

VYUŽITÍ SPE A SPME PŘI ANALÝZE PIVA

APPLICATION OF SPE AND SPME IN ANALYSIS OF BEER

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

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: horak@beerresearch.cz

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Využití SPE a SPME při analýze piva. Kvasny Prum. 52, 2006, č. 3, s. 78–82.

K moderním a stále více se prosazujícím metodám přípravy vzorků při analýze senzoricky aktivních látek v pivu patří extrakce na pevné fázi (SPE) a mikroextrakce na pevné fázi (SPME).

Vzhledem k stále se rozšiřující nabídce různých sorbentů pro SPE a fází pro SPME bylo na příkladu stanovení mastných kyselin v pivu provedeno porovnání 11 SPE kolonek jednak z hlediska různých výrobců téhož typu sorbentů a jednak různých typů sorbentů, a dále pak porovnání 3 typů SPME vláken. V práci jsou porovnány pracovní charakteristiky SPE a SPME metody. Vlastní stanovení mastných kyselin probíhalo na plynovém chromatografu Chrompack CP 9001 vybaveném křemennou kapilární kolonou SPB-1000 (Supelco, délka 30 m, průměr 0,32 mm a tloušťka filmu 0,25 µm) a plamenioionizačním detektorem.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Application of SPE and SPME in Analysis of Beer. Kvasny Prum. 52, 2006, No. 3, p. 78–82.

Solid phase extraction (SPE) and solid phase microextraction (SPME) are typical examples of modern sample preparation methods used more and more for the determination of flavour compounds in beer.

The range of different sorbents for SPE and SPME fibers scales up. So the comparison of 11 SPE columns were investigated partly from the position of the same type of sorbents made by different producers and partly from different sort of sorbents. Furthermore the 3 type of SPME fibers were compared. SPE sorbents and SPME fibers were tested by the extraction of fatty acids as an example. Working parameters of SPE and SPME methods were described in this study. The final determination of fatty acids were carried out using gas chromatograph Chrompack CP 9001 equipped with fused silica capillary column SPB-1000 (Supelco, length 30 m, i. d. 0,32 mm and 0,25 µm film thickness) and the flame ionisation detector.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Die

Klíčová slova: extrakce na pevné fázi (SPE), mikroextrakce na pevné fázi (SPME), mastné kyseliny, pivo

1 ÚVOD

K nejpoužívanějším metodám pro přípravu vzorků piva k analýze senzoricky aktivních látek patří destilace s vodní párou, extrakce v systému kapalina-kapalina a headspace technika. Tyto postupy se často vyznačují časovou náročností a používáním organických rozpouštědel, která navíc mohou být zdraví škodlivá. V současné době stále stoupají požadavky na rychlost a zároveň spolehlivost analytických metod společně s ekonomickými aspekty. K typickým příkladům metod pro přípravu vzorků vyhovujícím dnešním nárokům patří extrakce na pevné fázi (SPE) a mikroextrakce na pevné fázi (SPME).

SPE je extrakční metoda pracující s pevnou a kapalnou fází. S úspěchem nahrazuje klasickou extrakci v systému kapalina-kapalina. Kapalná fáze obsahuje stanovené látky včetně dalších látek obsažených v matrici. Princip spočívá v zachycení sledovaných analytů, které jsou obsaženy v kapalné fázi, na speciálním sorbentu díky silným, ale vratným interakcím mezi analytem a povrchem stacionární fáze, přičemž by nemělo dojít k interakcím mezi stacionární fází a složkami matrice. Mezi typické interakce patří hydrofobní van der Waalsovy síly, polární vodíkové můstky, síly dipól-dipól nebo iontové výměnné interakce. Sorbent je umístěn mezi fritami v extrakční minikolonce určené na jedno použití. Cílem tohoto postupu je jed-

Ausnützung der Extraktion auf den festen Phase (SPE) und Microextraktion auf der festen Phase (SPME) bei der Analyse des Bieres. Kvasny Prum. 52, 2006, Nr. 3, S. 78–82.

Die Extraktion auf den festen Phase (SPE) und Microextraktion auf der festen Phase (SPME) bei der Bieranalyse gehören zu den neuesten und ammeisten angewandten Methoden der Mustervorbereitung bei der Analyse von sensorisch Aktivstoffen im Bier.

Im Hinblick auf das ständig zunehmende Angebot von verschiedenen Sorbenten für SPE und von Phasen für SPME aus dem Gesichtspunkt von verschiedenen Herstellern des Sorbent der gleichen und verschiedenen Art wurde am Beispiel einer Fettsäurenfeststellung im Bier ein Vergleich von 11 verschiedenen Typen SPE Säulchen und 3 verschiedenen Typen SPME Fassern durchgeführt. In diesen Artikel werden die Arbeitscharakteristik von Methoden der SPE und der SPME verglichen. Die Fettsäurenfeststellung wurde am einen, mit Kapillarquarzsäule SPB-1000 (Supelco, Länge 30 Meter, Diameter 0,32 mm, Filmstärke 0,25 µm) und mit FID ausgestatteten Gaschromatograph Chrompack CP 9001 durchgeführt.

