

EXTRAKCE NA MÍCHACÍ TYČINCE – NOVÁ MOŽNOST PŘI ANALÝZE NĚKTERÝCH SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V PIVU

STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION – NEW APPROACH FOR THE DETERMINATION OF SOME BEER FLAVOURS

TOMÁŠ HORÁK, JIŘÍ ČULÍK, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting PLC, Brewing Institute Prague, Lípová 15, CZ-120 44 Prague 2, Czech Republic*; e-mail: horak@beerresearch.cz

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Extrakce na míchací tyčince – nová možnost při analýze některých sensoricky aktivních látek v pivu. *Kvasny Prum.* 54, 2008, č. 4, s. 102–107.

Ke stanovení sensoricky aktivních látek v pivu se používají analytické metody, které vyžadují úpravu vzorku. K tomu se využívají techniky založené na extrakci v systému kapalina-kapalina, extrakci na pevné fázi (SPE) nebo destilační postupy. V poslední době se stávají populárními mikroextrakční metody, jako např. mikroextrakce na pevné fázi (SPME) nebo extrakce na míchací tyčince (SBSE).

Tato práce se zabývá využitím extrakce na míchací tyčince při stanovení některých sensoricky aktivních látek v pivu. Použita byla míchací tyčinka (10 mm dlouhá, o průměru 1,3 mm) pokrytá polydimethylsiloxanem od firmy Gerstel GmbH, komerčně nazývaná Twister. Twister byl vložen přímo do vzorku piva a míchán. Poté byl Twister vyjmut, opláchnut destilovanou vodou a eluován 200 µl organického rozpouštědla. Nakonec byl získaný extrakt analyzován metodou plynové chromatografie. Práce obsahuje pracovní charakteristiky optimalizované metody.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Stir Bar Sorptive Extraction – New Approach for the Determination of Some Beer Flavours. *Kvasny Prum.* 54, 2008, No. 4, p. 102–107.

For the determination of beer flavours well-established methods require sample preparation steps such as liquid/liquid extraction, solid phase extraction or distillation techniques. During the past years the microextraction procedures become popular e. g. solid phase microextraction (SPME) or stir bar sorptive extraction (SBSE).

This work presents the simple and rapid possibility of the determination of some beer flavours using stir bar sorptive extraction. A commercially available small stir bar (10 mm length, 1,3 mm OD) is coated with polydimethylsiloxane and produced by Gerstel GmbH and it is known as Twister. The Twister is placed directly in the beer sample and stirred. Then the stir bar is removed, rinsed with distilled water and eluted with 200 µl of organic solvent for gas chromatographic analysis. Validated parameters of the optimised method are shown in this work.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Extraktion auf dem Rührstäbchen – eine neue Möglichkeit bei der Analyse von sensorisch aktiven Stoffen im Bier. *Kvasny Prum.* 54, 2008, Nr. 4, S. 102–107.

Zur Bestimmung von sensorisch aktiven Stoffen im Bier werden eine analytische Methoden angewandt, die eine Musteranpassung bedürfen. Zur Musteranpassung werden verschiedene Technik angewandt: die Extraktion im System Flüssigkeit-Flüssigkeit, Festphasenextraktion (SPE) oder ein Destillationsverfahren. In der letzten Zeit sind Mikroextraktionsverfahren, z. B. Mikroextraktionsverfahren auf der festen Phase (SPME) oder Extraktion auf dem Rührstäbchen (SBSE) beliebt geworden.

Im diesen Artikel wird die Extraktion auf dem Rührstäbchen bei der Feststellung von sensorisch aktiven Stoffen im Bier beschrieben. Es wurde ein Rührstäbchen (10 mm lang, Durchmesser 1,3 mm), bedeckt von Polydimethylsiloxan von der Firma Gerstel GmbH, kommerziell genannt „Twister“ angewandt. Twister wurde ins Bier getaucht und gerührt. Danach wurde Twister aus dem Bier ausgehoben, mit destilliertem Wasser gespült und eluiert mit 200 µl organischer Lösung. Der gewonnene Extrakt wurde schließlich durch die Methode der Gaschromatographie analysiert. Der Artikel enthält eine Arbeitscharakteristiken der optimierten Methode.

Горак, Т. – Чулик, Й. – Юркова, М. – Чейка, П. – Келлнер, В.: Экстракция на смесительном стержне – новая возможность при анализе некоторых сенсорически активных веществ в пиве. *Kvasny Prum.* 54, 2008, No. 4, стр. 102–107.

Для определения сенсорически активных веществ в пиве используются аналитические метода, предусматривающие подготовку пробы. К этому используются техники основанные на экстракции в системе жидкость-жидкость, экстракции на твёрдой фазе (SPE) или дистилляционные метода. В последнее время происходят известными микроэкстракции – онные метода, напр. микроэкстракция на твёрдой фазе (SPME) или экстракция на смесительном стержне (SBSE). Статья занимается использованием SBSE для определения некоторых сенсорически активныи веществ в пиве. Использовался смесительный стержень (10 мм длиной, диаметра 1,3 мм) покрытый полидиметилсилоксаном Twister от фирмы Gerstel GmbH. Twister вставлен в пробу и после смешивания выбран, ополоснут перегонной водой и элюирован 200 µl органического растворителя. Полученный экстракт анализировался газовой хроматографией. Статья содержит рабочие характеристики оптимизированного метода.

