflavin ikke er tilstede [11].

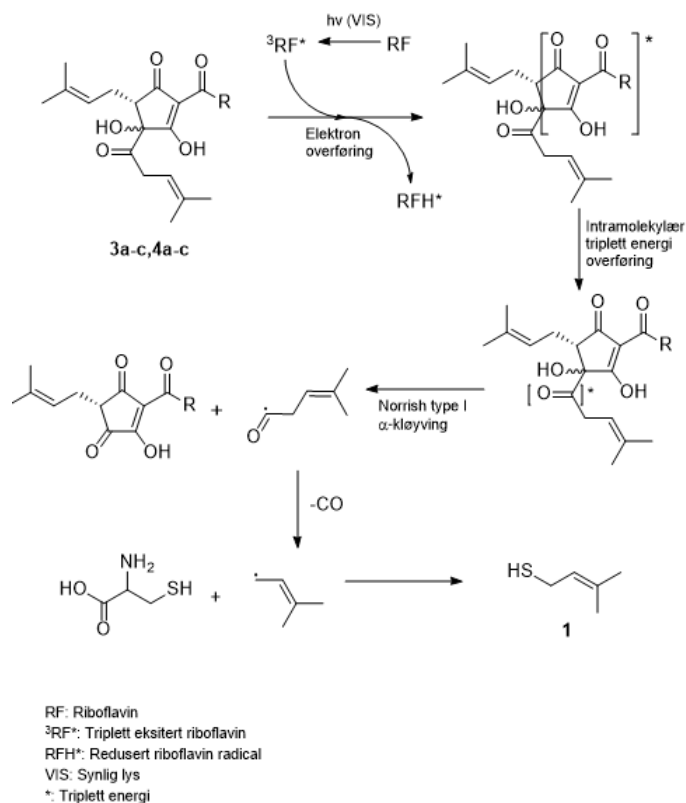
Både riboflavin og egnede svovelkilder forekommer naturlig i maltet byggryn som brukes som en råvare ved ølbrygging. Iso- $\alpha$ -syrer derimot, dannes fra stoffer i humlen under selve bryggeprosessen. Under koking ved ølbrygging vil stoffer fra humlen, også kjent som  $\alpha$ -syrer eller humuloner (humulon, cohumulon, adhumulon), undergå en termisk isomering til en likevektsblanding av trans-iso- $\alpha$ -syrer (trans-isohumulon, trans-isocohumulon, trans-isoadhumulon) og cis-iso- $\alpha$ -syrer (cis-isohumulon, cis-isocohumulon, cis-isoadhumulon) [12]. Disse dannes i en blanding av 3:7 (trans:cis), og ad-derivatene består av mindre enn 16% av totalen. Disse stoffene eksisterer i øl ved konsentrasjoner fra 15 til 100 mg per liter, og disse er hovedsakelig ansvarlig for ølets bitterhet.



**Skjema 1:** Strukturelle formler for 3-metyl-2-buten-1-tiol (**1**)  $\alpha$ -syrer (**2a-c**), trans-iso- $\alpha$ -syrer (**3a-c**), cis-iso- $\alpha$ -syrer (**4a-c**) og riboflavin (**5**) [5]

I henhold til modellen beskrevet av Kuroiwa et al., gir interaksjon mellom eksitert riboflavin og iso- $\alpha$ -syrer opphav til en 3-metyl-2-butenylradikal, som ved videre interaksjon med et tiol danner MBT. Denne forekomsten har blitt rasjonalisert som en Norrish Type I fotokatalysert spaltning av acyloin-gruppen ved C(4) etterfulgt av hydrogenabstraksjon fra fem-ringens ketylradikal [12] [13].

I modellsystemer som inneholder isohumuloner og cystein, har Sakuma et al. vist at konsentrasjonen av MBT økte med økende riboflavinkonsentrasjon [14] [15]. MBT-hemmere som 1,8-cineol forbindelser, gallotaniner, polyfenoler og thioredotsin har blitt nevnt i litteraturen. Effekten disse har på lysskadet aroma og smak i lystruffet øl har ikke blitt bestemt [10].



**Skjema 2:** Mekanisme for lyskatalysert dannelse av 3-metyl-2-buten-1-tiol fra isohumulon og cystein [16].

Nylig har fotofysikken som fører til dannelse av den frie radikalen som hovedtrinn i fotodekomposisjonen av iso- $\alpha$ -syrer blitt avslørt ved tidsbestemt elektron paramagnetisk resonans, og reaksjonsmekanismen har blitt bestemt [12].