Горак, Т. – Чулик, Й. – Йуркова, М. – Чейка, П. – Келлер, В.: Использование SPE и SPME для анализа пива. Kvasny Prum. 52, 2006, No. 3, стр. 78–82.

Современные непрерывно более употребляемые методы подготовки проб при анализе сенсорически активных веществ в пиве представляют экстрагирование на твердую фазу (SPE) и микроэкстрагирование на твердую фазу (SPME).

Ввиду постоянно расширяющихся предложений разных сорбентов для SPE и фаз для SPME были на примере определения жирных кислот в пиве проведены сравнения 11 SPE колонок с точки зрения разных изготовителей того же типа сорбента и сравнения разных типов сорбентов и после того сравнения 3 типов SPME волокон. В работе сравниваются рабочие характеристики методов SPE и SPME. Собственное определение жирных кислот было сделано на газовом хроматографе Chrompack CP 9001, оборудованном кварцевой капиллярной колонкой SPB-1000 (Supelco, длина 30 м, диаметр 0,32 мм и толщина фильма 0,25 µm) и пламенно-ионизационным детектором.

Keywords: solid phase extraction (SPE), solid phase microextraction (SPME), fatty acids, beer

1 INTRODUCTION

Steam distillation, liquid-liquid extraction and headspace methods are the most frequently used sample preparation techniques in the determination of sensory active compounds in beer. Those procedures are often time-consuming and require organic solvents possibly harmful. During the past years the requests to faster and reliable analysis together with economic aspects rose up. Solid phase extraction (SPE) and solid phase microextraction (SPME) are typical examples of these modern sample preparation methods.

SPE is an extraction process which comprises of a solid and liquid phase and successfully replaces the classical liquid-liquid extraction. The compounds of interest and the matrix interferences are in the liquid phase. SPE is based on the principle that the components of interest are retained in a special sorbent by using strong but reversible interactions between the analytes and surface of the stationary phase. Interaction between stationary phase and matrix should not occur. Typical interactions are hydrophobic van der Waals forces, polar hydrogen bonding, dipole-dipole forces or ion exchange interactions. The sorbent is placed in a disposable extraction minicolumn. The goal of this technique is partly the removal of the matrix interfering components and partly isolation as well as selective enrichment by factors of 100 to 5000 of the determined compounds.

nak odstranění interferujících látek obsažených v matici a jednak izolace a zkoncentrování (100x-5000x) stanovených látek.

Díky jednoduchosti a snadnému použití SPE vyústil zájem o tuto techniku ke komerčnímu používání jednorázových minikolonek. Tyto kolonky jsou plněny různými sorbenty o různé velikosti částic. K přetlačení vzorku a promývacího roztoku skrze kolonku je díky velikosti částic možné použít nízkého tlaku. Jako sorbenty se nejčastěji používají modifikovaný i nemodifikovaný oxid křemičitý, oxid hlinitý, polymery atd. Pro obrácenou fázi jsou k dispozici oktadecyl (C_{18}), oktyl (C_8), etyl (C_2), cyklohexyl, fenyl, butyl (C_4). Pro normální fázi se používá oxid křemičitý modifikovaný skupinami kyano ($-CN$), amino ($-NH_2$), dioly ($-COHCOH$). Pro adsorpci se využívá silikagel ($-SiOH$), florisil (Mg_2SiO_3), oxid hlinitý (Al_2O_3). K iontové výměně se využívá skupin amino ($-NH_2$), kvarterního aminu (N^+), karboxylové skupiny ($-COOH$), aromatické sulfonové kyseliny ($ArSO_3OH$) nebo polyetyleniminu [$-(CH_2CH_2NH)_n-$].

Velmi důležitým kritériem umožňujícím vysokou opakovatelnost analytických výsledků je zajištění konstantní kvality různých šarží jednorázových SPE kolonek. K tomuto účelu se jako charakteristika SPE kolonky používá kapacita kolonky. Kapacita se vyjadřuje jako poměr mg analytu/g sorbentu a znamená, že za stejných podmínek různé šarže kolonek adsorbují a desorbují stejné množství analytu. Stejnou kvalitou šarží dnes většinou firmy garantují certifikovaným procesem výroby SPE kolonek.

Metoda SPE zahrnuje čtyři po sobě jdoucí kroky.

1) Kondicionace sorbentu. V tomto kroku se SPE kolonka připraví na interakci se vzorkem. Často se provádí methanolem, vodou nebo pufrům. Jde o nezbytný krok pro reprodukovatelnou sorpci analytů.

2) Aplikace vzorku. Vzorek se pomocí vaku prosaje skrz kolonku. Sledované analyty se zachytávají v úzké zóně na sorbentu. Část interferujících látek z matrice projde kolonkou přímo do odpadu, část se adsorbuje.