Klíčová slova: pivo, sensoricky aktivní látky, extrakce na míchací tyčince (SBSE)

Keywords: beer, beer flavours, stir bar sorptive extraction (SBSE)

1 ÚVOD

Je známo, že pivo obsahuje velké množství sensoricky aktivních látek. Jde o těkavé i netěkavé látky (bylo jich identifikováno přes 800), jejichž koncentrace ale nic neříká o významu této sloučeniny ve vztahu k sensorickým vlastnostem finálního výrobku. Teprve porovnání její koncentrace s koncentrací prahovou může dát požadovanou informaci [1]. Překročení prahové hodnoty jedné nebo více látek běžně se vyskytujících pod prahovou hodnotou se může projevit jako sensorická závada. Ale i příliš nízká koncentrace některé ze základních chuťových složek nebo i úplná absence této látky může negativně ovlivňovat výslednou chuť a vůni piva [2]. Je pochopitelné, že celkový sensorický profil piva se kromě ceny a obalu rozhodujícím způsobem podílí

1 INTRODUCTION

Beer consists from a lot of volatile and also non-volatile compounds (more than 800 were identified yet) which impact beer flavour. Meilgaard discussed the influence of chemical composition on the flavour of beer. The comparison of the concentration of compound and it's threshold concentration can give an answer about it's exert influence up beer flavour [1]. Overloading threshold concentration of one or more compounds usually occurring under threshold level can cause sensory defect. On the other hand a very low concentration of some basic flavour or it's total absence can also negatively impact beer flavour [2]. Beer flavour as combination of odour and taste is a very important factor in a product quality image. The total sensory profile of beer has the main role, of price and wrapping, in the success of this

na úspěchu piva na trhu. Důležitá je také stálost tohoto profilu, kdy zákazník nesmí být zklamán koupí téhož výrobku po určité době.

Z těchto důvodů se věnuje pozornost analytickému stanovení obsahu některých významných skupin senzorycky aktivních látek. Jednou z nich jsou estery, jejichž převážná část se tvoří při hlavním kvašení a většinou se vyznačují příjemnou vůní připomínající některé druhy ovoce. Podle Arkima a Jounela-Erikssona se estery podílejí na celkovém arómatu piva asi jednou pětinou [3].

K analytickému stanovení senzorycky aktivních látek se používají hlavně metody plynové chromatografie. K přípravě vzorku se využívají klasické postupy jako headspace technika, prekoncentrační metody purge-and-trap, destilační postupy, extrakce v systému kapalina-kapalina nebo extrakce na pevné fázi [4–9].

Vhodnou alternativou ke klasické headspace technice výrazným způsobem snižující pořizovací náklady je mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Koncept této techniky byl navržen v první polovině devadesátých let Januszem Pawliszynem na University of Waterloo (Ontario, Kanada). Jde o sorpčně-desorpční techniku. Její princip spočívá v nanesení malého množství sorbentu na vlákno z křemenného skla. Vlákno se ponoří do vzorku nebo do plynné fáze nad vzorkem. Po ustanovení rovnováhy se vlákno vytáhne ze vzorkované matrice a vloží se do nástřikového prostoru plynové chromatografu. Látky zachycené na sorbentu tepelně desorbují a jsou unášeny nosným plynem na kolonu chromatografu, kde dochází k jejich separaci. Při průchodu septu vzorkovnice a chromatografu se vlákno zatáhne do jehly, která je chrání proti mechanickému poškození. Při vzorkování a chromatografické analýze je vlákno z jehly vysunuto. Jde o rychlou, jednoduchou metodu nevyžadující jakéhokoliv použití rozpouštědla [10, 11, 12].

V pivu byly SPME metodou stanoveny některé alkoholy, estery, dimethylsulfid, vicinální diketony, mastné kyseliny nebo karbonylové látky [13, 14, 15, 16, 17, 18].

Dalším rozvojem mikroextrakčních metod využívajících jako extrakční médium polydimethylsiloxanovou fázi se zabýval Baltussen a kol. [19]. Na základě tohoto výzkumu představil novou extrakční techniku – extrakci na míchací tyčince (SBSE z anglického stir bar sorptive extraction). Tato technika je založena na stejných principech jako mikroextrakce na pevné fázi, ale tím, že je použito podstatně větší množství polydimethylsiloxanové fáze (50–300 μ l), dochází k výrazně většímu obohacení organických sloučenin z extrahované matrice a v důsledku toho vzrůstá citlivost 100 až 1000krát.

V praxi je tedy magnetická tyčinka zatavena do skla, sklo je deaktivováno a pokryto polydimethylsiloxanovou fází. Výrobu si vzala pod svá křídla firma Gerstel, a prodává je pod názvem Twister. K dispozici jsou různé druhy Twisterů – délka 10 mm s tloušťkou fáze 0,5 mm nebo 1,0 mm, dále v délce 40 mm opět s tloušťkou fáze buď 0,5 mm nebo 1,0 mm. Ve všech případech je vnější průměr míchací tyčinky 3,2 mm. Twister o délce 10 mm se obvykle používá pro extrakci z objemu 1–50 ml, o délce 40 mm pro extrakci z objemů 100–250 ml [20].

Extrakce probíhá velmi jednoduše. Twister se vloží přímo do vzorku a nechá se míchat po dobu 30–120 min. Během této doby dochází k rozdělení analytů mezi matricí a polydimethylsiloxanovou fází Twisteru podle jejich rozdělovacích koeficientů. Potom je Twister vložen do termálního desorbéru, kde dojde k termální desorpci analytů (obvykle při teplotě 150–300 °C) a ty jsou pak bezprostředně separovány na plynovém chromatografu [20].

Pro stanovení velmi těkavých látek je možné využít headspace sorpční extrakci (HSSE). Tato technika, při které dochází k zakoncentrování analytů, je mnohem citlivější než klasická headspace metoda. Twister se vloží do speciálního držáčku a vše se umístí do uzavřené headspace vialky. Twister se tak nachází v parním prostoru nad vzorkem a analyty jsou extrahovány a zakoncentrovány v polydimethylsiloxanové fázi Twisteru [21].

V pivovarské analytice bylo techniky SBSE použito pro stanovení letinkové neboli sluneční příchutě (3-methyl-2-buten-1-thiol) a dalších sirných látek [22], hořkých kyselin v pivu metodou HPLC [23], karbonylových sloučenin [24].

Cílem této práce bylo vyzkoušet extrakci některých senzorycky aktivních látek z piva pomocí techniky extrakce na míchací tyčince. Po extrakci byly látky následovně zpětně extrahovány z polydimethylsiloxanové fáze do organického rozpouštědla a analyzovány na plynovém chromatografu s plamenioionizačním detektorem.

product on the market. The stability of this profile is also important because customers may not be frustrated by purchase of the same product after long time period.

