

SUPERKRITICKÁ EXTRAKCE KAPALIN – NOVÁ PROGRESIVNÍ METODA V PIVOVARSKÉ ANALYTICE

Část II. – Možnosti uplatnění superkritické extrakce kapalin při analýze senzoricky aktivních látek v pivě

SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION – NEW PROGRESSIVE METHOD IN BREWING ANALYTICS

Part II. - The Options of Utilizing Supercritical Fluid Extraction to Analyze Sensory Active Substances in Beer

JIŘÍ ČULÍK, TOMÁŠ HORÁK, PAVEL ČEJKA, MARIE JURKOVÁ, VLADIMÍR KELLNER, PAVEL KARÁSEK¹, EVA VARADOVÁ-OSTRÁ¹

Pivovarský ústav Praha, VÚPS, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting PLC, Brewing Institute - Prague, Lípová 15, CZ-120 44 Prague 2*, e-mail: culik@beerresearch.cz

¹Ústav analytické chemie AV ČR Brno, Veveří 97, 611 42 Brno / *Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of Czech Republic, Veveří 97, CZ-611 42 Brno*

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M. – Kellner, V. – Karásek, P. – Varadová-Ostrá, E.: Superkritická extrakce kapalin – nová progresivní metoda v pivovarské analytice. Část II. – Možnosti uplatnění superkritické extrakce kapalin při analýze senzoricky aktivních látek v pivě. *Kvasny Prum.* 52, 2006, č. 5, s. 142–147.

Superkritickou fluidní extrakci (SFE) kapalných vzorků lze považovat, i přes určité dílčí problémy, za novou perspektivní metodu, která by mohla, po jejím dalším zdokonalení, najít uplatnění v oblasti stopové analýzy piva. V článku jsou prezentovány první výsledky dosažené při extrakci senzoricky aktivních látek (alkoholů, mastných kyselin a jejich esterů) z piva. Jedná se o šetrnou a ekologickou metodu, nezatěžující zkoumanou matici a pracující s omezeným množstvím organických rozpouštědel, což plně odpovídá moderním trendům analytické chemie a požadavkům na ochranu životního prostředí.

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M. – Kellner, V. – Karásek, P. – Varadová-Ostrá, E.: Supercritical fluid extraction – new progressive method in brewing analytics. Part II. – The options of utilizing supercritical fluid extraction to analyze sensory active substances in beer. *Kvasny Prum.* 52, 2006, No. 5, p. 142–147.

Supercritical fluid extraction (SFE) of liquid samples can, despite certain problems, be considered a new prospective method, which, after further perfecting it, could establish itself in the field of analysis of trace amounts of sensory active substances in beer. In the article, the first results of extracting sensory substances from beer (alcohols, fatty acids and their esters) are presented. The method is gentle and environmentally friendly, it does not affect the analyzed material and uses a limited amount of organic solvents. Therefore, it corresponds with the modern trends in analytic chemistry and meets the demands of protecting the environment.

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M. – Kellner, V. – Karásek, P. – Varadová-Ostrá, E.: Superkritische Extraktion von

Klíčová slova: superkritická extrakce kapalin, SFE, senzoricky aktivní látky

1 ÚVOD

Při analýze senzoricky aktivních látek v pivu se setkáváme s několika problémy, jejichž řešení často vyžaduje protichůdná opatření a ne vždy je možné tato opatření vzájemně sladit. Do skupiny senzoricky aktivních látek řadíme zejména nižší a vyšší alkoholy, mastné kyseliny a jejich estery, a dále i například vicinální diketony.

Analýza vicinálních diketonů je, s ohledem na jejich poměrně vysokou tenzi par, uspokojivě vyřešena nasazením headspace technik.

Naproti tomu skupina alkoholů, mastných kyselin a jejich esterů tvoří různorodou skupinu, jejíž zástupci se liší velikostí molekuly, polaritou a dalšími fyzikálními vlastnostmi. V důsledku to tedy znamená, že nejen že musíme používat pro jednotlivé skupiny těchto látek různé izolační postupy, ale v případech zvýšených požadavků na kvalitu analytických výstupů jsme nuceni volit i různé analytické postupy pro jednotlivé zástupce dané skupiny. Typickým příkladem je například nut-

Flüssigkeiten. Teil II. – Die Möglichkeiten der Anwendung einer superkritischen Extraktion von Flüssigkeiten für die Analyse von sensorisch aktiven Stoffen im Bier. *Kvasny Prum.* 52, 2006, Nr. 5, s. 142–147.

Trotz einigen Teilproblemen, kann die superkritische Fluidextraktion (SFE) von Flüssigmustern als eine neue perspektive Methode betrachtet werden, die nach einer weiteren Verbesserung ihren Platz im Bereich der Spuranalyse des Bieres finden kann. Im diesen Artikel werden die erste Ergebnisse veröffentlicht, die bei der Extraktion von sensorisch aktiven Stoffen (Alkohole, Fettsäuren und ihre Estere) im Bier analysiert wurden. Es handelt sich um eine umweltschonende Methode, die die geprüfte Matritz nicht belastet und die mit einer beschränkter Mengen an organischen Lösungsmitteln arbeitet, was den neuesten Trends der organischen Chemie und dem Umweltschutz entspricht.

Чулик, Й. – Горак, Т. – Чейка, П. – Юркова, М. – Келлнер, В. – Карасек, П. – Варадова-Остра, Е.: Суперкритическое экстрагирование жидкостей – новый прогрессивный метод в пивоваренной аналитике. 2. часть – Возможности использования суперкритического экстрагирования жидкостей при анализе сенсорически активных веществ в пиве. *Kvasny Prum.* 52, 2006, No. 5, стр. 142–147.

