

NOVÉ TRENDY V PŘÍPRAVĚ VZORKŮ PRO ANALÝZU SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V PIVU

NEW TRENDS IN SAMPLE PREPARATION METHODS FOR THE DETERMINATION OF FLAVOUR COMPOUNDS IN BEER

TOMÁŠ HORÁK, JIŘÍ ČULÍK, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER, VÚPS a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2

Klíčová slova: pivo, senzoricky aktivní látky, extrakce na pevné fázi (SPE), mikroextrakce na pevné fázi (SPME), sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE)

Keywords: beer, flavour compounds solid-phase extraction (SPE), solid-phase mikroextraction (SPME), stir bar sorptive extraction (SBSE)

1 ÚVOD

Důležitou částí jakéhokoli analytického procesu je příprava vzorku, která zahrnuje v zásadě dva kroky: 1) extrakce sledovaných analytů, 2) jejich zakoncentrování, případně ještě 3) přečištění. Vzhledem k tomu, že v posledních letech stále stoupají požadavky na rychlost a spolehlivost analytických metod společně s ekonomickými aspekty, je nevyhnutelné nahradit původní pracné postupy, např. destilaci s vodní párou nebo extrakci v systému kapalina-kapalina, novými moderními metodami zvyšujícími produktivitu laboratoře.

Dominantním trendem konce minulého století byla v analytické chemii, podobně jako v jiných odvětvích, miniaturizace. Mezi typické příklady miniaturizace v přípravě vzorků patří tři techniky, které již našly nebo nacházejí zajímavé uplatnění při analýze senzoricky aktivních látek v pivu.

2 SPE (SOLID-PHASE EXTRACTION)

Metoda extrakce na pevné fázi (SPE) je extrakční technika, která s úspěchem nahrazuje klasickou extrakci v systému kapalina-kapalina. Je vhodná pro stanovení netěkavých a semivolatilních látek. Skládá se z pevné (sorbent) a kapalné fáze (vzorek). Princip spočívá v zachycení sledovaných analytů na speciálním sorbentu, který je umístěn mezi fritami v extrakční minikolonce [1].

Díky úspěšnému rozvoji této metody je dnes k dispozici asi 16 různých sorbentů s různou velikostí částic a s různým množstvím sorbentu v kolonce. Na trh je dodává mnoho výrobců, např. Merck, Supelco, J&W, Varian, Macherey-Nagel, Waters, pod různými názvy. Přehled nejčastěji používaných sorbentů je uveden v tab. 1.

K úspěšnému použití SPE je nutno bezpodmínečně dodržet a zároveň optimalizovat tyto čtyři kroky [1]:

1) **Kondicionace sorbentu.** Kondicionace znamená přípravu SPE kolonky na interakci se vzorkem. Většinou se provádí methanolem, vodou nebo pufrům a slouží k odstranění zbytkových organických rozpouštědel. Je to nezbytný krok pro reprodukovatelnou sorpci analytů!

2) **Aplikace vzorku.** Vzorek se pomocí vakua prosaje kolonkou. Sledované analyty se zachytí v úzké zóně na sorbentu. Část interferujících látek projde kolonkou přímo do odpadu, část se adsorbuje.

3) **Promytí.** Zachycené interferující látky jsou odstraněny z povrchu stacionární fáze promytím malým množstvím vody nebo pufru.

4) **Eluce.** V posledním kroku SPE dochází k selektivní desorpci sledovaných analytů pomocí vhodného rozpouštědla. Poté může následovat zakoncentrování nebo zředění získaného extraktu (eluátu) a vlastní, většinou chromatografická, analýza.

2.1 Výhody

– Rychlá příprava vzorku (v jednom

kroku je provedena extrakce analytů, zakoncentrování a přečištění),

– vysoká výtěžnost,

– odstranění nebezpečí vzniku emulze, která často vzniká u extrakce kapalina-kapalina,

– vysoká přesnost výsledků při použití komerčně dodávaných jednorázových kolonek,

– minimální spotřeba rozpouštědel (obvykle 2 x 5 ml vody a 1 – 3 ml organického rozpouštědla), čímž se šetří náklady na rozpouštědla a jejich následnou likvidaci,

– možnost automatizace celého procesu.