So the attention is focused to analytical determination of some important flavour groups. Esters are one of these groups. Pleasant fruit flavour is often typical for the most esters. During the brewing process the ester production is influenced mainly by the wort composition, fermentation parameters and yeast strains. Arkima and Jounela-Eriksson has shown that ester's contribution to total beer bouquet is about one fifth [3].

Gas chromatography methods are often used for the determination of beer flavour compounds. Well-established methods require sample preparation steps such as static headspace methods, purge-and-trap pre-concentration techniques, distillation procedures, liquid-liquid extraction or solid phase extraction [4–9].

During the past years, miniaturisation has become a dominant trend in analytical chemistry. Solid phase microextraction (SPME) is one of the typical examples of miniaturisation in sample preparation techniques. This method, an adsorption-desorption technique, was developed by Arthur and Pawliszyn (University of Waterloo, Ontario, Canada) and this procedure can be used instead of the classical sample preparation methods. SPME simply involves immersing a phase-coated fused silica fiber into the liquid sample or the headspace above the sample, to adsorb the analytes of interest. The adsorbed analytes are thermally desorbed in the heated injection port of the gas chromatograph and transferred to the capillary column for the separation. SPME is fast, simple and solventless alternative sampling technique [10, 11, 12].

Some flavour groups e. g. alcohols, esters, dimethylsulfide, vicinal diketones, fatty acids or carbonyl compounds were determined in beer by using SPME [13, 14, 15, 16, 17, 18].

Another development of microextraction sample preparation methods based on polydimethylsiloxane phase as extraction medium was shown by Baltussen et al. and a new extraction technique known as stir bar sorptive extraction (SBSE) was introduced [19]. The extraction mechanism and advantages are similar to those of SPME, and because much more polydimethylsiloxane phase is used (50–300 μ l) consequently the enrichment factor is higher and sensitivity is increased by a factor of 100 to 1000.

In practise magnetic stirring rods are incorporated in a glass jackets and coated with a layer of polydimethylsiloxane phase. These coated stir bars are commercially known as Twister and they are produced by Gerstel GmbH. Several different types of Twisters are available – 10 mm length with 0.5 mm respectively 1.0 mm phase thickness or 40 mm length also with 0.5 mm respectively 1.0 mm phase thickness. In all cases o.d. of stir bar are 3.2 mm. Typically the 10 mm stir bars are used for 1–50 ml sample volumes and the 40 mm stir bars are used for 100–250 ml sample volumes [20].

The extraction procedure is very simple. Twister is placed into the sample in vial and stirred. During this period analytes are partitioned between the polydimethylsiloxane phase and the aqueous matrix. After extraction the Twister is introduced into a thermal desorption unit. The analytes are desorbed thermally and immediately separated on capillary column of gas chromatograph [20].

Headspace sorptive extraction (HSSE) can be used for the determination of volatile compounds. HSSE is a concentration technique that is much more sensitive than traditional static headspace analysis. A Twister is placed in an open adapter inside a closed headspace vial. The Twister is placed in the vapor phase above the sample such that analytes are extracted by, and concentrated into, the polydimethylsiloxane phase of the Twister [21].

SBSE methods in beer analyses has been applied for the determination of sunstruck flavour (3-methyl-2-butene-1-thiol) and another sulphur compounds [22], the bitter acids using HPLC analysis [23], stale-flavor carbonyl compounds [24].

The aim of this work was to optimise SBSE for the determination of the some esters in beer. Due to a great efficiency of SBSE solvent back extraction of compounds sorptived in Twister was used instead thermal desorption. Then an aliquot of this extract was injected into the gas chromatograph with flame ionisation detector.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Materials, standards

Analytical reagent grade ethanol (Lach-Ner, Czech Republic), methanol, hexane, dichloromethane (Merck, Germany), helium 5.0 quality, hydrogen 5.0 quality, synthetic air (Messer, Czech Republic), pu-

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie, standardy

Ethanol – Lach-Ner, s. r. o., ČR; methanol, hexan, dichlormethan – Merck, Německo; helium v kvalitě 5.0, vodík v kvalitě 5.0 a synte-

tický vzduch – Messer, ČR; ultračistá voda – Milli-RO 5plus firmy Millipore, USA.

Octan isoamylnatý, kapronan ethylnatý, kaprylan ethylnatý, octan fenylatý, kaprnan ethylnatý, octan fenylethylnatý, lauran ethylnatý, myristan ethylnatý, palmitan ethylnatý – Sigma-Aldrich, USA.

2.2 Materiál a přístroje

Twister o délce 10 mm, vnějším průměru 3,2 mm a tloušťce polydimethylsiloxanové fáze 0,5 mm – Gerstel, Německo; 20 ml headspace vialky, 2 ml šroubovací vialky, 350 μ l skleněné inserty, PTFE silikonová septa, víčka, uzavírací a otevírací kleště – CRS, USA; magnetické míchadlo – MLW RH3, Polsko; pinzeta – Chirana, ČR; plynový chromatograf CP 9001 – Chrompack, Holandsko; automatický dávkovač vzorků ASG 40 – Labio, ČR.

2.3 Příprava vzorku

Před první aplikací a každým dalším použitím byl Twister kondicionován po dobu 1 h při teplotě 300 °C v atmosféře helia při průtoku 50 ml/min. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl Twister připraven pro další extrakci.

Zakoupené vzorky piv byly přechovávány v chladničce při teplotě 4 °C až do doby analýzy. Všechny pokusy vedoucí k optimalizaci podmínek stanovení a pro proměření kalibračních křivek byly prováděny na modelovém roztoku 5% obj. ethanolu ve vodě.