3) Promytí. Zachycené interferující látky matrice jsou odstraněny z povrchu stacionární fáze.

4) Eluce. V tomto kroku dochází k selektivní desorpci analyzovaných látek pomocí vhodného rozpouštědla [1, 2].

Při vývoji SPE metody je nutné zvážit následující hlediska:

1) Stanovení cíle metody pro přípravu vzorků. Jak vysoké výtěžnosti musíme dosáhnout? Jak vysokého stupně odstranění interferujících látek musíme pro koncovou analýzu dosáhnout? Bude dosažené zkoncentrování dostatečné pro konečnou analýzu? Jaké rozpouštědlo je optimální pro sledované analyty? Jaké prostředky jsou dostupné pro vývoj metody a pro rutinní analýzu?

2) Zvážit vlastnosti vzorku – jak matrice, tak sledovaných analytů. Jaká je matrice vzorku, je silně polární nebo nepolární? Jak velký je objem vzorku? Jaké funkční skupiny mohou mít vliv na rozpustnost analyzovaných látek – polarita, disociační konstanta, atd.?

3) Na základě výše uvedených bodů je nutné zvolit retenční mechanismus, typ fáze, množství sorbentu a vhodnou velikost SPE kolonky, která by nejlépe vyhovovala vlastnostem vzorku a cílům kladeným na přípravu vzorku. Obecně platí, že hmotnost analytu, který má být sorbován, by měla být maximálně 5 % hmotnosti sorbentu. Co se týče velikosti SPE kolonek do objemu 1 ml vzorku se používá 1 ml kolonka. 3 ml kolonka je vhodná od 1 ml do 250 ml vzorku, 6 ml kolonka od 1 ml do 250 ml pro rychlou předseparaci, 12, 20 a 60 ml kolonky se využívají pro objemy vzorků od 10 ml do 1 litru.

4) Prostřednictvím experimentů s roztoky standardů optimalizovat dávkování a vymývání, určit chování analytu na sorbentu v závislosti na změně extrakčních podmínek. Na základě těchto experimentů optimalizovat podmínky pomocí pokusů s reálnou maticí, s použitím obohacených vzorků zjistit výtěžnost, opakovatelnost, čistotu získaného extraktu. Nakonec je třeba celou metodu zvalidovat [3].

Při analýze piva a dalších nápojů se SPE metoda používá např. pro stanovení vyšších aromatických alkoholů (tyrosol, tryptofol, guajakol) [4], mastných kyselin [5, 6], furfuralu, hydroxymethylfurfuralu [7], iso- α -hořkých kyselin [8], ATNC (zdánlivých celkových N-nitrososloženin) [9], biogenních aminů [10], sacharinu [11].

Mikroextrakce na pevné fázi – SPME – je adsorpcně/desorpcní technika vyvinutá Pawliszynem na University of Waterloo v 1. pol. 90. let a patentovaná firmou Supelco. Je vhodná především pro stanovení těkavých látek jako alternativa ke klasické headspace technice. Princip použití a způsob vzorkování byl už v Kvasném průmyslu popsán [12].

Technika SPME se v pivovarské analytice využívá např. pro stanovení nižších alkoholů a esterů [13, 14], vicinálních diketonů [15], dimethylsulfidu [16] nebo mastných kyselin [17].

Předložená práce se na příkladu stanovení mastných kyselin za-

The great interest in this simple and use-to-use technique led to the marketing of disposable minicolumns. These columns are packed with sorbents of different particle sizes. The particle size permits the use of low pressure to force the sample and wash the solution through the column. The sorbents mostly used include modified silica, unmodified silica, alumina, polymers etc. The reversed phase usually used as sorbents octadecyl (C_{18}), octyl (C_8), ethyl (C_2), cyclohexyl, phenyl, butyl (C_4). Sorbents for the normal phase involve silica modified by cyano ($-CN$), amino ($-NH_2$), diols ($-COHCOH$). Silica gel ($-SiOH$), florisil (Mg_2SiO_3), alumina (Al_2O_3) are used for adsorption. As ion-exchangers serve amino ($-NH_2$), quaternary amine (N^+), carboxylic acid ($-COOH$), aromatic sulfonic acid ($ArSO_3OH$) or polyethyleneimine [$-(CH_2CH_2NH)_n-$].

The constant batch – to – batch quality of disposable cartridges is a very important criterion for the high precision of analytical results. The capacity is used as a characteristic of the SPE column. The capacity, measured in mg analyte/g sorbent means that under identical test conditions, the various batches adsorb and desorb the same quantity of analyte. Today in most cases companies guarantee the uniform quality of the batches by the certificated production processes.

SPE method consists of four steps:

1) Conditioning of the sorbent. During this step the SPE column is prepared to interact with the sample. Methanol, water or buffer is often used. This step is necessary for reproducible sorption of analytes.