Суперкритическую флуидную экстракцию (СФЭ) жидких проб можно считать, вопреки некоторым проблемам, новым перспективным методом, который мог бы найти, после его усовершенствования, применение в области анализа ничтожно малых количеств в пиве. В статье приводятся первые результаты, достигнутые путем экстрагирования сенсорически активных веществ (спирты, жирные кислоты и их эфиры) из пива. Метод является неагрессивным, экологическим, незагружающим исследуемую матрицу. При его использовании применяется ограниченное количество органических растворителей, что вполне соответствует современному тренду аналитической химии и требованиям на охрану жизненной среды.

Key words: supercritical fluid extraction, SFE, sensory active substances

1 INTRODUCTION

When analyzing sensory active substances in beer, we encounter several problems. Their resolution often requires contradictory measures and it is not always possible to coordinate them all. As sensory active substances we consider lower and higher alcohols, fatty acids and their esters and further even vicinal diketones.

The analysis of vicinal diketones is efficiently resolved by using headspace techniques, with regard to their relatively high vapour tension.

On the other hand, the group of alcohols, fatty acids and their esters forms a diverse group, whose representatives vary in molecule size, polarity and other physical characteristics. In effect, this means that not only must we use different isolation methods for the individual groups of these substances, but in the case of demands for higher quality of the analytical results, we also must choose different analy-

nost extrahovat vyšší estery a fenolické alkoholy jiným postupem než alkoholy a estery nižší a volit i jinou analytickou koncovku [1-4]. Je zřejmé, že tento postup lze s větší aplikovat například při rychlé provozní kontrole průběhu kvašení.

Proto jsme využili možnost vyzkoušet nový způsob extrakce senzoricky aktivních látek metodou superkritické extrakce kapalin, neboť zde existoval předpoklad možného budoucího využití této nové a v potravinářské analytice dosud neozkoušené metody i v oblasti pivovarské analytiky.

V článku jsou prezentovány první výsledky získané v oblasti extrakce vybraných senzoricky aktivních složek piva, a to nižších alkoholů a esterů a vyšších mastných kyselin.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Jak již bylo řečeno, smyslem této práce bylo ověřit možnost stanovit senzoricky aktivní látky (nižší alkoholy, estery a mastné kyseliny) v pivu s pomocí SFE a porovnat dosažené výsledky s výsledky docílenými klasickou destilací s vodní párou (zrychlená metoda AZL prováděná na přístroji Büchi [1]).

V první fázi byla provedena optimalizace podmínek SFE pomocí analýzy neobohacených a obohacených vzorků piv výše uvedenými analyty a následně byly vzájemně porovnány dosažené výťažnosti a opakovatelnosti u obou metod.

Analytické hodnocení piv

Extrakce nižších alkoholů a esterů byla provedena pomocí zrychlené destilace s vodní párou [1], extrakce mastných kyselin pomocí extrakce na pevné fázi [2].

Extrakce nižších alkoholů, esterů a mastných kyselin metodou superkritické fluidní extrakce kapalin (SFE) probíhaly následujícím způsobem: Před vlastní analýzou byl vzorek po dobu 10 minut odplyněn v ultrazvukové lázni. K vlastní analýze byl odebrán vzorek o objemu 150 ml. Extrakce probíhala za následujících extrakčních podmínek:

teplota	50 °C
tlak	20 MPa
průtok vzorku	0,5 až 0,6 ml/min
průtok CO ₂	3,6 až 3,8 m
záchytné rozpouštědlo n-hexan resp. ethanol, chlazené na 10 °C	
výsledný objem extraktu doplněn na 20 ml.	

Nižší alkoholy, estery i mastné kyseliny byly stanoveny metodou plynové chromatografie a detekce plamenioionizačním detektorem (FID) [1, 2].

Nižší mastné kyseliny (do C₁₀) byly v extraktech stanoveny plynovou chromatografií přímo. Vyšší mastné kyseliny byly derivatizovány a jejich methylestery stanoveny na plynovém chromatografu vybaveném plamenioionizačním detektorem (FID). Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí metody vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byla použita kyselina n-heptanová pro stanovení nižších mastných kyselin; pro stanovení vyšších mastných kyselin byly využity kyseliny tridekanová, pentadekanová a heptadekanová.

Optimalizace extrakčních podmínek SFE – těkavé látky

V první etapě byla odzkoušena vhodnost zvoleného záchytného rozpouštědla. Záchyt byl proveden do 96% ethanolu a n-hexanu.

Piva byla obohacena přidávkou jednotlivých analytů uvedených v tab. 1. Výsledky získané ze čtyř paralelních SFE extrakcí obohace-

tical methods for the individual representatives of a given group. A typical example is the need to extract higher esters and phenolic alcohols differently than lower esters and alcohols and to use a different analytic finish [1-4]. It is clear that this method is difficult to apply for example, for the fast routine check of the fermentation process.

We tested out extracting sensory active substances by the new supercritical fluid extraction method, as we foresaw a possible future use of this modern method, which has not been tried out in food analytics before, in the field of brewing analytics.

In the article, the first results of extracting selected sensory active substances in beer, those being lower alcohols and esters and lower and higher fatty acids, are presented.

2 EXPERIMENTAL PART

As has been said before, the purpose of this study was to test out the possibility of determining sensory active substances (lower alcohols, esters and fatty acids) in beer with the help of SFE and to compare the received results with the results achieved by traditional steam distillation (shortened AZL method done using Buchi analyzer [1]).