Do 20 ml headspace vialky bylo napipetováno 10 ml vzorku a do vzorku byl vložen Twister. Vialka byla uzavřena septem krytým hliníkovou folií a umístěna na magnetické míchadlo, kde byl vzorek míchán při 1200 min⁻¹ za laboratorní teploty. Po skončení extrakce byl Twister opatrně pinzetou vyndán, krátce opláchnut redestilovanou vodou a osušen. Pro zpětnou extrakci analytů z polydimethylsiloxanové fáze byl Twister vložen do 350 μ l skleněného insertu s 200 μ l organického rozpouštědla. Tento insert byl umístěn do šroubovací vialky o objemu 2 ml a na magnetickém míchadle míchán při 1200 min⁻¹. Po skončení extrakce z Twisteru byly 2 μ l eluátu nastříknuty na kapilární kolonu plynového chromatografu.

2.4 Podmínky plynové chromatografie

Vlastní stanovení probíhalo na plynovém chromatografu Chrompack CP 9001, který byl opatřen automatickým dávkovačem vzorků Labio ASG 40. K separaci analytů byla použita 30 m dlouhá křemenná kapilární kolona ZB-WAX firmy Phenomenex s vnitřním průměrem 0,32 mm a tloušťkou filmu 0,25 μ m. Kolona byla temperovaná na teplotu 80 °C po dobu 1 min, poté následoval teplotní gradient 8 °C/min do teploty 240 °C. Při této teplotě kolona zůstala po dobu 3 min. K nástřiku byl použit split/splitless injektor v režimu splitless. Split ventil byl otevřen po uplynutí 0,25 min. Injektor byl vyhříván na teplotu 260 °C, plamenoionizační detektor na teplotu 270 °C. Jako nosný plyn bylo využito helium v kvalitě 5.0, tlak na kolonu byl 150 kPa při teplotě 80 °C.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Optimalizace metody

Nejprve byl zkoumán vliv různých rozpouštědel na desorpci analytů z polydimethylsiloxanové fáze Twisteru. Byla odzkoušena tři různá rozpouštědla dichlormethan, směs dichlormethan:methanol v poměru 90:10 a dichlormethan:hexan v poměru 50:50. Jak vyplývá z obr. 1, součet ploch píků chromatografického záznamu všech stanovovaných látek byl největší pro směs dichlormethan:methanol v poměru 90:10. V této směsi rozpouštědel dosahovaly velkých odezev vyjádřených v plochách píků především těkavější sloučeniny jako octan isoamylnatý, kapronan ethylnatý a kaprylan ethylnatý, a to až o 36 % více než tytéž estery v druhém nejúčinnějším rozpouštědle dichlormethan:hexan v poměru 50:50. Zato méně těkavé analyty jako myristan ethylnatý a palmitan ethylnatý vykazovaly větší odezvy v plochách píků o 10 % v rozpouštědle dichlormethan:hexan v poměru 50:50 na rozdíl od směsi dichlormethan:methanol v poměru 90:10. Vzhledem k tomu, že se tyto méně těkavé látky vysky-

řily (Milli-RO 5plus, Millipore, USA) were used. Standards of analyzed compounds (isoamyl acetate, ethyl caproate, ethyl caprylate, phenyl acetate, ethyl caprate, phenylethyl acetate, ethyl laurate, ethyl myristate, ethyl palmitate) were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

2.2 Instruments

Twister – 10 mm length, 3.2 mm o. d. and 0.5 mm thickness of polydimethylsiloxane (Gerstel, Germany); 20 ml headspace vials, 2 ml screw vials, glass inserts 350 μ l, PTFE silicon septa, caps, hand crimper and hand decapper (CRS, USA); magnetic stirrer (MLW RH3, Poland); tweezer (Chirana, Czech Republic); gas chromatograph CP 9001 (Chrompack, Holland); autosampler ASG 40 (Labio, Czech Republic).

2.3 Sample preparation

Before the first using and before any another using the Twister was reconditioned in glass tube at 300 °C with 50 ml/min helium for 1 hour. Twister was ready for another use after cooling.

Bottled beers were kept cool (4 °C) until they were analysed. 5 % V/V ethanol was used for the evaluation of the method and for the calibration curves.

Sample extraction was performed by placing 10 ml of sample amount in a 20 ml glass vial, adding polydimethylsiloxane coated stir bar. The vial was capped with aluminium coated septum and stirring at room temperature with 1200 rpm. After extraction the Twister was removed with forceps, rinsed briefly in distilled water. For back extraction the Twister was placed in to 350 μ l glass insert containing 200 μ l of organic solvent. This insert was put in 2 ml vial and stirring with 1200 rpm again. An aliquot (2 μ l) of this extract was injected into the GC column.

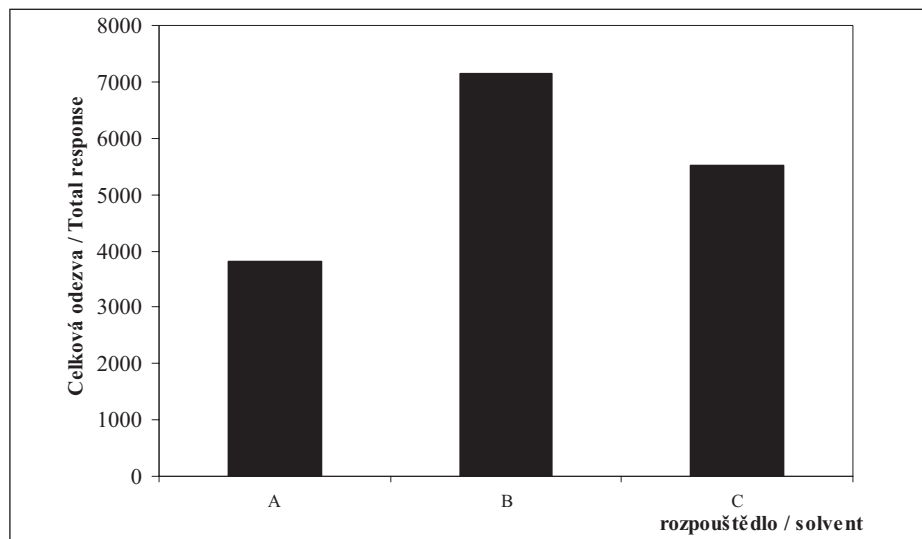
2.4 GC analysis

The GC analysis was carried out using a Chrompack CP 9001 gas chromatograph equipped with autosampler Labio ASG 40. Analytes were separated on 30 m x 0,32 mm i. d. fused silica capillary column of Phenomenex ZB-WAX with 0,25 μ m film thickness. The GC column was maintained at 80 °C for 1 min, ramped at a rate of 8 °C/min to 240 °C and then held at this temperature for 3 min. The split-splitless injector was used and the split vent was opened after 0.25 min. Temperatures of the injector and the flame ionisation detector were 260 °C, respectively 270 °C. The carrier gas was helium 5.0 quality with a column head pressure of 150 kPa at 80 °C.