2) Sample application. The sample solution is forced through the sorbent of cartridge using vacuum. The analytes of interest are enriched as a narrow zone on the stationary phase. Some matrix interfering compounds pass through the column to the waste another part of them is adsorbed.

3) Rinsing. Possible adsorbed sample components are removed from the surface of the stationary phase.

4) Elution. The selective desorbing of the analytes of interest takes place using suitable solvent [1, 2].

The SPE method development process must consider next viewpoints:

1) Determine sample preparation objectives. What level of recovery is required? What level of interference removal is required for analysis? Is a concentration required for optimal analysis? In what solvent should the analyte be in for optimal analysis? What resources are available for the method development and routine analysis?

2) Consider sample characteristics of both matrix and both analytes. What is the sample matrix and is it more polar or non-polar? What is the sample volume? What functional groups may influence the analyte's solubility, polarity, ionization state (pKa), etc.?

3) Based on the above mentioned consideration select retention mechanism, phase chemistry, bed weight and „hardware“ configuration that best meets the predefined sample prep objectives for the sample characteristics. Generally the mass of analyte of interest should be max. 5 % of the sorbent mass. The size of the SPE column is recommended as follows: 1 ml column is used up to 1 ml of sample, 3 ml column is suitable for sample volumes 1–250 ml, 6 ml column is used for fast separation of 1–250 ml sample volumes and 12, 20 and 60 ml columns are applied for sample volumes 10–1000 ml.

4) Using experiments with the standard solutions optimize loading and elution profile; determine analyte behaviour on the sorbent in response to changing extraction conditions. Based on these results optimization of the conditions can be reached by the experiments with the sample matrix. Using spiked samples recovery, reproducibility and cleanliness of the obtained extract can be determined. Validation must be done finally [3].

For the determination of flavour compounds in beer and other drinks SPE methods are used for example in analyses of higher aromatic alcohols (tyrosol, tryptophol, guaiacol) [4], fatty acids [5, 6], furfural, hydroxymethylfurfural [7], iso- α -bitter acids [8], ATNC (Apparent total N-nitroso compounds) [9], biogenic amines [10], saccharin [11].

Prof. Pawliszyn from the University of Waterloo has developed a solid phase microextraction – SPME – adsorption/desorption technique in the first part of 90's. This extraction procedure has been patented by Supelco company. This technique is suitable first of all for the determination of volatile compounds as an alternative to the classical headspace technique. The principle of use and sampling has been written in Kvasny Prumysl yet [12].

SPME methods in beer analyses has been applied for example for the determination of lower alcohols and esters [13, 14], vicinal diketones [15], dimethylsulphide [16] or fatty acids [17].

This paper presents the example of the determination of fatty acids

bývá porovnáním jedenácti SPE kolonek a dále pak porovnáním tří typů SPME vláken.

the comparison of 11 SPE columns and also the comparison of 3 type of SMPE fibers.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité materiály, standardy

V práci byly použity SPE kolonky fy Merck: LiChrolut EN 200 mg/3 ml (ethylvinylbenzen divinylbenzen polymer s extrémně velkým specifickým povrchem), LiChrolut RP-18 200 mg/3 ml, LiChrolut RP-18 500 mg/3 ml; Varian: Absolut Nexus LRC 60 mg (polymerní sorbent nevyžaduje kondicionaci, a tak se celý SPE proces redukuje ze čtyř kroků na tři (pro nepolární látky); Agilent Technologies: Zorbax C18-EC 500mg (oxid křemičitý velmi vysoké čistoty); Phenomenex: Strata C18-E 200 mg/3 ml, Strata X 200 mg/6 ml (polymer), Strata SDB-L 200mg/3 ml (styren divinylbenzen); Supelco: Discovery DSC-18 500 mg/3 ml (polymerně vázaný oktadecyl), Discovery DSC-18LT 500 mg/3 ml (monomerně vázaný oktadecyl – 11 % C), Supelclean ENVI-CARB 250 mg/3 ml (grafitizovaný neporézní uhlík).

Pro SPME metodu byla odzkoušena vlákna: Carbowax/DVB – 65 µm, PDMS – 100 µm a Carboxen/PDMS, 75 µm (vše Supelco).

Kyselina butanová (máslaná), pentanová (valerová), hexanová (kapronová), heptanová, oktanová (kaprylová), nonanová (pelargonová), dekanová (kaprinová), undekanová, dodekanová (laurová), tridekanová, tetradekanová (myristová), pentadekanová, hexadekanová (palmitová), heptadekanová, oktadekanová (stearová), okta-dekadienová (linolová), oktadekatrienová (linolenová), oktadece-nová (olejová) – Supelco.

Methylestery kyselin oktanové, dekanové, dodekanové, trideka-nové, tetradekanové, pentadekanové, hexadekanové, heptadeka-nové, oktadekanové, oktadekadienové, oktadekatrienové, oktade-cenové – Supelco.

Derivatizační činidlo BF₃ – methanol 14% – Fluka.