That is why, the conditions for SFE were optimized in the first phase by analyzing non-enriched and enriched (with the above-mentioned analytes) beer samples. Then, the achieved yields and repeatability of both methods were compared.

Analytical beer assessment

Lower alcohols and esters were extracted by shortened steam distillation [1], fatty acids were extracted by solid-phase extraction [2].

The extraction of lower alcohols, esters and fatty acids with the help of supercritical fluid extraction (SFE) was carried out in the following manner.

The sample was de-gassed in an ultrasound bath for 10 minutes before its analysis. The sample volume was 150 ml. The extraction was done under the following extraction conditions:

temperature	50 °C
pressure	20 MPa
sample flow	0,5 to 0,6 ml/min
CO ₂ flow	3,6 to 3,8 ml/min
capturing solvent n-hexane or ethanol, cooled at 10 °C	
final extract volume topped up to 20 ml.	

Lower alcohols, esters and fatty acids were determined by the gas chromatograph (GC) equipped with a flame ionization detector (FID) [1, 2].

Lower fatty acids (to C₁₀) were determined in the extracts directly by gas chromatography. Higher fatty acids were derived and their methyl esters were determined on a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID). Qualitative evaluation was done by the internal standard method. N-heptanoic acid was used as the internal standard; for determining the lower fatty acids tridecanoic, pentadecanoic and heptadecanoic acids were used for the higher fatty acids.

The optimization of extraction conditions of SFE – volatile compounds

In the first stage, the suitability of the selected capturing solvent was tested. The capture was done into 96% ethanol and n-hexane.

The beers were enriched with individual analytes listed in Tab. 1. The results from four parallel SFE extractions of an enriched and

Tab. 1 Množství těkavých látek použitých k obohacení vzorku / Amount of volatile compounds used to enrich the sample

Vložená látka / Internal standard	Označení v grafu / Graph label	Množství / Amount (mg/l)
octan isoamylatý / isoamyl acetate	OCTISOAM	5
kapronan ethylatý / ethyl caproat	KAPRONET	5
mléčnan ethylatý / ethyl lactate	MLECET	5
kaprylan ethylatý / ethyl caprylate	KAPRYLET	5
ethylhexanol	ETHEXANOL	50
octan fenylatý / phenyl acetate	OCTFENYL	5
kaprinan ethylatý / ethyl caprinat	KAPRINET	5
furfurylalkohol / furfuryl alcohol	FURFURYLALK	50
2-fenylacetát / 2-phenyl acetate	2-FENACET	5
lauran ethylatý / ethyl laurate	LAURET	5
2-fenylethanol (β-fenylethanol) / 2-phenylethanol	BFENETHAN	50
myristan ethylatý / ethyl myristate	MYRISTET	5
palmitan ethylatý / ethyl palmitate	PALMET	5

ného a neobohaceného vzorku piva v závislosti na použitém záchytném rozpouštědle jsou uvedeny na obr. 1.

Z výše uvedeného vyplývá, že výtěžnost u jednotlivých látek značně kolísala, nicméně dosažené výsledky u n-hexanu (průměrná výtěžnost 55 %) byly lepší než u ethanolu (průměrná výtěžnost 37 %). Z tohoto důvodu byly následující pokusy prováděny za použití n-hexanu jako záchytného rozpouštědla.

Účinnost SFE závisí kromě tlaku a teploty i na dosažených průtocích kolonou, které lze regulovat vhodnou volbou restriktorů. Z tohoto důvodu bylo nutné provést optimalizaci pracovních podmínek na vlastním SFE extraktoru. V tab. 2 jsou uvedeny jednotlivé varianty. Každá varianta byla ověřena na dvojici vzorků piva bez a s přidavkem stanovené látky.

Vzorky byly kódově označeny ve formátu Pos1, Pos2, Pos3, a Pos4, kde

Pos1 P = neobohacený vzorek

S = obohacený vzorek

Pos2 I = CO₂ restriktor o délce 85 cm

II = CO₂ restriktor o délce 170 cm

Pos3 1 = vodný restriktor o délce 27 cm

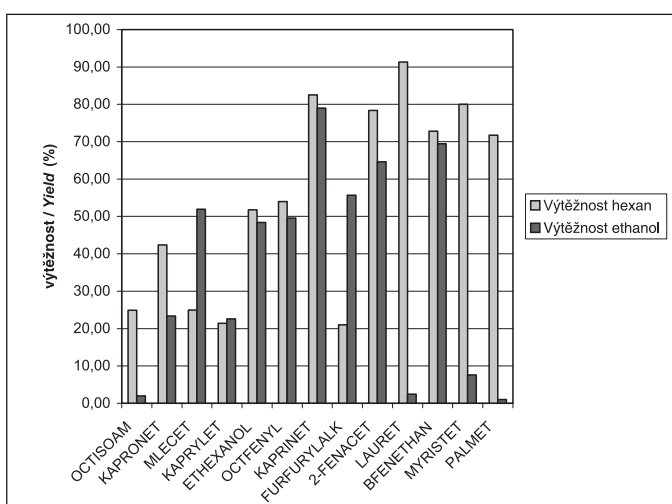
2 = vodný restriktor o délce 17 cm

3 = vodný restriktor o délce 12 cm

4 = vodný restriktor o délce 8 cm

5 = vodný restriktor o délce 7 cm

Pos4 A, B paralelní vzorky



Obr. 1 / Fig. 1 Porovnání výtěžností těkavých látek v závislosti na zvoleném záchytném rozpouštědle / Comparison of the yields of volatile compounds in relation to the particular capturing solvent

chment with the determined analyte.