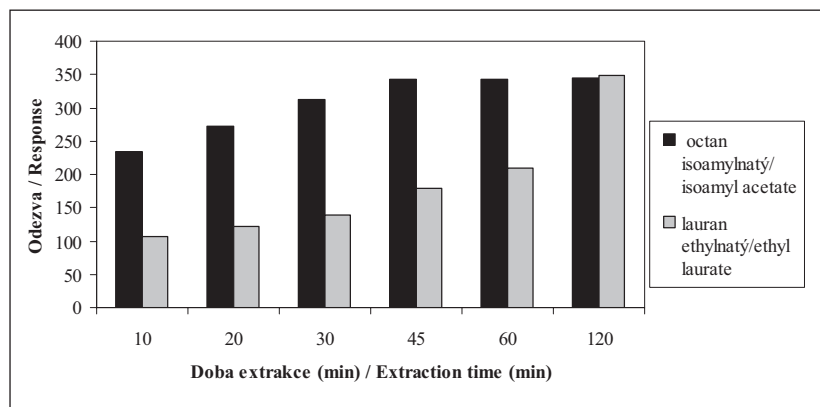
3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Development of the method

In the first experiment the effect of the solvent back extraction of the Twister stir bar on the determination of esters was examined by the different solvent solutions – dichloromethane, mixture of dichlo-



Obr. 1 / Fig. 1 Vliv různých rozpouštědel na celkovou odezvu esterů při jejich desorpci z polydimethylsiloxanové fáze Twisteru (A – dichlormethan, B – dichlormethan:methanol 90:10, C – dichlormethan:hexan 50:50) / Influence of different solvent solution used for the solvent back extraction of the Twister on the total response of the esters (A – dichloromethane, B – dichloromethane:methanol 90:10, C – dichloromethane:hexane 50:50)



Obr. 2 / Fig. 2 Závislost délky doby vzorkování na extrakci některých esterů sorbovaných na Twister / Effect of the sampling time on the responses of some esters extracted by the Twister stir bar

tují v pivu v řádově nižších koncentracích než např. octan isoamylatý, byla k dalším pokusům použita směs dichlormethan:hexan v poměru 50:50.

Dále byl zjišťován vliv doby extrakce na velikost ploch píků stanovovaných látek. Jak ukazuje obr. 2, odezva sloučenin se podle očekávání zvětšovala s prodlužující se dobou extrakce. Těžké látky, jako např. octan isoamylatý, dosáhly saturace již po 45 min extrakce, delší doba extrakce, jako např. 120 min, znamenala pro tuto sloučeninu vzrůst odezvy jen o 1 %. Naproti tomu odezva palmitanu ethylatého po 120 min extrakce se zvýšila o 42 % v porovnání s extrakcí trvající 60 min. Výše vroucí látky zřejmě pomaleji přecházejí do polydimethylsiloxanové fáze a potřebují tak delší čas k ustanovení rovnováhy. V praxi ale pro přesné stanovení není nezbytně nutné dosáhnout úplného rovnovážného stavu pro všechny stanovované sloučeniny. Na druhé straně, pokud by se extrahovalo pouze relativně krátkou dobu, nejen že by se snížila citlivost metody, ale také by se zhoršila opakovatelnost. Proto byla pro další experimenty zvolena extrakční doba 60 min.

Vliv doby, po kterou byla prováděna zpětná extrakce stanovovaných látek z polydimethylsiloxanové vrstvy Twisteru do rozpouštědla, na celkovou velikost ploch píků všech sloučenin je zřejmý z obr. 3. Zpětná extrakce látek je zřejmě úplná již po 40 min. Ve srovnání s 20 min extrakce vzrostla při 40 min extrahování odezva octanu isoamylatého o 28 %, odezva myristanu ethylatého o 47 %. Naproti tomu vzrůst plochy píků při reextrakci trvající 60 min ve srovnání s dobou 40 min představoval jen 3 % pro octan isoamylatý, pro lauran, myristan a palmitan ethylatý byla velikost ploch píků dokonce < 1 %. Proto v dalších pokusech byla prováděna zpětná extrakce po dobu 40 min.

Chromatografický záznam vzorku piva po sorpční extrakci na míchací tyčince je uveden na obr. 4. Je z něj patrná vyhovující separace všech stanovovaných látek prostá všech interferencí. Byly také provedeny analýzy extraktu z Twisteru po jeho rekondicionaci. Takto získané chromatografické záznamy nevykazovaly přítomnost žádné ze sledovaných analytů, a tak bylo potvrzeno, že výše popsany postup rekondicionace Twisteru je dostačující.

3.2 Validace metody

Pro všechny stanovované sloučeniny byly proměřeny devítibodové kalibrační křivky v rozsahu koncentrací 0,015 mg/l až 30 mg/l v 5% obj. roztoku ethanolu. Výsledky jsou uvedeny v tab. 1. Lepší shody bylo dosaženo proložením jednotlivých kalibračních bodů kvadratickou křivkou namísto lineární regrese. Korelační koeficienty při lineární regresi byly lepší než 0,9988, při kvadratické lepší než 0,9995.