## 2.2 Analysemetoder

MBTs lave smaksterskel, i tillegg til dens lave konsentrasjon i  $\text{øl}$ , gir en utfordring for deteksjon og kvantitativ analyse ved bruk av moderne instrumenter. Det vil da kreves deteksjon ned til nanogram per liter for å kunne detektere stoffet før det påvirker ølets smak og aroma. Det har blitt rapportert analyse av stoffet ved “headspace” gasskromatografi (HS-GC), fast-fase mikroekstraksjon (SPME), gasskromatografi med pulsert flammefotometrisk deteksjon (GC-PFPD) og gasskromatografi med massespektrometri (GC-MS). Dessverre er mange av disse tidkrevende og dyre teknikker.

### 2.2.1 Headspace gasskromatografi

HS-GC er en samplingteknikk hvor man foretar indirekte bestemmelse av flyktige forbindelser i løsninger eller faste prøver. Det oppnås ved analyse av dampfasen, som vil eksistere i likevekt med prøven ved et lukket system over prøven. Teknikken tas hovedsaklig i for bestemmelse av flyktige sporstoffer i en prøve [17] [18].

Mer tradisjonelle metoder, som løsemiddelekstraksjon eller destillasjon, vil ha ulempen av ko-ekstraksjon av ikke-flyktige forbindelser som kan være av liten interesse, og introduksjon av forbindelser fra ekstraksjonsmediet. I motsetning vil HS-analyse gi en sluttprøve basert kun på flyktige forbindelser som er mer egnet for analyse ved gasskromatografi. Det vil også redusere hyppigheten av nødvendig rengjøring og vedlikehold da prøven er såpass flyktig.

HS-teknikker finnes i et så stort antall og med store variasjoner, og det er derfor urealistisk å skulle presentere en fullstendig liste. De kan deles i to ulike hovedkategorier: Statistiske og dynamiske metoder.

Ved statistiske metoder vil prøven og dampen oppnå likevekt i en lukket beholder før det blir tatt en prøve av dampen. Ved dynamiske metoder vil en inert gass føres over prøven for å ta med analyttene. Videre, for begge hovedkategorier, vil gassen føres videre til et medium, ett porøst polymer eller en kuldefelle, egnet til å fange opp analytter. De flyktige forbindelsene vil fanges og deretter desorberes ved hjelp av løsemiddel eller varme i gasskromatografen [19].

### 2.2.2 Purge-and-Trap

Purge-and-trap er en analytisk termisk desorpsjonsteknikk som relativt ofte tas i bruk ved gasskromatografi ved analyse av flyktige organiske forbindelser i vandige løsninger. Ved bruk av teknikken vil en bestemt mengde av prøveløsningen bli plassert i en lukket beholder. Prøven vil deretter bli "purged" med en inert gass som vil ta med seg flyktige forbindelser ut av den vandige løsningen. De flyktige forbindelsene vil holdes i en analytisk felle før de desorberes ved oppvarming av fellen. De injiseres så inn i gasskromatografen ved strømming av bæregass, og de blir deretter separert ved vanlig gasskromatografi [20].

Å "purge" en prøve innebærer da å ekstrahere analytter fra en vandig løsning ved bruk av gassekstraksjon og det er en rekke faktorer som bestemmer effektiviteten av denne ekstraksjonen. Mengden av hver forbindelse som ekstraheres er proporsjonal med forbindelsens damptrykk og inverst proporsjonal med forbindelsens løselighet i prøveløsningen. Begge faktorer påvirkes av prøvetemperaturen. Ved purge-and-trap oppnås aktiv ekstraksjon ved gjennomstrømming av gassbobler gjennom prøveløsningen [20].

En analytisk felle er en kort, pakket GC-kolonne, og forbindelser som går inn i kolonnen vil eluere ut av den med et målbart retensjonsvolum. Ved lave temperaturer vil retensjonsvolumet være høyt, mens ved de høye temperaturer som brukes for å desorbere forbindelsene, vil retensjonsvolumet være vesentlig mindre [20].

Det er en rekke krav for analytiske feller: Høyt retensjonsvolum for analytter ved lave temperaturer, men oksygen og vann må kunne strømme uhindret gjennom den analytiske fellen, analyttene må slippes raskt og effektivt ved oppvarming, samtidig må den analytiske fellen være stabil ved høye temperaturer og ikke bidra med flyktige forbindelser. Videre må de kunne opereres uten å forårsake katalytiske reaksjoner.