The samples were labelled by codes in the format Pos1, Pos2, Pos3, and Pos4 where

Pos1 P = non-enriched sample

S = enriched sample

Pos2 I = CO₂ restrictor with length of 85 cm

II = CO₂ restrictor with length of 170 cm

Pos3 1 = aqueous restrictor with length of 27 cm

2 = aqueous restrictor with length of 17 cm

3 = aqueous restrictor with length of 12 cm

4 = aqueous restrictor with length of 8 cm

5 = aqueous restrictor with length of 7 cm

Pos4 A, B parallel samples

Tab. 2 Zvolené varianty podmínek SFE / Tested combinations of the SFE conditions

Vzorek / Sample	Průtok CO ₂ / CO ₂ flow (ml/min)	Průtok vzorku / Sample flow (ml/min)	Vzorek / Sample	Průtok CO ₂ / CO ₂ flow (ml/min)	Průtok vzorku / Sample flow (ml/min)
PI1A resp. B	3,7	0,5	PII1A resp. B	2,0	0,5
PI2A resp. B	4,2	0,9	PII2A resp. B	2,2	0,9
PI3A resp. B	4,2	1,3	PII3A resp. B	2,2	1,3
PI4A resp. B	3,9	1,7	PII4A resp. B	2,2	1,7
PI5A resp. B	3,5	2,1	PII5A resp. B	1,7	2,1
SI1A resp. B	3,7	0,5	SII1A resp. B	2,0	0,5
SI2A resp. B	4,2	0,9	SII2A resp. B	2,2	0,9
SI3A resp. B	4,2	1,3	SII3A resp. B	2,2	1,3
SI4A resp. B	3,9	1,7	SII4A resp. B	2,2	1,7
SI5A resp. B	3,5	2,1	SII5A resp. B	1,7	2,1

Pro každý vzorek byla vypočtena výtěžnost přidavku jednotlivých analytů odečtením obsahu jednotlivých analytů stanovených v neobohaceném a obohaceném vzorku piva. Pro lepší přehlednost jsou výsledky prezentovány ve formě grafu (obr. 2, 3).

Získané výsledky nepotvrdily v protiproudém uspořádání rozhodující vliv délky použitých restriktorů na docílenou výtěžnost.

Porovnání výtěžností dosažených pomocí SFE a zrychlené destilace s vodní párou – těkavé látky

Vzájemné porovnání výtěžností bylo provedeno na čtyřech totožných vzorcích pív obohacených přidavkem těkavých látek (viz tab. 1). Výtěžnost byla vypočítána jako průměr ze čtyř měření.

Výsledky jsou shrnuty na obr. 4.

Bylo potvrzeno, že metoda SFE poskytovala, až na jednu výjimku, lepší výtěžnost ve srovnání s metodou zrychlené destilace s vodní párou.

Porovnání opakovatelnosti obou metod – těkavé látky

Opakovatelnost obou metod byla stanovena výpočtem ze čtyř prů-

For each sample, the enrichment yield of the individual analytes was calculated by subtracting the amount of the individual analytes determined in a non-enriched and an enriched beer sample. The results are presented in a graph for better lucidity (Fig. 2, 3).

The results did not confirm a significant influence of the restrictor length on the achieved yield in a countercurrent set-up.

Comparison of the yields achieved with SFE and with shortened steam distillation – volatile compounds

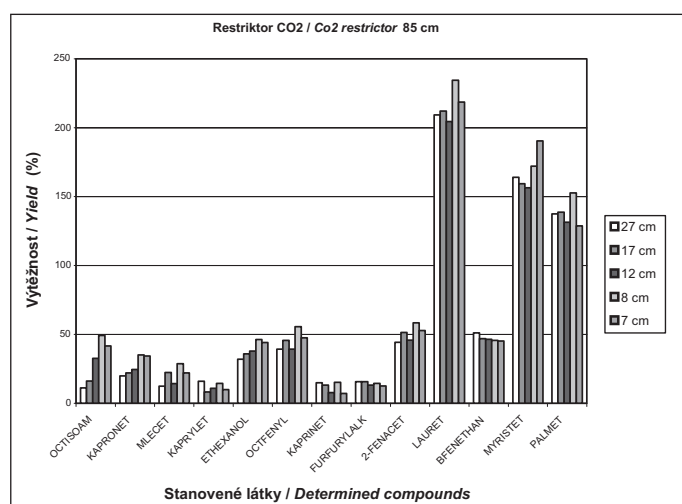
A reciprocal comparison of the yields was done on four identical beer samples enriched with volatile compounds (see Tab. 1). The yield was calculated as the average of the four results.

The results are summarized on Fig. 4.

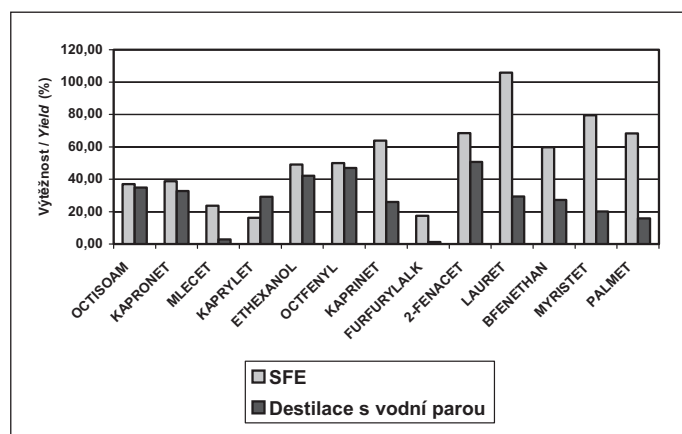
It was confirmed that SFE provided a better yield in comparison with the shortened steam distillation, apart from one exception.