Další pracovní charakteristiky metody jsou shrnuty v tab. 1. Správnost metody byla ověřena pomocí výtěžnosti. Nejprve byl změřen přirozený obsah stanovovaných esterů v pěti komerčních vzorcích pív. Poté byly tyto vzorky pív obohaceny přísadami sledova-

romethane:methanol 90:10 and mixture of dichloromethane:hexane 50:50. The results are shown in Fig. 1. The mixture of dichloromethane:methanol 90:10 produced the best result for the sum of responses of all compounds. However in comparison with dichloromethane:hexane 50:50 the responses were more intense (about 36 %) for such more volatile analytes as isoamyl acetate, ethyl caproate and ethyl caprylate but not for less volatile compounds as ethyl laurate, ethyl myristate and ethyl palmitate. For these semivolatile compounds, which are present in beer in very low concentrations, the solvent back extraction with of dichloromethane:methanol 90:10 produced more efficiency about 10 % than mixture of dichloromethane:methanol 90:10. So all another experiments were carried out using the mixture of dichloromethane:methanol 90:10.

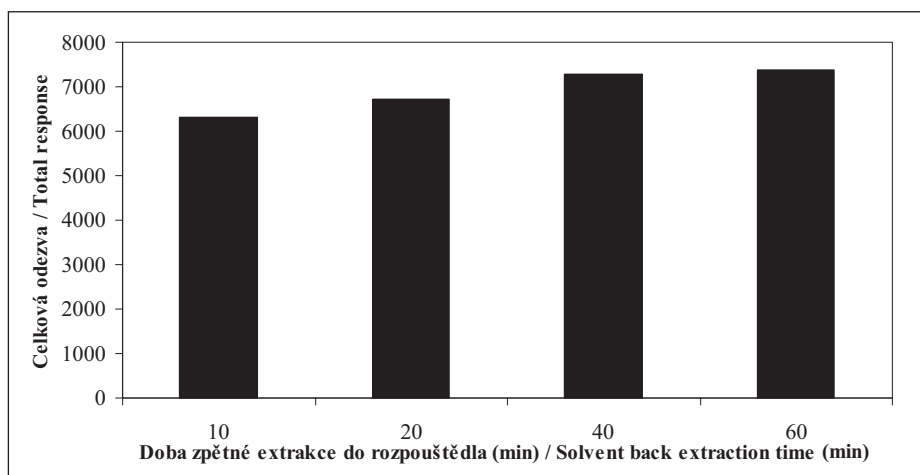
In the next experiment, the effect of the sampling time on the extraction was tested. As it is shown in Fig. 2 the responses increased up with the sampling time. Volatile flavour components as isoamyl acetate responses were saturated after 45 min. The longer sampling time e. g. 120 min increased the response of this compound only for 1 %. However in comparison with 60 min sampling time the response of ethyl palmitate was greater for 42 % after 120 min sampling time. Semivolatile compounds evidently partitioning to the polydimethylsiloxane phase more slowly and so the longer period is required for reach equilibrium. In practise, full equilibration is not necessary for an accurate determination. On the other hand a relatively short extraction time will not only result in a loss of sensitivity but also of precision. Consequently, a 60-min sampling time can be selected for time saving and precision.

Fig. 3 demonstrates the influence of different solvent back extraction times to the total responses of the compounds of interest. The solvent back extraction was completed after 40 min yet. In comparison with 20 min of reextraction the isoamyl acetate and ethyl myristate responses increased by 28 %, respectively for 47 %. However, the responses of isoamyl acetate, respectively ethyl laurate, ethyl myristate, ethyl palmitate obtained by 60 min reextraction presented increase only 3 %, respectively < 1 % in comparison with 40 min of solvent back extraction. A 40-min solvent back extraction time was selected for further experiments.

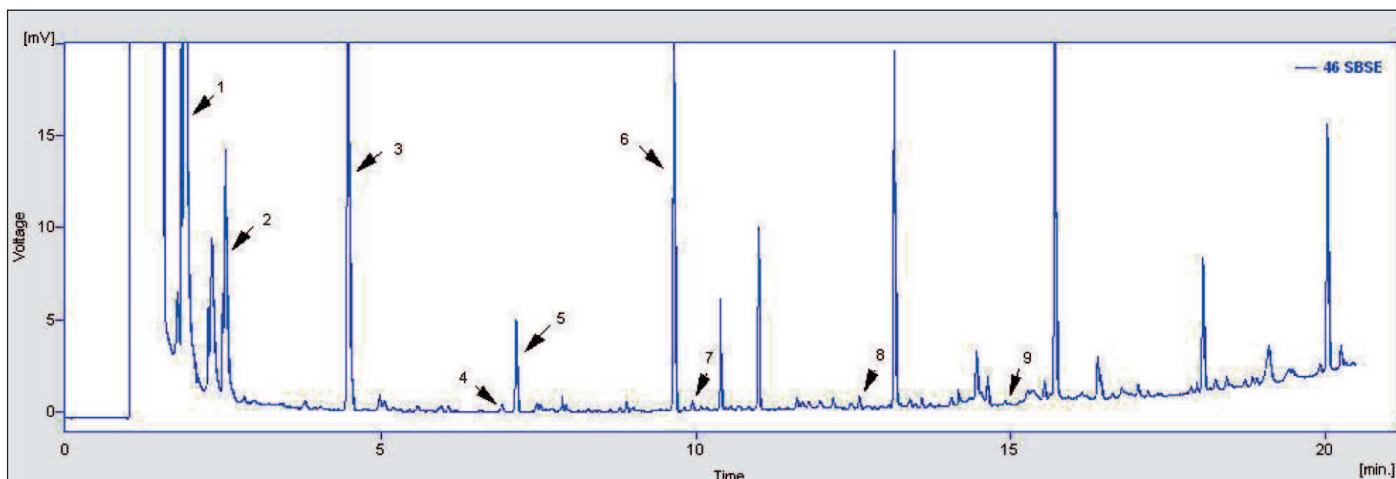
Fig. 4 illustrates the chromatogram of beer sample after stir bar sorptive extraction. The peaks of all compounds were clearly free from interferences by other GC eluents. The Twister extracts were also analyzed after Twister reconditioning. No peaks of the compounds of interest were presented in chromatograms so the procedure of reconditioning described above is sufficient.