2.2 Metoda

Nižší mastné kyseliny C₄–C₁₂ byly po extrakci metodou SPE stanoveny jako volné kyseliny, zatímco vyšší mastné kyseliny C₁₄–C₁₈ byly analyzovány ve formě methylesterů po derivatizaci pomocí BF₃ ve 14% methanolu. Postup extrakce vycházel z práce [6].

Způsob extrakce nižších mastných kyselin C₄–C₁₂ metodou SPME byl založen na metodě popsané v práci [17].

Vlastní analytické stanovení probíhalo na plynovém chromatografu Chrompack CP 9001, který byl vybaven automatickým dávkovačem Labio ASG 40. Chromatografická separace probíhala na 30 m dlouhé křemenné kapilární koloně SPB-1000 firmy Supelco s vnitřním průměrem 0,32 mm a tloušťkou filmu 0,25 µm. Kolona byla temperována na 120 °C po dobu 2 min, poté následoval teplotní gradient 10 °C/min do teploty 150 °C a následně 30 °C/min až do teploty 200 °C. Při této teplotě kolona zůstala po dobu 15 min. Injektor i plamenoionizační detektor (FID) byly vyhřátý na teplotu 250 °C. Při analýze vzorků extrahovaných metodou SPE byl nástřik prováděn v režimu split 1:10. Při stanovení analytů extrahovaných metodou SPME byl nástřik prováděn

2 EXPERIMENTAL

2.1 Materials, standards

SPE cartridges were purchased from Merck: LiChrolut EN 200 mg/3 ml (ethyl vinyl benzene divinyl benzene polymer with an extremely large specific surface), LiChrolut RP-18 200 mg/3 ml, LiChrolut RP-18 500 mg/3 ml; Varian: Absolut Nexus LRC 60 mg (uses a non-conditioned polymer sorbent. It streamlines the entire SPE process from four steps down to three (for non-polar components) without compromising results); Agilent Technologies: Zorbax C18-EC 500mg (spherical, highest purity silica particles); Phenomenex: Strata C18-E 200 mg/3 ml (endcapped), Strata X 200 mg/6ml (polymeric sorbent), Strata SDB-L 200mg/3 ml (styrene divinyl benzene); Supelco: Discovery DSC-18 500 mg/3 ml (polymerically binder, octadecyl, endcapped), Discovery DSC-18LT 500 mg/3 ml (monomerically octadecyl – 11 % C, endcapped), Supelclean ENVI-CARB 250 mg/3 ml (graphitized non-porous carbon).

SPME fibers – Carbowax/DVB – 65 µm, PDMS – 100 µm and Carboxen/PDMS, 75 µm – were obtained from Supelco.

Butanoic (butyric), pentanoic (valeric), hexanoic (caproic), heptanoic, octanoic (caprylic), nonanoic (pelargonic), decanoic (capric), undecanoic and dodecanoic (lauric), tridecanoic, tetradecanoic (myristic), pentadecanoic, hexadecanoic (palmitic), heptadecanoic, octadecanoic (stearic), octadecadienoic (linoleic), eicosatrienoic (linolenic), octadecenoic (oleic) acids were obtained from Supelco.

Myristic acid methyl ester, pentadecanoic acid methyl ester, palmitic acid methyl ester, heptadecanoic acid methyl ester, stearic acid methyl ester, linoleic acid methyl ester, linolenic acid methyl ester, oleic acid methyl ester were purchased from Supelco.

Derivatization agent BF₃ – methanol 14 % was delivered by Fluka.

2.2 Method

Low chain fatty acids C₄–C₁₂ were determined as free acids after the SPE extraction method while long chain fatty acids C₁₄–C₁₈ were analysed as methyl esters after their derivatization by BF₃ – methanol 14 % agent. The extraction procedure is shown in the work [6].

The extraction process of low chain fatty acids C₄–C₁₂ by SPME method is based on the procedure described in the work [17].

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 Supelco SPB-1000 with 0,25 µm film thickness. The GC column was maintained at 120 °C for 2 min, ramped at a rate of 10 °C/min to 150 °C and then ramped at a rate of 30 °C/min to 200 °C and held at this temperature for 15 min. Temperatures of the injector and the flame ionisation detector (FID) were 250 °C. For analyses of samples prepared by SPE procedure the split injection 1:10 was used. For the determination of compounds extracted by the SPME method the split-splitless injector was used, and the split vent was opened after 0,5 min. The carrier gas was helium quality 5.0

Tab. 1 / Table 1 Porovnání extrakční účinnosti SPE kolonek včetně cenového srovnání / The extraction efficiency comparison of SPE columns including the price comparison