Comparison of repeatability of both methods – volatile compounds

The repeatability of both methods was determined by a calculation



Obr. 2 / Fig. 2 Porovnání výtěžností SFE u krátkého CO₂ restriktoru – těkavé látky / Comparison of yields of SFE with a short CO₂ restrictor – volatile compounds



Obr. 4 / Fig. 4 Porovnání výtěžností dosažených pomocí SFE a zrychlené destilace s vodní parou / Comparison of the yields achieved with SFE and with shortened steam distillation

měrných hodnot získaných na čtyřech totožných vzorcích neobohacených piv (každý extrakt byl měřen dvakrát). Výsledky jsou shrnuty na obr. 5.

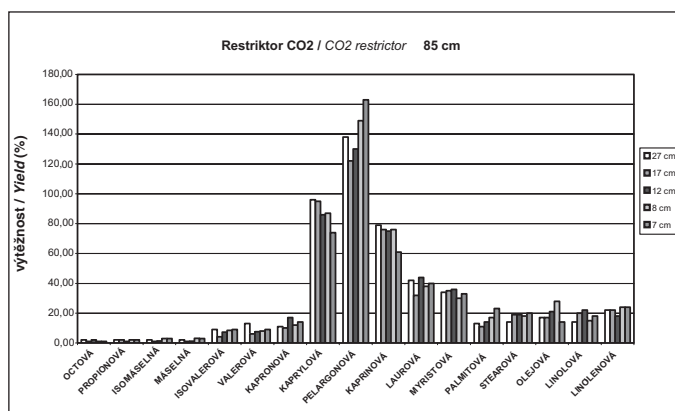
S ohledem na prezentované výsledky lze konstatovat, že SFE poskytovala ve srovnání s destilační metodou poněkud lepší výsledky, i když poměrně značně kolísající. Kolísání lze přičíst i na vrub problémům s detekcí minoritních píků, neboť detekci pomocí FID nelze ve srovnání s detekcí pomocí hmotnostního detektoru MSD považovat, s ohledem na současné požadavky v oblasti stopové analýzy, za optimální. Výsledky byly v tomto případě zřejmě zatíženy vyšší chybou, způsobenou možnou interferencí koeluuujících píků.

Optimalizace extrakčních podmínek SFE – mastné kyseliny

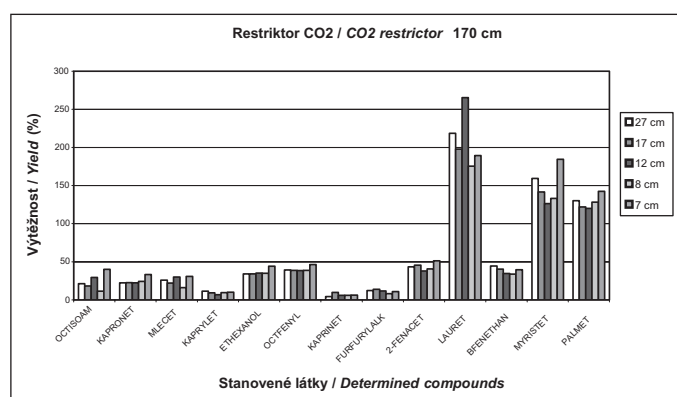
Záchyt byl proveden do stejného rozpouštědla jako v případě těkavých látek, tj. do n-hexanu. Optimalizace metody byla provedena po obohacení vzorků piv přídatkem jednotlivých analytů tak, jak je uvedeno v tab. 3.

Jak již bylo zmíněno, účinnost SFE závisí kromě tlaku a teploty i na dosažených průtocích kolonou, které lze regulovat vhodnou volbou délky vodního a CO₂ restriktoru.

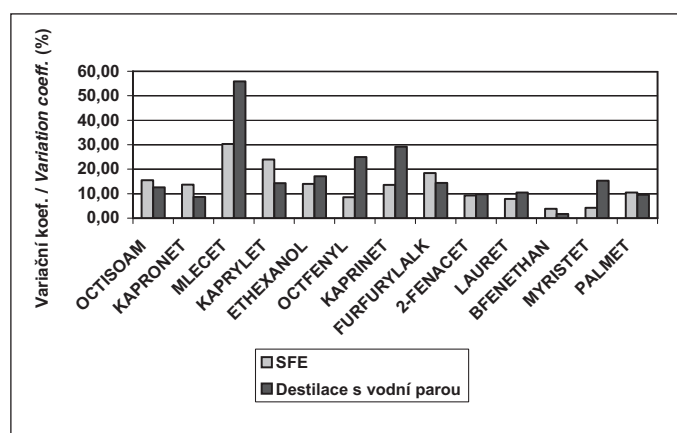
Podmínky optimalizace a označení vzorků byly totožné s podmínkami uvedenými v tab. 2. Pro



Obr. 6 / Fig. 6 Porovnání výtěžností SFE u krátkého CO₂ restriktoru – mastné kyseliny / Comparison of yields of SFE with a short CO₂ restrictor – fatty acids



Obr. 3 / Fig. 3 Porovnání výtěžností SFE u dlouhého CO₂ restriktoru / Comparison of yields of SFE with a long CO₂ restrictor



Obr. 5 / Fig. 5 Porovnání opakovatelnosti SFE a zrychlené destilace s vodní parou / Comparison of repeatability of SFE and shortened steam distillation

of four average values received from four identical samples of non-enriched beers (each extract was measured twice). The results are summarized on Fig. 5.