### 2.2.3 Fastfase mikroekstraksjon

Fastfase mikroekstraksjon (SPME) er en løsningsmiddelfri ekstraksjonsteknikk der det brukes en ekstraherende fase som består av et flytende belegg eller adsorberende partikler som er integrert på overflaten av et polymerfiber. Det er belegget på fibre som ekstraherer forbindelser fra prøven. Under prosessen oppnås likevekt for analytter i prøven og fibre. Analyttene på fibre vil deretter desorberes inne i GC-injektoren og overføres til kolonnen. Dette gir teknikken mulighet til å ekstrahere de flyktige forbindelsene fra prøven og konsentrere dem i belegget på silikafibre [21].

En relevant metode som faller under SPME er headspace fastfase mikroekstraksjon (HS-SPME). Metoden er svært lik SPME bortsett fra at fibre ikke introduseres til prøven, men til gassen over prøveløsningen eller prøve stoffet. Dette muliggjør ekstraksjon av de flyktige forbindelsene fra prøven og konsentrere dem i belegget på silikafibre uten at de ikke-flyktige forbindelsene i prøven. HS-SPME gir raskere analyse enn vanlig SPME, introduksjon av uønskede forbindelser som vann unngås og den muliggjør bruk av metoden på prøver av fast stoff. Deteksjonsgrensen for teknikken kan være helt ned til ppt-nivå [22]. Nøyaktig grense er avhengig av analysemetode og hvilken detektor som brukes, dette er svært lik deteksjonsgrensen for direkte SPME.

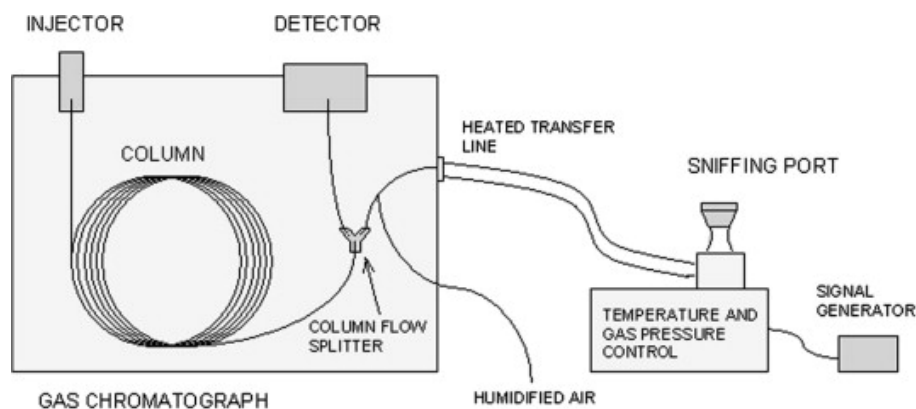
Ved romtemperatur vil HS-SPME være svært effektivt for å isolere forbindelser med Henry's konstanter, en konstant som beskriver flyktigheten til en forbindelse, på over  $90 \text{ atm} * \text{cm}^3/\text{mol}$ . Teknikken kan også brukes for prøver med lavere flyktighet dersom høy sensitivitet kan oppnås uten å nå likevekt. Tiden for å oppnå likevekt for mindre flyktige forbindelser kan senkes betydelig ved omrøring av både løsningen og gassen over prøven, ved økning av temperaturen ved prøvetaking og ved redusering av gassvolumet over prøven [22].

### 2.2.4 Gasskromatografi - Olfaktometri

Gasskromatografi-olfaktometri (GC-O) er en analysemetode der det brukes menneskelige dommere for å detektere og vurdere flyktige forbindelser som eluerer

ut ved bruk av deres lukt. De menneskelige dommerne erstatter eller brukes i kombinasjon med en mer tradisjonell detektor som en flammeionisasjonsdetektor eller MS [23]. Dommerne lukter på eluatet som eluerer ut fra kolonnen via en egen lukteport for å detektere tilstedeværelse av luktaktive forbindelser. Originalt var GC-O brukt som en screeningmetode for å bestemme om en gitt prøve inneholdt en eller flere forbindelser som var luktaktive, men i senere tid har mer avanserte bruksområder blitt beskrevet. Metoden kan nå brukes for å beskrive relativ viktighet for hver enkelt flyktige forbindelse som er luktaktiv i en prøve.

For hver separerte forbindelse som eluerer ut via gasskromatografi har en menneskelig dommer muligheten for å detektere forbindelsen (luft eller ikke), varigheten av lukten, beskrive opplevd lukt og luktens intensitet. Basert på dette har flere GC-O teknikker blitt utviklet og kan deles inn i tre typer: deteksjonshyppighet, fortynning til lukterskel og direkte intensitet.