SPE kolonka SPE column	Relativní cena kolonky Relative column price (%)	Relativní plocha kyselin Relative area of acids C ₄ –C ₁₂ (%)	Relativní plocha methylesterů kyselin Relative area of methyl esters C ₁₄ –C ₁₈ (%)
LiChrolut EN 200 mg/3 ml	395	105	58
LiChrolut RP-18 200 mg/3 ml	238	101	92
LiChrolut RP-18 500 mg/3 ml	207	91	83
Absolut NEXUS LRC 60 mg	149	126	62
Zorbax C18-EC 500 mg	*	118	88
Strata C18-E 200 mg/3 ml	100	100	100
Strata X 200 mg/6 ml	219	145	29
Strata SDB-L 200 mg/3 ml	151	194	57
Discovery DSC-18 500 mg/3 ml	182	105	86
Discovery DSC-18LT 500 mg/3 ml	182	140	92
Supelclean ENVI-CARB 250 mg/3 ml	202	148	55

*) není k dispozici / not available

ve splitless módu, split ventil byl otevřen po uplynutí 0,5 min. Jako nosný plyn bylo využito helium v kvalitě 5.0, tlak na koloně byl 100 kPa při 75 °C.

Methylestery vyšších mastných kyselin byly analyzovány za stejných chromatografických podmínek.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Porovnání účinnosti jednotlivých SPE kolonek při extrakci mastných kyselin o přibližné koncentraci každé kyseliny 2,0 mg/l v modelovém roztoku 5% ethanolu včetně cenového srovnání uvádí *tab. 1*. Porovnání SPME vláken ukazuje *tab. 2*.

Z výsledků je vidět, že stejné typy sorbentů (LiChrolut RP-18, Strata C18-E, Discovery DSC-18) poskytují pro nižší mastné kyseliny srovnatelné výsledky. Lepších výsledků bylo dosaženo na kolonce Zorbax C18-EC, bohužel dle sdělení dodavatele se tento sorbent obsahující vysoce čistý oxid křemičitý již nedodává.

Polymerní sorbenty (LiChrolut EN, Absolut NEXUS LRC, Strata X, Strata SDB-L) i grafitizovaný uhlík dosahují pro nižší mastné kyseliny výrazně vyšší extrakční účinnosti. Naopak extrakce vyšších mastných kyselin je podstatně nižší než u klasických C-18 sorbentů. Nevýhodou je také vyšší cena.

Jak vyplývá z *tab. 2*, nejlepších výsledků při extrakci nižších mastných kyselin z modelového roztoku bylo dosaženo použitím SPME vlákna pokrytého fází 65 µm Carbowax-Divinylbenzen.

Vzhledem k tomu, že při stanovení mastných kyselin v pivu se nedějí o stopové koncentrace, není nutné použít materiál dosahující nejlepších extrakčních schopností. Pracovní charakteristiky SPE metody tedy byly zjištěny pro ekonomicky nejvýhodnější sorbent Strata C18-E 200 mg/3 ml. Pro SPME metodu bylo využito vlákno Carbowax-Divinylbenzen.

Správnost metody byla ověřena pomocí výtěžnosti. Nejprve byl změřen přirozený obsah volných mastných kyselin v deseti reálných vzorcích pív. Poté byly tyto vzorky pív obohaceny přídatkem mastných kyselin na koncentrační hladině 2 mg/l každé látky. Opakovatelnost metody byla zjištěna opakovanou analýzou jednoho a téhož vzorku piva (10krát během jednoho dne).

Výsledky uvedené v *tab. 3* ukazují, že pro stanovení kyselin kapronové až laurové jsou metody SPE a SPME srovnatelné. Při menším počtu vzorků je z časového hlediska a větší jednoduchosti výhodnější metoda SPME. Na druhé straně při měření větší série vzorků je při využití automatického dávkování vzorků do plynového chromatografu výhodnější metoda SPE. Touto metodou je navíc možné proměřit větší spektrum mastných kyselin. Derivatizace ex-

Tab. 2 / *Table 2* Porovnání extrakční účinnosti SPME vláken / *The extraction efficiency comparison of SPME fibers*

SPME vlákno <i>SPME fiber</i>	Relativní plocha kyselin <i>Relative area of acids</i> C ₄ –C ₁₂ (%)
Carbowax/DVB	100
PDMS	85
Carboxen/PDMS	35

with a column head pressure of 100 kPa at 75 °C.

Methyl esters of long chain fatty acids were determined under the same chromatographic condition.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the comparison of SPE columns efficiency during extraction of fatty acids (approximate concentration of each acid was 2,0

mg/l) from testing solution of 5 % V/V ethanol including the price comparison. *Table 2* demonstrates the comparison of SPME fibers.

The results show that the same type of sorbents (LiChrolut RP-18, Strata C18-E, Discovery DSC-18) give comparable results for the determination of low chain fatty acids. The SPE column Zorbax C18-EC reached better results but unfortunately according the supplier information this product with very pure silica is not available on the market yet.

Significantly higher extract efficiency has been reached with polymer sorbents (LiChrolut EN, Absolut NEXUS LRC, Strata X, Strata SDB-L) and graphitized non-porous carbon for low chain fatty acids. On the other hand the extraction of long chain fatty acids is lower in comparison with classical C – 18 sorbents. Another disadvantage is higher price.