In regard to the presented results, it can be claimed that SFE in comparison with shortened steam distillation provided rather better results, although quite inconsistent. The inconsistency can be partially attributed to the problems with the detection of minor peaks, because detection by FID, when compared to detection by mass detector (MSD), cannot be considered optimal with the current accuracy demands in the trace amount analysis. In this case, the results were probably affected by a greater inaccuracy, caused by the possible interference of co-eluting peaks.

The optimization of extraction conditions of SFE – fatty acids

The capturing was done into a similar solvent as with the volatile compounds, that is n-hexane. The method optimization was done after the enrichment of the beer samples with individual analytes as described in Tab. 3.

As was mentioned earlier, apart from the pressure and the temperature, the efficiency of SFE also depends on the achieved flows through the column, which can be regulated by the appropriate choice of length of the aqueous and CO₂ restrictors.

Tab. 3 Množství těkavých látek (kyselin) použitých k obohacení vzorku / Amount of volatile compounds (acids) used for the sample enrichment

Vložená kyselina / Acid added	Označení v grafu / Graph label	Množství / Amount (mg/l)
octová (ethanová) / acetic	OCTOVÁ	0,8
propionová (propanová) / propanoic	PROPIONOVÁ	0,8
isomáselná (2-methylpropanová) / 2-methyl propanoic	ISOMÁSELNÁ	0,8
máselná (butanová) / butanoic	MÁSELNÁ	0,8
isovalerová (3-methylbutanová) / isovaleric	ISOVALEROVÁ	20
valerová (pentanová) / valeric	VALEROVÁ	0,8
kapronová (hexanová) / capronic	KAPRONOVÁ	20
kaprylová (oktanová) / caprylic	KAPRYLOVÁ	20
pelargonová (nonanová) / pelargonic	PELARGONOVÁ	0,8
kaprinová (dekanová) / capric	KAPRINOVÁ	20
laurová (dodekanová) / lauric	LAUROVÁ	0,8
myristová (tetradekanová) / myristic	MYRISTOVÁ	0,8
palmitová (hexadekanová) / palmic	PALMITOVÁ	0,8
stearová (oktadekanová) / stearic	STEAROVÁ	0,8
olejová (cis-9-oktadecenová) / oleic	OLEJOVÁ	0,8
linolová (oktadecendienová) / linolic	LINOLOVÁ	0,8
linolenová (oktadecentrienová) / linoleic	LINOLENOVÁ	0,8

každý vzorek byla vypočtena výtěžnost přidavku jednotlivých analytů odečtením obsahu jednotlivých analytů stanovených v neobohaceném a obohaceném vzorku piva (obr. 6, 7). Ani v případě mastných kyselin nepotvrdily získané výsledky v protiproudém uspořádání rozhodující vliv délky použitých restriktorů na docílenou výtěžnost.

Porovnání výtěžností mastných kyselin dosažených metodou SFE a SPE

Vzájemné porovnání výtěžností bylo provedeno na čtyřech totožných vzorcích piv obohacených přidavkem mastných kyselin (viz tab. 3). Výtěžnost byla vypočítána jako průměr ze čtyř měření. Výsledky jsou shrnuty v grafu na obr. 8.

Dosažená výtěžnost mastných kyselin byla u SFE ve srovnání s SPE nižší a lze ji považovat, s několika výjimkami, za neuspokojivou. Velmi nízké výtěžnosti u nižších mastných kyselin byly zřejmě způsobeny jejich opětovným vytrpíváním proudem CO₂ ze záchytného roztoku.

Z důvodu neuspokojivých dosažených hodnot výtěžnosti nebylo proto v tomto případě provedeno porovnání opakovatelnosti obou metod. K tomuto kroku bude přikročeno až po dokonalé optimalizaci extrakčních podmínek.

Pro lepší pochopení dělicích mechanismů a usnadnění výběru vhodného záchytného rozpouštědla bude potřebné v budoucnu provést extrakci v souproutém uspořádání, které nám umožní stanovit rozdělovací koeficienty jednotlivých analytů pro daný systém.

3 ZÁVĚR

Získané výsledky potvrdily předpoklad, že se v případě SFE kapalin jedná o perspektivní metodu, která by mohla v budoucnu v oblasti pivovarské analytiky nahradit stávající konvenční metody, tj. kla-

Conditions of the optimization and sample labelling were identical as the ones in Tab. 2. For each sample, the enrichment yield of the individual analytes was calculated by subtracting the amount of the individual analytes determined in a non-enriched and an enriched beer sample (Fig. 6, 7). The results did not confirm a significant influence of the restrictor length on the achieved yield in a countercurrent set-up in the case of fatty acids either.

Comparison of yields of fatty acids achieved by SFE and SPE

A reciprocal comparison of the yields was done on four identical beer samples enriched with fatty acids (see Tab. 3). The yield was calculated as the average of the four measurements. The results are summarized on Fig. 8.