**Figur 1:** Skjema for oppsett av GC-O [24]

Ved deteksjonshyppighet brukes flere dommere (6-12), der hver av dem utfører GC-O på samme prøve. Proporsjonen av dommere som detekterer et luktaktiv forbindelse ved en spesifikk retensjonstid telles. Forbindelser med høyere deteksjonsfrekvens blir gitt en høyere relativ viktighet, som antas å være relatert til faktisk opplevd luktintensitet ved gitt konsentrasjon av forbindelsen [25]. I tillegg kan tidsintervallet for lukt måles (tidslengde fra start av lukt til slutt av lukt).

Fortynning til lukterskel brukes for å kvantifisere luktintensitet for en forbindelse. Dette gjøres basert på forholdet mellom fortynning og lukterskel i luft [25]. Det produseres en forfynningsrekke av forbindelsen, og hver forfynnet løsning analyseres ved GC-O. Det registreres om dommerne detekterer lukt og vanligvis registreres også en lukt beskrivelse.



Ved direkte intensitet, bruker dommerne en skala for å måle opplevd intensitet for forbindelsen som elueres ut. Direkte intensitet brukes gjerne over fortykning til luktterskel, siden fortykning til luktterskel ikke vil måle opplevd stimulus. Metoden har dessverre sine ulemper, blant annet kreves en vesentlig mengde trening av dommerne for å kunne ha individuell reproduserbarhet [26].

### 2.2.5 Flammefotometrisk detektor

Gasskromatografi med en flammefotometrisk detektor (GC-FPD) er en teknikk som brukes for å analysere flyktige forbindelser som inneholder svovel eller fosfor. En FPD sender prøven gjennom en hydrogen/luft-flamme. Hydrokarboner med svovel eller fosfor generer kjemiluminescens ved spesifikke bølgelengder som kan sendes til en fotomultiplikator og dermed generere et elektrisk signal som kan måles. Dette er basert på dannelse av eksitert svovel ( $S_2^*$ ) eller eksitert hydrogenfosforoksid ( $HPO^*$ ) i en reduserende flamme [27].

Som med andre gasskromatografiteknikker, krever FPD en bærer-gass med lavt vannivå og lavt nivå av oksygen urenheter da de vil påvirke stasjonærfasen. FPD er også særlig ømfintlig mot hydrokarbonurenheter i hydrogen- og lufttilførselen da det fører til økt støy og nedsatt følsomhet.

### 2.2.6 Time-of-flight-massepektrometri

Massepektrometri er en analytisk teknikk som baseres på måling av forholdet mellom masse og ioneladning. For å oppnå dette kreves en egnet metode for ionisering av molekyler og deteksjon av antallet ioner ved bestemte masse/ladningsforhold. De mest populære alternativene for ionisering ved GC-MS er “electron impact” (EI) og elektropray-ionisering (ESI).

Ved EI, akselereres elektroner til de har tilstrekkelig energi for å kunne fjerne elektroner fra nøytrale molekyler. Ved ESI sendes prøven gjennom et høypotensial, elektrisk kapillær som fører til en elektrostatiske spray av ladde dråper. Deretter kokes løsningsmidlet av, og de ioniserte analyttene sendes til detektoren.

Time-of-flight-massepektrometre (TOF-MS) er basert på et relativt enkelt konsept. TOF-MS akselererer ioner gjennom et elektrisk potensial før de strømmer ned et rør til detektoren. Dersom man antar at alle ioner starter denne prosessen med lik energi vil ioner med ulik masse nå detektoren med ulik hastighet (basert på ionenes masse). Når massepektrometeret har et strømningsrør med en gitt lengde, kan man bestemme ionets masse basert på flyvetiden ionet har til detektoren [28].

Et kritisk konsept ved denne ellers relativt enkle metoden er kravet til å produsere ioner med en nøyaktig kjent posisjon og start tid.

Oppløsningen av TOF-MS er vanligvis under 15 000 på grunn av uunngåelig variasjon i ioneenergi. Instrumentet krever også rask elektronikk for tilstrekkelig oppløsning på grunn av at ioner når detektoren ved intervaller så lave som  $10^{-7}$  s. Masserekkevidden på disse instrumentene er ubegrenset, og de er dermed svært egnede for store biomolekyler [29].