Table 2 demonstrates that SPME fiber coated with 65 µm Carbowax-Divinylbenzen got the best results for the extraction of low fatty acids from testing solution.

To determine fatty acids in beer it is not require to analyse the trace concentrations so it is not necessary to use the material with the best extraction capability. So the working characteristics of the SPE method have been evaluated using the most economically advantageous sorbent Strata C18-E 200 mg/3 ml. The Carbowax-Divinylbenzen fiber was used for SPME method development.

The accuracy of the method was investigated by conducting the free fatty acids recovery test. The test was performed by measuring naturally occurring free fatty acids in 10 beer samples followed by measuring the same beer spiked with a known concentration of each fatty acid (2 mg/l). The repeatability of the method was investigated by repeating the headspace SPME analysis (10 times on the same day) of the same beer sample.

The SPE and SPME methods give very similar results for the determination of fatty acids from caproic to lauric range as shown in *table 3*. Using of the SPME method is better for smaller number of samples due to more simplicity and less time consuming. On the other hand the SPE method can be used for the measurement of a big series of samples especially if the gas chromatograph is equipped with an autosampler. Moreover the wider range of fatty acids can be

Tab. 3 / *Table 3* Výtěžnost a opakovatelnost SPE a SPME metody pro stanovení mastných kyselin v pivu (CV – variační koeficient) / *Recovery and Repeatability of the SPE and SPME method for the determination of fatty acids in beer (CV – variation coefficient)*

Sloučenina / <i>Compound</i>	SPE			SMPE		
	Obbohacení / <i>Spike</i> (2 mg/l)		Opakovatelnost <i>Repeatability</i>	Obbohacení / <i>Spike</i> (2 mg/l)		Opakovatelnost <i>Repeatability</i>
	Výtěžnost <i>Recovery</i> (%)	CV (%)	CV (%)	Výtěžnost <i>Recovery</i> (%)	CV (%)	CV (%)
Máslaná kyselina / <i>Butyric acid</i> (C ₄)	58	9,2	10			
Valerová kyselina / <i>Valeric acid</i> (C ₅)	67	7,2	9,6			
Kapronová kyselina / <i>Caproic acid</i> (C ₆)	107	4,4	4,9	110	4,8	3,7
Kaprylová kyselina / <i>Caprylic acid</i> (C ₈)	101	4,7	4,3	103	4,3	2,3
Nonanová kyselina / <i>Nonanoic acid</i> (C ₉)	97	6,1	8,3	105	7,1	8,1
Kaprinová kyselina / <i>Capric acid</i> (C ₁₀)	98	4,4	6,0	98	4,5	4,8
Laurová kyselina / <i>Lauric acid</i> (C ₁₂)	103	9,0	12	95	5,8	5,1
Myristová kyselina / <i>Myristic acid</i> (C ₁₄)	85	9,7	16			
Palmitová kyselina / <i>Palmitin acid</i> (C ₁₆)	125	14,9	12			
Stearová kyselina / <i>Stearin acid</i> (C ₁₈)	108	11,2	14			
Olejevá kyselina / <i>Oleic acid</i> (C ₁₈)	105	11,2	11			
Linolová kyselina / <i>Linoleic acid</i> (C ₁₈)	98	11,3	11			
Linolenová kyselina / <i>Linolenic acid</i> (C ₁₈)	110	11,4	9			

traktu získaného SPE technikou pomocí BF_3 v 14% methanolu je jednoduchá a bezpečná na rozdíl od derivatizace diazomethanem na SPME vlákně. Výrazně nižší výtěžnost kyselin máselné a valerové je zřejmě důsledkem jejich vyšší těkavosti způsobena ztrátami při vysušování kolonky.

4 ZÁVĚR

SPE a SPME metody přípravy vzorků představují velmi silný nástroj zefektivnění provádění analytických rozborů. Na trhu je dostupná široká nabídka různých sorbentů od různých výrobců, se kterými lze, jak bylo demonstrováno na příkladu stanovení mastných kyselin v pivu, dosáhnout velmi dobrých výsledků. Vždy je nutné zvážit požadavky, které budeme na metodu klást. Z uvedeného příkladu je patrné, že i ekonomicky nejvýhodnější sorbent může v konkrétním daném případě poskytnout naprosto vyhovující parametry.

Práce je součástí Výzkumného záměru VÚPS č. MSM 6019369701.