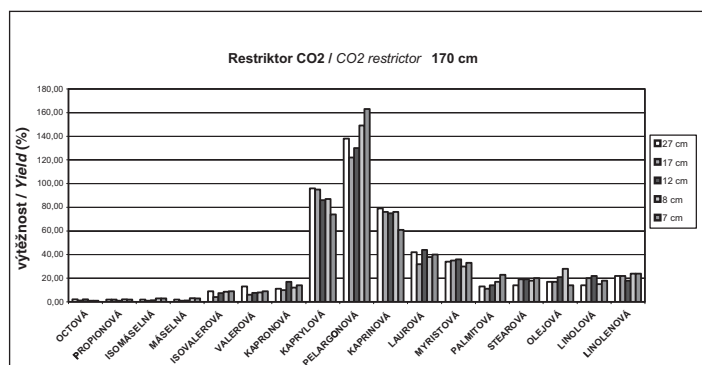
The achieved yield of fatty acids was lower in SFE than in SPE and it can be considered, with a few exceptions, unsatisfactory. The repeated stripping of lower fatty acids from the capturing solvent by a flow of CO₂ was probably to cause of their very low yields.

Comparison of the repeatability of both methods was not made in this case due to the unsatisfactory yield values achieved. This step will be taken after the proficient optimization of the extraction conditions.

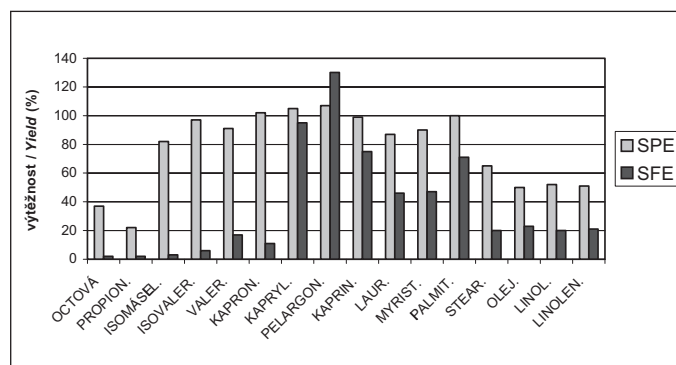
In the future, it will be necessary to perform an extraction in a concurrent set-up to better understand separating mechanisms and to selecting the suitable capturing solvent more easily. This will enable us to determine the separating co-efficients of individual analytes for a given system.

3 CONCLUSION

The achieved results confirmed that SFE of fluid samples is a prospective method, which, in the future, could replace the current con-



Obr. 7 / Fig. 7 Porovnání výtěžností SFE u dlouhého CO₂ restriktoru – mastné kyseliny / Comparison of yields of SFE with a long CO₂ restrictor – fatty acids



Obr. 8 / Fig. 8 Porovnání dosažených výtěžností mastných kyselin při použití SFE a extrakce na pevné fázi (SPE) / Comparison of the yields of fatty acids achieved with SFE and solid-phase extraction (SPE)

sickou extrakci v systému kapalina-kapalina nebo destilaci s vodní párou.

Výsledkem optimalizace pracovních podmínek SFE bylo zjištění, že výtěžnost extrakce je spíše než průtokem CO₂ a vzorku ovlivňována zejména fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu, a to zejména jeho příslušným rozdělovacím koeficientem pro daný systém. Překvapivým zjištěním však byly i značné rozdíly ve výtěžnosti příbuzných látek (estery, alkoholy). Vhodnější se v porovnání s ethanolem ukázala volba n-hexanu jako záchytného činidla. Volba tohoto typu rozpouštědla se v případě extrakce mastných kyselin nejevila jako zcela optimální, avšak z časových i finančních důvodů nebylo možné v rámci řešení tohoto úkolu dále detailně studovat tuto oblast a nalézt pro tyto látky jiné, vhodnější záchytné činidlo. Pro upřesnění je zde nutno zdůraznit, že jsme byli u SFE omezeni při volbě více-složkových záchytných rozpouštědel jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, neboť například při rozdílných bodech varu docházelo v průběhu extrakce ke změně složení záchytného rozpouštědla v důsledku vystripování jedné jeho složky proudem CO₂.

Ze získaných výsledků je dále zřejmé, že se předpoklad o tom, že protiproudé uspořádání aparatury přinese z důvodu získání většího množství teoretických pater lepší výsledky, s ohledem na rozdílné chování jednotlivých stanovených analytů, nesplnil. Proto bude nutné v budoucnu provést zkoušky i v souproudém uspořádání, které nám umožní stanovit rozdělovací koeficienty jednotlivých látek a na základě získaných dat případně upravit i extrakční podmínky.

Zatímco v případě stanovení těkavých látek přinesla nová extrakční metoda nadějně výsledky, v případě mastných kyselin lze získané výsledky, porovnáme-li je například s výsledky dosaženými metodou mikroextrakce na pevné fázi (SPME) [5], zatím považovat za určité zklamání. Nízké výtěžnosti analytů s nižší molekulární hmotností (to platí i pro těkavé látky) byly zřejmě způsobeny jejich možným následným vystripováním ze záchytného rozpouštědla, a proto bude nutné tuto oblast ještě detailně prostudovat.

Zkušenosti získané s chováním matrice při SFE a prezentované výsledky naopak naznačují, že by tato metoda mohla být vhodná i pro stanovení méně těkavých, nepolárních látek. Zejména se jedná o látky kontaminující, např. polychlorované bifenylly (PCB) a polyaromatické uhlovodíky (PAH). U běžných moderních extrakčních postupů se v případě, kdy jsou tyto látky stanoveny v pivu, často setkáváme – s ohledem na komplexnost této matrice – s problémem spočívajícím v tvorbě stabilních emulzí a zanášení lože sorbentu při extrakci na pevné fázi (SPE), což vede k dramatickému snížení výtěžnosti. Tento jev zřejmě působí přítomné β -glukany a některé koloidní látky obsažené v pivu. Nasazení SFE kapalin by mohlo tento problém vyřešit.