## 3 Diskusjon

For å kunne svare på bacheloroppgavens spørsmål, må man vurdere de ulike mulighetene man har for å kunne gjennomføre kvantitativ analyse av 3-metyl-2-buten-1-tiol (MBT) i øl. Her sammenlignes tidligere brukte teknikker som kan deles opp i tre kategorier, separasjonsmetode, deteksjonsmetode og prøveopparbeidelse. Det er da viktig å finne gode teknikker for alle de tre kategoriene for å oppnå en god og fullstendig analysemetode.

### 3.1 Separasjonsmetoder

For å kunne bestemme mengden av et stoff i en løsning med en tilstrekkelig nøyaktighet, er det gunstig å kunne separere stoffet fra de andre stoffene i løsningen. Da er det naturlig å tenke på kromatografi som en god løsning. Dette kan man også se på tidligere forskning der separasjonsmetodene som hovedsakelig brukes er HPLC og GC.

Gasskromatografi er generelt godt egnet for separasjon av flyktige forbindelser, dette gir et godt grunnlag for vurdering av metoden for analyse av MBT. Etersom MBT er et stoff med en lav smak- og luktterskel, vil oppkonsentrering være nødvendig. Videre har øl et flertall av flyktige svovelforbindelser som vil kunne sette store krav til kolonnen for å oppnå tilstrekkelig separasjon. Dette gir et mindre utvalg av kolonner, men det har blitt funnet kolonner som er egnet til oppgaven. Videre er gasskromatografi generelt den minst kostbare av disse to analysemetodene.

HPLC gir ofte rask og nøyaktig analyse av forbindelser i en løsning. Metoden har også flere variabler som kan justeres for å finne et egnet kromatografimiljø for forbindelsen. Videre er det også muligheter for derivatisering av forbindelsen dersom dette gir et bedre analyseresultat [30]. Ulempen med metoden er høyere driftskostnad, først og fremst på grunn av løsningsmiddelforbruk. HPLC har blitt brukt til kvantitativ analyse av MBT i øl, men med vesentlig mindre hyppighet enn gasskromatografi. HPLC er brukt både til direkte analyse av MBT og indirekte via analyse av riboflavin med gode resultater [31] [32]. Det virker som favoriseringen av gasskromatografi fremfor HPLC, hovedsakelig er på grunn av unødvendig høy kostnad når gasskromatografi oppnår et tilstrekkelig resultat (avhengig av brukt detektor og prøveopparbeidelse).

Det ser ut til at begge separasjonsmetodene, både HPLC og GC, vil kunne oppnå ønskede resultater, men rent økonomisk vil bruk av gasskromatografi mer gunstig.

### 3.2 Detektorer

Å oppnå den beste separasjonen som er mulig for en gitt prøve gir ingen brukbare resultater uten en egnet detektor. Man trenger en detektor med god spesifisitet og følsomhet for små, flyktige svovelforbindelser, spesifikt MBT. Utvalget av deteksjonsmetodene som har blitt nevnt tidligere og blir diskutert nå er basert på deteksjonsmetoder som tidligere har blitt brukt til deteksjon av MBT.

Flammefotometriske detektorer har relativt god følsomhet ovenfor svovelholdige forbindelser. Den eksiterte arten av svovel i detektoren vil være diatomisk, noe som gir en intensitet som er proporsjonal med kvadratet av svovelskonsentrasjonen i eluatet uavhengig av svovelforbindelsen [27]. Ved gunstige betingelser har det blitt oppnådd følsomhet under ppm-nivå ved bruk av FPD [8].

Videre finnes en variant kalt pulsert flammefotometrisk detektor som bruker en flammekilde og gasstilførsel som ikke er tilstrekkelig for å oppnå en konstant flamme. Prøven antennes via en spredt påtent flamme som deretter slukkes, noe som gjentas 2-4 ganger i sekundet. Selektiviteten oppnås via et egnet filter. Videre oppstår stråling fra hydrokarboner raskere enn fra heteroatomiske forbindelser, og dette gir tidsseparasjon mellom artene. Dette gir bedre selektivitet og følsomhet på grunn av flammens reduserte bakgrunnssignal.

Om man ønsker å oppnå bedre følsomhet, kan massespektrometri basert på EI eller ESI være løsningen [33]. Det er to hovedtyper som er av interesse her, nemlig "time-of-flight" massespektrometri (TOF-MS) og kvadrupol massespektrometri.

Bruk av TOF gir generelt god oppløsning, men denne gode evnen for masseoppløsning har en ulempe. En effekt av god masseoppløsning er lavere sensitivitet som fører til et lavere dynamisk område for analysen. Dette fører til at TOF generelt er mindre egnet for å kvantifisere mindre molekyler [28].