2.2 Nevýhody

– Omezená možnost zakoncentrování daná tím, že pro analýzy piva je možné prosát maximálně 20 – 25 ml vzorku, pak dochází k ucpání frity,

– ve srovnání s klasickou extrakcí kapalina-kapalina vyšší vstupní finanční náklady na pořízení zařízení pro prosávání kolonek.

2.3 Příklady použití při analýze piva

– Vyšší aromatické alkoholy (tyrosol, tryptofol, guajakol) [2],

– mastné kyseliny [3],

– furfural, hydroxymethylfurfural [4],

– iso-kyseliny [5],

– sacharin [6].

3 SPME (SOLID-PHASE MICROEXTRACTION)

Mikroextrakce na pevné fázi (SPME) je adsorpčně/desorpční technika vyvinutá Pawliszynem na University of Waterloo v 1. pol. 90. let a patentovaná firmou Supelco. Je vhodná především pro těkavé látky jako alternativa ke klasické headspace technice. Princip použití a způsob vzorkování byl už v Kvasném průmyslu popsán [7].

Vzhledem k tomu, že volbou vhodného typu polymeru a jeho tloušťky se dosáhne maximálních hodnot výtěžnosti a významného zlepšení sorpční selektivity, současná nabídka šesti různých druhů polymerů v různých tloušťkách (tab. 2) umožňuje selektivní stanovení široké škály látek.

Tab. 1 Přehled nejpoužívanějších sorbentů pro SPE metodu

Extrakce nepolárních a slabě polárních analytů z vodných vzorků		
reverzní fáze	C-18	(oktadecyl)
	C-8	(oktyl)
	C-4	(butyldimethyl)
	PH	(fenyl)
	HISEP	(hydrofobní sito pokryté hydrofilním povrchem)
Extrakce středně polárních a polárních analytů z nevodných vzorků		
normální fáze	CN	(kvanopropyl)
	NH ₂	(aminopropyl)
	DIOL	(diol)
Interakce založené na iontové přitažlivosti		
iontoměniče	SAX	(kvarterní amin, aniontový měnič)
	SCX	(alifatická sulfonová kyselina, kationtový měnič)
	WCX	(karboxylová kyselina, kationtový měnič)
Extrakce polárních analytů z nepolárních vzorků		
adsorbenty	Si	(silikagel)
	Florisil	(křemičitan hořečnatý)
	Alumina	(oxid hlinitý)
Extrakce částečně polárních až nepolárních analytů z polárních vzorků		
adsorbenty	CARB	(grafitový uhlík)
	CHROM P	(kopolymer styren/divinylbenzen)

Tab. 2 Přehled v současnosti dostupných SPME vláken

Typ polymeru	tloušťka fáze	Doporučené použití
Polydimethylsiloxan	100, 30, 7 µm	nepolární až středně polární středně těkavé látky
Carboxen/polydimethylsiloxan	85, 75 µm	stopové koncentrace těkavých látek
Divinylbenzen/polydimethylsiloxan	65 µm	polární těkavé látky
Carbowax/divinylbenzen	70, 65 µm	polární látky
Divinylbenzen/Carboxen/polydimethylsiloxan	50/30 µm	těkavé a středně těkavé látky
Polyakrylát	85 µm	polární středně těkavé látky

3.1 Výhody

- Vysoká citlivost umožňující provádět analýzy s minimálním množstvím vzorku a bez teplotního namáhání vzorku, které může mít za následek přeměnu prekurzorů, a tak ovlivnit výsledky stanovení,
- velmi jednoduchá manipulace,
- rychlost,
- minimální finanční nároky (držák cca 10 000 Kč, sada 3 vláken cca 8 500 Kč) ve srovnání s headspace dávkovačem,
- nulová spotřeba rozpouštědel,
- možnost automatizace, ale za cenu vysokých pořizovacích nákladů.

3.2 Nevýhody

- Křehkost vlákna, v případě zničení vlákna je nutné provést s novým vláknem novou kalibraci,
- u vláken, která se chovají jako adsorbenty, dochází k nežádoucí kompetitivní sorpci [8].

3.3 Příklady použití při analýze piva

- Vicinální diketony [9],
- nižší alkoholy a estery [10, 11],
- dimethylsulfid [12].