3.2 Method validation

The nine data point's calibration curves throughout a range of the esters concentration from 0,015 mg/l to 30 mg/l in 5% V/V ethanol showed a slightly better fit to a quadratic curve than to a linear curve (Table 1). For all compounds the correlation coefficients to straight lines were better than 0.9988, for quadratic curves fit were better than 0.9995.



Obr. 3 / Fig. 3 Vliv délky doby, po kterou se provádí zpětná extrakce analytů z Twisteru do rozpouštědla, na velikost odezvy stanovovaných esterů / Influence of different solvent back extraction time for the total response of the esters



Obr. 4 / Fig. 4 Chromatogram piva po sorpční extrakci na míchací tyčince. 1 – octan isoamylnatý, 2 – kapronan ethylnatý, 3 – kaprylan ethylnatý, 4 – octan fenylnatý, 5 – kaprinan ethylnatý, 6 – octan fenylethylnatý, 7 – lauran ethylnatý, 8 – myristan ethylnatý, 9 – palmitan ethylnatý / Chromatogram obtained by SBSE followed the solvent back extraction of beer. 1 – isoamyl acetate, 2 – ethyl caproate, 3 – ethyl caprylate, 4 – phenyl acetate, 5 – ethyl caprate, 6 – phenylethyl acetate, 7 – ethyl laurate, 8 – ethyl myristate, 9 – ethyl palmitate

ných analytů na koncentrační hladině 7,5 mg/l. Výtěžnosti se pohybovaly od 78–107 %. Opakovatelnost metody byla zjištěna opakovanou sorpční extrakcí na míchací tyčince jednoho a téhož vzorku piva (pětkrát během jednoho dne). Relativní směrodatné odchylky se nacházely v intervalu 2,1–7,3 %.

4 ZÁVĚR

Bylo dokázáno, že pro stanovení některých, především méně těkavých esterů (octan isoamylnatý, kapronan ethylnatý, kaprylan ethylnatý, octan fenylnatý, kaprinan ethylnatý, octan fenylethylnatý, lauran ethylnatý, myristan ethylnatý a palmitan ethylnatý) v pivu majících vliv na senzory kvalitu výrobku je sorpční extrakce na míchací tyčince následovaná zpětnou extrakcí analytů z polydimethylsiloxanové fáze do organického rozpouštědla velmi vhodnou alternativou ke klasickým technikám jako je destilace s vodní párou následovaná extrakcí v systému kapalina-kapalina nebo SPE a SPME. Pro stanovení esterů v pivu tímto postupem byly na základě provedených experimentů navrženy tyto pracovní podmínky: 10 ml vzorku extrahovat Twisterem (délka 10 mm, tloušťka polydimethylsiloxanové fáze 0,5 mm) při 1200 ot/min po dobu 1 h, zpětnou extrakci analytů z Twisteru provést v 200 µl směsi rozpouštědel dichlormethan:hexan v poměru 50:50 při 1200 ot/min po dobu 40 min.

V porovnání s postupy využívajícími sorpční extrakce na míchací tyčince v kombinaci s termální desorpčí odpadají při zpětné extrakci do rozpouštědla nutnost pořídit finančně velmi náročný termální desorbér. Popsaná metoda je tedy levná, jednoduchá, používá malé množství vzorku, pouze mikrolitry organického rozpouštědla a vyznačuje se příznivými pracovními charakteristikami.

Another validation data are summarized in Tab. 1. The accuracy of the method was investigated by conducting the recovery test. The test was performed by measuring of natural contain of the esters in 5 different beers followed by measuring of the same beers spiked with a known concentration of each ester (7.5 mg/l). The results showed that recoveries were in the range 78–107 %.

The repeatability of the method was investigated by repeating stir bar sorptive extraction (5 times during the same day) of one and the same beer sample. The values of the relatively standard deviation ranged in the interval 2.1–7.3 %.

4. CONCLUSIONS

It was shown that the stir bar sorptive extraction followed by solvent back extraction of analytes is a very good alternative to established methods like steam distillation conjugated liquid-liquid extraction or SPE and SPME methods for the determination of some, especially semivolatile, esters in beer (isoamyl acetate, ethyl caproate, ethyl caprylate, phenyl acetate, ethyl caprate, phenylethyl acetate, ethyl laurate, ethyl myristate) exert influence up beer flavour. The procedure devised for the practical extraction utilized 10 ml of the sample stirring with Twister (length 10 mm, film thickness 0.5 mm) with 1200 rpm during 1 hour. Solvent back extraction of Twister used 200 µl of dichloromethane:hexane 50:50 with 1200 rpm for 40 min.

The proposed method has many practical advantages, e.g. small sample volume, simplicity of extraction and only microliters of solvents consumption. The method can be performed in parallel at room temperature. SBSE followed solvent back extraction is also low cost in comparison with SBSE combined with an expensive thermal desorption device.

Tab. 1 / Tab. 1 Pracovní charakteristiky metody stanovení některých esterů po extrakci technikou sorpční extrakce na míchací tyčince / Method validation for the determination of some esters in beer by SBSE followed solvent back extraction

Sloučenina / Compound	Korelační koeficient / Correlation coefficient		Výtěžnost / Recovery %	Opakovatelnost / Repeatability %
	Lineární regrese / Linear curve	Polynom 2. řádu / Quadratic curve		
Octan isoamylnatý / Isoamyl acetate	0,9992	0,9996	107	5,2
Kapronan ethylnatý / Ethyl caproate	0,9988	0,9999	104	3,1
Kaprylan ethylnatý / Ethyl caprylate	0,9994	0,9999	85	2,1
Octan fenylnatý / Phenyl acetate	0,9999	0,9999	102	6,7
Kaprinan ethylnatý / Ethyl caprate	0,9996	0,9999	78	7,3
Octan fenylethylnatý / Phenylethyl acetate	0,9991	0,9999	94	7,3
Lauran ethylnatý / Ethyl laurate	0,9988	0,9995	81	5,8
Myristan ethylnatý / Ethyl myristate	0,9998	0,9998	83	6,2
Palmitan ethylnatý / Ethyl palmitate	0,9995	0,9995	84	6,1

Poděkování

Tato práce je součástí Výzkumného záměru MSM 6019369701. Autoři dále děkují subjektům sdruženým v ČSPS za podporu při řešení tohoto úkolu.