Kvadrupol masseanalyse oppnås ved bruk av selektive massefiltre som kan kobles i tandem med hverandre. Metoden kan oppnå høy sensitivitet og spesifisitet derfor er metoden egnet til fokusert analyse. Den har ulempen at man må bevisst lete etter forbindelsene man vil finne [34]. Dersom en prøve har andre forbindelser av interesse som ikke vil oppdages innenfor oppsettet man tar i bruk, vil forbindelsen ikke bli detektert.

Basert på bruksområdet, en spesifikk forbindelse som er liten, vil kvadrupol masseanalyse være den beste av disse metodene. Om det skulle være nødvendig, er det også mulig å koble kvadrupol med TOF for MS/MS Q-TOF.

Avhengig av hva som er ønsket resultat, av analysen er det mulig olfaktometri kan forkastes kun basert på prinsipp. Dersom det ønskes en fullstendig kvantitativ analyse som for eksempel kan brukes videre for å kunne beregne reaksjonsrate ved ulike inhiberende metoder, er metoden fullstendig uegnet.

Om man derimot er interessert i endelig resultat av ulike metoder for å bremse dannelsen av MBT, er det muligheter for god bruk av metoden. Om man er interessert i endelig resultat av ølets aroma-profil, kan bruk av menneskelige dommere være god metode. Rene tall har sin plass dersom man er interessert i aroma-profilen, men det har også menneskelig oppfattelse. GC-O kan være spesielt egnet dersom man vil bestemme om en metode for å bremse dannelsen av MBT er tilstrekkelig til at den gjennomsnittlige forbrukeren ikke legger merke til det. Særlig ettersom duftterskelen for MBT varierer for ulike øltyper.

Alt dette er basert på tilgjengelighet av tilstrekkelig trente dommere, eller muligheten til å trene opp nye dommere. Dette tilsier, spesielt om man må trene opp nye dommere, at et visst antall analyser kreves før det er økonomisk lønnsomt å bruke metoden.

Sammenkobling av olfaktometri og en tradisjonell detektor er vanlig, og for kombinert kvantitativ og sensorisk analyse er fint mulig å koble sammen olfaktometri med en PFPD [24].

UV-vis spektrofotometri kan være en interessant indirekte analysemetode for bestemmelse av MBT. Dette oppnås via spektrofotometrisk måling av riboflavinkonsentrasjon i øl [10]. Basert på reaksjonsmekanismen for dannelse av MBT, som inkluderer hovedsakelig riboflavin som fotosensibiliserende stoff, er det mulig å konsentrasjonsbestemme MBT. Det har blitt vist at reaksjonsraten for dannelse av MBT øker lineært med konsentrasjonen av riboflavin. Riboflavin vil absorbere stråling ved 373 nm og 445 nm, og absorbans ved denne bølgelengden reduseres når øl er utsatt for sollys [10]. Sensitiviteten er noe dårligere enn alternativene, men UV-vis spektrofotometri kan brukes som en indikator for om øl er utsatt for sollys uten krav for separasjon av løsningen. Videre krever ikke metoden separasjon via kromatografi eller annet preparativt arbeid da de fleste øltyper ikke inneholder andre forbindelser med nevneverdig absorbans ved disse bølgelengdene [10]. Nedbrytningsprodukter av isohumuloner og riboflavin vil etter tilstrekkelig lyseksponering føre til en grumsete løsning som forårsaker at analysemetoden ikke lenger vil kunne tas i bruk uten å benytte en separasjonsmetode.

Vi har flere egnede detektorer som kan brukes, og hvilken som er best baseres da på hvilke data man ønsker å få ut av analysen og hva som er en akseptabel kostnad per analyse.

### 3.3 Preparativt arbeid og prøveopparbeidelse

Separasjonsmetodene og de fleste av deteksjonsmetodene beskrevet tidligere, krever eller oppnår bedre resultater ved god prøvepreparasjon. Videre kan også preparativt arbeid forbedre egenskaper som separasjon og dermed følsomhet.

Dersom preparativt arbeid er nødvendig, har man hovedsakelig alternativene preparativ kolonnekromatografi og preparativ HPLC. Preparativ kolonnekromatografi vil øke arbeidsmengden som kreves, og preparativ HPLC vil relativt drastisk øke kostnaden. På grunn av disse faktorene, arbeidsmengde og kostnad, er det mer ønskelig å bruke en god metode for opparbeidelse av prøvene. Dette vil redusere enten arbeidsmengde eller kostnad. Unntaket her er indirekte analyse ved konsentrasjonsbestemmelse av riboflavin. Dersom det er mulig å benytte denne metoden, er det ikke alltid nødvendig med separasjon av løsningen.