Zvýšená extrakční schopnost nové metody však s sebou paradoxně přinesla ještě jeden problém. Je jím správná identifikace piků jednotlivých analytů v případě velkého množství přítomných interferujících látek v chromatogramu. Toto je způsobeno výše zmíněnou vlastností SFE kapalin, tj. její nespecifičností a vydatností. Použití kvalitního přístrojového vybavení odpovídajícího současným nárokům v oblasti analytické chemie, jakým je kvalitní hmotnostní spektrometr, však tento problém dokonale řeší.

Závěrem lze konstatovat, že je možné SFE kapalin považovat i přes určité dílčí problémy za perspektivní metodu, která by mohla po zdokonalení najít uplatnění v oblasti stopové analýzy piva. Jedná se o šetrnou a ekologickou metodu, nezatěžující zkoumanou matrici a pracující s omezeným množstvím organických rozpouštědel, což plně odpovídá moderním trendům analytické chemie a požadavkům na ochranu životního prostředí.

Tato práce je součástí řešení Výzkumného záměru VÚPS, a. s. č. MSM 6019369701.

Redakce se omlouvá paní Eleně Varadové-Ostré za chybné uvedení jména v první části článku.

Literatura / Literature

1. Kellner, V. et al.: Charakterizace rozdílů senzorických profilů mezi skupinami tuzemských a zahraničních piv. Závěrečná zpráva výzkumného úkolu VÚ 1.1/1999, VÚPS, Praha, 2000.
2. Kellner, V. et al.: Vliv mastných kyselin na senzoriku českého piva. Etapa I. a – Vliv suroviny a technologického postupu na tvorbu mastných kyselin ve vztahu k senzorickému profilu piva. Závěrečná zpráva VÚ 1.1/2000, VÚPS, Praha, 2001.
3. Kellner, V. et al.: Charakterizace rozdílů senzorických profilů mezi skupinami tuzemských a zahraničních piv. Závěrečná zpráva VÚ 1/2001, VÚPS, Praha, 2001.

ventional methods in the field of brewing analytics, those being liquid-liquid extraction or steam distillation.

The outcome of the optimization of the conditions of SFE was the conclusion that the extraction yield depends rather on the physical-chemical characteristics of the analyte, particularly its corresponding separating co-efficient for a given system, than the flow of CO₂ and sample. Though a surprising finding were the significant differences in the yields of similar substances (esters, alcohols). N-hexane proved to be the better choice of a capturing solvent over ethanol. Using this type of a solvent did not work optimally when extracting fatty acids. However, it was not possible to study this issue in further detail and find a different, more suitable solvent for these substances while working on this project due to time and financial reasons. To elaborate, it is necessary to point out that we were limited with SFE when selecting multiple compound capturing solvents by their physical chemical characteristics. For example, because with different boiling points the composition of the capturing solvent changed during the extraction as a result of stripping out one of its components by the flow of CO₂.

It is clear from the achieved results, that the hypothesis that a countercurrent set-up of the analyzer would bring better results, with regard to different behaviour of individual determined analytes, thanks to the higher amount of theoretical trays, was incorrect. That is why it will be follow up with experiments in a concurrent set-up in the future, which will enable us to determine the separating co-efficients of individual substances and possibly improve the extraction conditions based on the obtained data.

While the new method brought promising results when determining volatile compounds, the results for fatty acids, on the other hand, can be considered a disappointment if we were to compare them with the results from solid-phase micro extraction (SPME) [5]. Low analyte yields with lower molecular masses (this applies to volatile compounds as well) were probably caused by their possible consequent stripping from the capturing solvent, and therefore this area will still need to be studied in detail.

In contrast, the experience gained with the behaviour of analyte in SFE and the presented results suggest that this method may be appropriate for determining less volatile, non-polar compounds. Those would be particularly contaminating substances, for example, PCB and PAH. When these substances are extracted from beer using common modern extraction methods, a problem originating from the formation of stable emulsions, thus clogging of the sorbent matrix arises during extraction by SPE with regard to the complexity of this analyte, which leads to a dramatic decrease in the yield. The present beta-glucans and some colloidal substances contained in beer probably cause this effect. Implementation of SFE might solve this problem.

However, the increased extraction efficiency of the new method has ironically brought along a different problem. It is the right identification of peaks of individual analytes in the case of a large amount of interfering substances present in the chromatogram. This is caused by the aforementioned characteristic of SFE, that is its non-specificity and efficiency. Nevertheless, the usage of a quality analyzer, that satisfies the current demands in analytical chemistry, which is a quality mass spectrometer, completely eliminates this problem.

In conclusion, SFE of liquid samples can, despite certain problems, be considered a prospective method, which, after further perfecting it, could establish itself in the field of analysis of trace amounts of sensory active substances in beer. The method is gentle and environmentally friendly, it does not affect the analyzed material and uses a limited amount of organic solvents. Therefore, it corresponds with the modern trends in analytical chemistry and meets the demands of protecting the environment.

This work is a part of the Research Plan of the RIBM No. MSM 6019369701.

4. Čulík, J. et al.: Stanovení vyšších senzoricky aktivních alkoholů v pívě pomocí extrakce na pevné fázi a kapilární plynové chromatografie. Kvasny Prum. 45, 1999, (1) 4–7.
5. Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V.: Stanovení mastných kyselin v pívě technikou SPME. Kvasny Prum. 51, 2005, (11–12) 374–377.

*Zpracováno na základě přednášky na 32. Pivovarsko-sladařském semináři v Plzni, 13.–14. 10. 2004.
Do redakce došlo 9. 2. 2006
Překlad Ing. Marek Mikunda*