*Zpracováno podle posteru prezentovaného
na 33. Pivovarsko-sladařském semináři v Plzni, 18.–19. 10. 2006.
Lektoroval Doc. Ing. Pavel Dostálek, CSc.
Do redakce došlo 4. 2. 2008*

Acknowledgements

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

The authors thank members of the Czech Beer and Malt Association for financial support.

*Based on poster presentation on 33rd Brewing and Malting
Seminary, Pilsen, 18.–19. 10. 2006*

Literatura / Literature

- [1] Meilgaard, M. C.: Flavor chemistry of beer. Part I: Flavor interaction between principal volatiles. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **12**, 1975, 107–151.
- [2] Čejka, P.: Faktory ovlivňující senzorické vlastnosti piva, *Kvasny Prum.* **43**, 1997, 167–173.
- [3] Arkima, V., Jounela-Eriksson, P.: Über die Bedeutung der Ester für das Bieraroma. *Proc. EBC*, 1979, 43–51.
- [4] Chen, E. C.-H.: Analysis of volatile beer flavor compounds by a dynamic headspace entrainment technique. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **41**, 1983, 28–31.
- [5] Hawthorne, D. B., Kavanagh, T. E., Clarke, P. J.: Determination of low molecular weight organic compounds in beer using capillary gas chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **45**, 1987, 23–27.
- [6] Irwin, A. J., Thompson, D. J.: A rapid method for the extraction and analysis of beer flavour components. *J. Inst. Brew.* **93**, 1987, 113–115.
- [7] Lindsay, R. C., Withycombe, D. A., Micketts, R. J.: Comparison of gas chromatographic methods for analysis of beer flavors. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 1972, 4–7.
- [8] Stenroos, L. E., Grabowski, J., Spearman, J., Siebert, K. J.: The semi-routine use of capillary gas chromatography for analysis of aroma volatiles in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **43**, 1985, 203–208.
- [9] Alvarez, P., Malcorps, P., Sa Almeida, A., Ferreira, A., Meyer, A. M., Dufour, J. P.: Analysis of free fatty acids, fused alcohols and esters in beer: an alternative to CS₂ extraction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52** (3), 1994, 127–134.
- [10] Arthur, C. L., Pawliszyn, J.: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused optical fibres. *Anal. Chem.* **62**, 1990, 2145–2148.
- [11] Pawliszyn, J.: Solid-Phase Microextraction: Theory and Practise, Wiley – VCH, New York, 1997.
- [12] Zhang, Z., Pawliszyn, J.: Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **65**, 1993, 1843–1852.
- [13] Jelen, H. H., Wlazly, K., Wasowicz, E., Kaminski, E.: Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: Comparison with static headspace method. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1998, 1469–1473.
- [14] Mikulíková, R., Prýma, J., Havlová, P.: Využití SPME/GC/MS při stanovení senzoricky aktivních látek v pivu a sladu, poster na 3. Mezinárodní pivovarnické a sladovnické konferenci, Bratislava, 2002.
- [15] Scarlata, C. J., Ebeler, S. E.: Headspace solid-phase microextraction for the analysis of dimethyl sulfide in beer. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1999, 2505–2508.
- [16] Horák T., Kellner V., Čulík J., Jurková M., Čejka P.: Solid phase microextraction – the new alternative for the determination of the vicinal diketone in beer. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Budapest, Fachverlag Hans Carl*, 2001, 757–763.
- [17] Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V.: Stanovení mastných kyselin v pivu technikou SPME. *Kvasny Prum.* **51**, 2005, 374–377.
- [18] Veselý, P., Lusk, L., Basařová, G., Seabrooks, J., Ryder, D.: Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2003, 6941–6944.
- [19] Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C.: Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *J. Microcolumn Separation* **11**, 1999, 737–747.
- [20] Sandra, P., Baltussen, E., David, F., Hoffmann, A.: A novel extraction technique for aqueous samples: Stir bar sorptive extraction, *AppNote 1/2000*, Gerstel, 2000, 1–5.
- [21] Tienpont, B., David, F., Bicchi, C., Sandra, P.: High capacity headspace sorptive extraction. *J. Microcolumn Separations* **12**, 2000, 577–584.
- [22] David, F., Sandra P., Hoffmann, A., Harms, D., Nietzsche F.: Elucidation of the hoppy aroma in beers by stir bar and head-space sorptive extraction followed by thermal desorption-CGC-MS/PFPD, *AppNote 4/2001*, Gerstel, 2001, 1–7.
- [23] Harms, D., Nietzsche, F., Hoffmann, A., David, F., Sandra, P.: The analysis of the bitter and other flavour compounds in beer and wort by stir bar sorptive extraction (SBSE) followed by HPLC, *AppNote 5/2001*, Gerstel, 2001, 1–6.
- [24] Ochiai, N., Sasamoto, K., Daishima, S., Heiden, A., C., Hoffmann, A.: Determination of stale-flavor carbonyl compounds in beer by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **986**, 2003, 101–110.

KVALITA ROSTLINNÝCH PRODUKTŮ

na prahu 3. tisíciletí
Jaroslav Prugar a kolektiv

Přehled rostlinných produktů zpracovaný kolektivem erudovaných odborníků s důrazem na hodnocení a ovlivňování jejich jakosti. Knihu vydal VÚPS, a. s. ve spolupráci s Komisí jakosti rostlinných produktů ČSAV, již je doc. Ing. Jaroslav Prugar předsedou.

Cena: 250 Kč včetně DPH. Vázaná, formát 160 x 240 mm, 330 stran

ISBN 978-80-86576-28-2

Objednávky vyřizuje Irena Boudová, boudova@beerresearch.cz