SPME er generelt en god ekstraksjonsmetode, men direkte SPME er mest egnet for bruk der man ønsker å analysere mindre flyktige forbindelser [34]. Ekstraksjon med direkte SPME kan føre til at en rekke forbindelser vi ikke er interessert i blir med til kolonnen. De stoffene vi får med i tillegg, vil generelt føre til lengre elueringstider for helheten av prøven. Når omfanget av forbindelsene som ekstraheres økes, vil det kunne komplisere analysen med tanke på å oppnå tilstrekkelig separasjon. Videre er det da også større mulighet for ekstrahering av stoffer som kan senke levetiden til kolonnen unødvendig.

HS-SPME vil ved denne applikasjonen gi oss fordelene med SPME, men uten en god del av ulempene den metoden kan innføre. Spesielt siden HS-SPME fokuserer på ekstraksjon av flyktige forbindelser fra prøven, som er de forbindelsene vi er interessert i. Det bør nevnes at HS-SPME ikke ekstraherer hele den flyktige fraksjonen av prøven, men en reproducerbar delmengde.

HS-SPME og purge-and-trap er beslektede metoder. HS-SPME kan beskrives som statisk headspace, mens purge-and-trap kan beskrives som dynamisk headspace. For analyse av forbindelser som har en god evne til å bli purget og kan bli effektivt fanget, vil purge-and-trap ha høyere følsomhet. Dette kommer av at purge-and-trap sin egenskap til å levere hele den flyktige fraksjonen i motsetning til HS-SPME som vil levere en delmengde. Noen ulemper med purge-and-trap vil være risikoen for å tape veldig flyktige forbindelser dersom overflødig purgetider eller strømrater blir tatt i bruk. Metoden har også en noe redusert hastighet og tar i bruk mye dyrt og skjørt glassutstyr. Ved analyse av øl er den største utfordringen at purge-and-trap har problemer med prøver som skummer [35], noe øl har en tendens til å gjøre.

## 4 Konklusjon

I denne oppgaven ble det sett på hvordan 3-metyl-2-buten-1-tiol (MBT) dannes i øl, hvilke faktorer som påvirker om MBT dannes og reaksjonsraten for dannelsen. Til slutt ble det sett på relevante analysemetoder som kan tas i bruk for analyse av MBT i øl og hvilken prøveoppbeidelse som er nødvendig.

Analysemetodene som ble beskrevet og diskutert var basert på metoder som har blitt tatt i bruk ved tidligere forskning på MBT. Det var da satt spesielt fokus

på forskning der MBT ble enten kvantitativt analysert eller analysert i forhold til menneskers opplevelse av ølet i sin helhet. Metodene ble sammenlignet for å kunne indikere hvilken kombinasjon av preparativt arbeid, prøveopparbeidelse, separasjonsmetode og detektor som kunne oppnå best resultat.

Basert på egenskapene ved de ulike metodene ble det kommet fram til at for analyse hvor man ønsker konkrete tall å bruke videre, virker HS-SPME-GC-PFPD som det beste alternativet av de diskuterte metodene dersom man tar med kostnad som en faktor. Dersom man er villig til å øke kostnaden for å oppnå økt følsomhet, kan man erstatte PFPD med kvadrupol MS. Om man gjennomfører analyse for å se på aroma- og smaksopplevelse, ser HS-SPME-GC-O ut til å være det ideelle valget. Det bekreftes også av tidligere forskning hvor olfaktometri var oftest valgt ved analyser av smaks- og aromastoffer. Bruk av GC - Olfaktometri må vurderes opp mot tilgjengelighet eller mulighet for trening av nye dommere.

Muligheten for å koble sammen olfaktometri og PFPD for kombinert kvantitativ og sensorisk analyse, er også eksisterende.

Sist, men ikke minst fyller UV-vis spektroskopi en viktig rolle da det er mulig å bruke det som en indikasjon på dannelsen av MBT, og dermed gi en indikasjon om videre analyse vil gi relevante resultater. Med alle ukontrollerte variabler som oppstår ved ølbrygging, kan man ikke lene seg på UV-vis spektroskopi for kvantitative målinger.