Zpracováno podle posteru prezentovaného na 21. Pivovarsko-sladařských dnech, Ústí nad Labem, 6.–7. 10. 2005

Do redakce došlo 18. 1. 2006

Literatura / Literature

- [1] Literatura firmy Merck: ChromBook, 2nd Edition, 2000, s. 15.
- [2] Literatura firmy Merck: ChromBook 2006/07, 2005, s. 22–23.
- [3] Supelco – Technical Report: Systematic SPE Metod Development, 2003, s. 1.
- [4] Čulík, J., Figalla, K., Horák, T., Kellner, V.: Stanovení vyšších senzoricky aktivních alkoholů v pivě pomocí extrakce na pevné fázi a kapilární plynové chromatografie. *Kvasny Prum.* **45**, 1999, s. 4–7.
- [5] Kellner, V., Čejka, P., Čulík, J., Jurková, M., Horák, T.: Závěrečná zpráva VÚ 1.1/2000, VÚPS Praha, 2001, s. 18.
- [6] Hage, T.: Free fatty acids in beer – the use of a Binder-phase column in the extraction of free fatty acids for gas chromatographic essay. *Proc. Fourth European Conference on Food Chemistry*, Volume 1, Loen, Norway, June 1–4, 1987, s. 106–110.
- [7] Gomis, D. B., Alvarez, M. D., Naredo, L. S., Alonso, J. J. M.: High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Furfural and Hydroxymethylfurfural in Apple Juices and Concentrates. *Chromatografia* **32**, 1991, s. 45–48.
- [8] Jurková, M., Kellner, V., Čulík, J., Horák, T., Čejka, P.: Rychlá a účinná izolace iso- α -hořkých kyselin z piva metodou SPE. *Kvasny Prum.* **49**, 2003, s. 258–259.
- [9] Massey, R., Dennis, M. J., Pointer, M., Key, P. E.: An investigation of the levels of N-nitrosodimethylamine, apparent total N-nitroso compounds and nitrate in beer. *Food Additives and Contaminants* **7**, 1990, s. 605–615.
- [10] Jurková, M., Kellner, V., Horák, T., Čejka, P., Čulík, J.: The HPLC

obtained by this method. The derivatization of SPE extract using BF_3 – methanol 14 % agent is simple and safe in opposite of derivatization by diazomethane on SPME fiber. Evidently lower recovery of the butyric and valeric acids is probably caused by losses during the column drying procedure as a result of their volatility.

4 CONCLUSIONS

The SPE and SPME sample preparation methods present a very powerful tool for streamlining the carrying out of the analytical analysis. With the example of the determination of fatty acids in beer it was demonstrated that the using of a wide range of different sorbents obtained from different producers can reach very good results. It is always necessary to consider requirements to the sample preparation method. As well as the most economically advantageous sorbent can give in one concrete case absolutely satisfactory parameters as can be seen from above mentioned example.

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

Based on poster presentation on 21st Brewing and Malting Days, Ústí nad Labem, 6.–7. 10. 2005

determination of biogenic amines in beer by solid phase extraction (SPE) and automatic derivatization. *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Prague, 2005, s. 989–993.

- [11] Moors, M., Teixeira, C. R. R., Jimidar, m., Massart, D. L.: Solid-phase extraction of the preservatives sorbic acid and benzoic acid and the artificial sweeteners aspartame and saccharin. *Anal. Chim. Acta* **255**, 1991, s. 177–186.
- [12] Procházková, D.: Mikroextrakce tuhými fázemi – SPME. *Kvasny Prum.* **45**, 1999, s. 321–322.
- [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, s. 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] Horák, T., Čulík, J., Čejka, P., Jurková, M., Kellner, V.: Stanovení vicinálních diketonů v pivu metodou SPME. *Kvasny Prum.* **47**, 2001, s. 316–321.
- [16] Scarlata, C. J., Ebeler, S. E.: Headspace Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Dimethyl Sulfide in Beer. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1999, s. 2505–2508.
- [17] Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V.: Stanovení mastných kyselin v pivu technikou SPME. *Kvasny Prum.* **51**, 2005, s. 374–377.



Školící a informační středisko – PIVOVARSKÁ ŠKOLA

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.
Lípová 15, 120 44 Praha 2



VÚPS, a. s. získal na projekt JPD3/263 „Školící a informační středisko – Pivovarská škola“ dotaci ze státního rozpočtu ČR v rámci Jednotného programového dokumentu pro Cíl 3 regionu NUTS 2 hlavní město Praha spolufinancovaného ze státního rozpočtu ČR a Evropského sociálního fondu.

Základním cílem projektu je přenos informací mezi VÚPS, a.s. a spolupracujícími pracovišti výzkumu, školství, výroby, médií atd. Naplněním tohoto cíle dojde k posílení spolupráce vědy, výzkumu a průmyslu v oblasti pivovarství s cílem zvýšení konkurenceschopnosti. Systematicky tak bude zvyšována kvalifikace řídících i odborných pracovníků pražského pivovarství, studentů VŠCHT Praha a SPŠPT i mladých vědeckých pracovníků. Cílem je urychlení a zkvalitnění přenosu poznatků mezi vědecko-výzkumnou a průmyslovou sférou. Cílem projektu je i vybudování školícího a poradenského centra v Praze pro oblast pivovarství v rámci VÚPS, jenž poskytne nezbytné zázemí. Součástí tohoto centra bude i webová stránka www.pivovarskaskola.cz.