## Referanser

- [1] Y. Obata, M. Koshika, and H. Tanaka. *Agr. Biol. Chem.*, **1961**, *25*(7), 588-593.
- [2] D. de Keukleire, A. Heyerick, K. Huvaere, L.H Skibsted, and M.L Andersen. *Cerevisia*, **2008**, *33*(3), 133-144.
- [3] I. Caballero, C.A Blanco, and M. Porras. *Trends in Food Science and Technology*, **2012**, *26*(1), 21-20.
- [4] T. Kishimoto, A. Wanikawa, K. Kono, and K. Shibata. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*(23), 8855-8861.
- [5] A. Heyerick, Y. Zhao, P. Sandra, K. Huvaere, F. Roelens, and D. De Keukeleire. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2003**, *2*, 306-314.
- [6] H.T Fritsch and P. Schieberle. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*(19), 7544-7551.
- [7] C. Vermeulen, I. Lejeune, T.T. Tran, and S. Collin. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*(14), 5061-5068.
- [8] P.G Hill and R.M Smith. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *872*(1-2), 203-213.
- [9] F. San-Juan, J. Cacho, V. Ferreira, and A. Escudero. *Talanta*, **2012**, *99*, 225-231.
- [10] R. Pozdrik, F.A Roddick, and P.J Rogers and T. Nguyen. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*(17), 6123-6129.
- [11] Y. Obata, H. Tanaka, and Y. Ishikawa. *Agr. Biol. Chem.*, **1965**, *29*(2), 104-110.
- [12] C.S Burns, A. Heyerick, D. de Keukeleire, and M.D Forbes. *Chemistry: A European Journal*, **2001**, *7*(21), 4553-4561.
- [13] y. Koriwa and N Hasihmoto. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1961**, *19*(1), 28-36.
- [14] S. Sakuma, Y. Rikimaru, K. Kobayashi, and M. Kowaka. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1991**, *49*(4), 162-165.
- [15] A.J Irwin, L. Bordeleau, and R.L Barker. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1993**, *51*(1), 1-3.
- [16] C. Schönberger and T. Kostecky. *J. Inst. Brew.*, **2011**, *117*(3), 259-267.
- [17] S. Vichi, Y. Jerí, N. Cortés-Francisco, O. Palacios, and J. Caixach. *Food Res. Int.*, **2014**, *64*, 610-617.
- [18] B. Kolb and L.S Ettre. *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*. Wiley, **2006**, 1-8.

- [19] K. Robards, P.R Haddad, and P.E Jackson. *Principle and Praticce of Modern Chromatografic Methods*. Elsevier, **1994**, 154-156.
- [20] S.M Abeel, A.K Vickers, and D. Decker. *J. Chromatogr. Sci.*, **1994**, *32(8)*, 328–338.
- [21] S. Rossi, V. Sileoni, G. Perretti, and O. Marconi. *J. Sci. Food Agric.*, **2014**, *94(5)*, 919-928.
- [22] Z. Zhang and J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, **1993**, *65(14)*, 1843-1852.
- [23] S.M van Ruth. *Biomol. Eng.*, **2001**, *17(4-5)*, 121-128.
- [24] B. Plutowska and W. Wardencki. *Food Chem.*, **2008**, *107(1)*, 449-463.
- [25] B. Zellner, P. Dugo, G. Dugo, and L. Mondello. *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1186(1-2)*, 123-143.
- [26] C.M Delahunty, G. Eyres, and J.P Dufour. *J. Sep. Sci.*, **2006**, *29(14)*, 2107–2125.
- [27] J. Ševčík. *Journal of Chromatography Library: Volume 4*. Elsevier, **1976**, 145-164.
- [28] U. Boesl. *Mass Spectrom. Rev*, **2017**, *36(1)*, 86-109.
- [29] R.M Silverstein, F.X Webster, and D.J Kiemle. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Wiley, **2005**, 12.
- [30] S. Vichi, Y. Jeri, N. Cortés-Francisco, O. Palacios, and J. Caixach. *Food Res. Int.*, **2014**, *64*, 610-617.
- [31] M. Akiyama, K. Murakami, and M. Ikeda. *Food Sci. Technol. Res.*, **2005**, *11(3)*, 298-307.
- [32] C. Andrés-Lacueva, F. Mattivi, and D. Tonon. *J. Chromatogr. A*, **1998**, *823(1-2)*, 355-363.
- [33] A.M Mezui and P. Swart. *J. Inst. Brew.*, **2010**, *116(4)*, 348-353.
- [34] H. Steen, B. Kuster, and M. Mann. *J Mass Spectrom.*, **2001**, *36(7)*, 782-790.
- [35] M.D Erickson, M.K Alsup, and P.A Hyldbürg. *Anal. Chem.*, **1981**, *53*, 1265-1269.