4 SBSE (STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION)

Sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE) je nejnovější technika, která spatřila světlo světa asi před dvěma lety. Otcem této metody je prof. Pat Sandra, resp. jeho tým, který se pokoušel o extrakci PCB z vody pomocí SPME. Dosáhli minimální výtěžnosti. Při pátrání, kam se přidané množství PCB podělo, zjistili, že 80 % bylo naadsorbováno na teflonové míchací tyčince. A odtud pochází geniální myšlenka: jestliže je tolik PCB zadržováno na „inertní“ míchací tyčince, což takhle navrhnout míchadlo s absorpční fází? A tak pro extrakci z kapalných vzorků bylo vyvinuto míchadlo pokryté vrstvou polymeru z polydimethylsiloxanu (PDMS).

SBSE se skládá z jádra z magnetického materiálu zataveného do skla. Sklo je deaktivováno a silanizováno, dále pokryto PDMS fází a nakonec promyto a termálně kondicionováno. Množství PDMS fáze se pohybuje od 10 do 350 mg podle velikosti míchadla [13].

Výrobu si vzala pod svá křídla firma GERSTEL a prodává SBSE pod názvem TWISTER.

Příprava vzorku je velmi jednoduchá. Do vzorku, většinou asi 10 ml, se přidá

míchadlo a nechá se míchat po dobu 30–120 min. Po extrakci se míchadlo buď eluuje ve vhodné mobilní fázi, která se poté nastříkne na HPLC kolonu, nebo se vloží do zařízení pro termální desorpci pro analýzu na plynovém chromatografu [13], [14].

4.1 Výhody

- Velmi jednoduché (nejjednodušší z uvedených metod) a rychlé,
- žádná spotřeba rozpouštědel při stanovení plynovou chromatografií, při stanovení kapalinovou chromatografií minimální množství (do 1 ml) rozpouštědel pro eluci míchadla,
- fáze PDMS selektivně zvyšuje extrakci nepolárních látek a selektivně eliminuje polární interference,
- díky většímu množství fáze nanesené na míchadlo má SBSE větší kapacitu než SPME a dosahuje extrémně nízkých detekčních limitů (až ppt),
- vynikající opakovatelnost mezi různými míchadly,
- vyextrahované analyty vydrží naadsorbované na míchadle několik dní,
- míchadla jsou použitelná opakovaně.

4.2 Nevýhody

- V současné době je dostupná míchací tyčinka pouze s fází PDMS, což omezuje kapacitu pro analýzy polárních látek,
- v případě plynově-chromatografické koncovky není možné vzhledem k velikosti míchadla provést desorpci analytů přímo v injektoru plynového chromatografu jako u SPME vlákna, ale je nutné použít speciální zařízení pro termální desorpci (popřípadě s kryofokusací), čímž značně vzrůstají nároky na pořizovací náklady,
- vzhledem k tomu, že tento postup je relativně nový, v počátcích, není v současné době k dispozici dostatek optimalizovaných a validovaných metod.

4.3 Příklady použití při analýze piva

- Analýza „sunstruck flavor“ (3-methylbut-2-ene-thiol) a dalších sirných látek (dimethylsulfid, methylthioacetát, dimethyldisulfid, 2-(2-furfuryl) thiazol pomocí termální desorpce a GC-MS/PFPD [15],
- analýza hořkých kyselin v pivu metodou HPLC [16].

5 ZÁVĚR

Uvedené příklady dokládají skutečnost, že spojení moderních technik se

současnou vyspělou analytickou instrumentací vede nejen k miniaturizaci, ale především k maximálnímu zjednodušení extrakce, a tedy zrychlení analýz, ke zvětšení kapacity zpracovávaných vzorků v laboratoři, při výrazně nižší nebo dokonce nulové spotřebě rozpouštědel a nižších nárocích na lidské zdroje. Přitom je však velmi důležité, že parametry těchto nových postupů ve srovnání s klasickými metodami zůstávají buď zachovány, anebo častěji dokonce ještě zlepšeny. A tak lze očekávat, že tyto techniky a jejich další vývoj napomohou k objasnění jedinečnosti tak skvělého nápoje, jakým pivo je.

Literatura

- [1] Literatura firmy Merck: ChromBook, 2. vydání, 2000, s. 27
- [2] 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
- [3] Kellner, V., Čejka, P., Čulík, J., Jurková, M., Horák, T.: Závěrečná zpráva VÚ 1.1/2000, VÚPS Praha, 2001, s. 18
- [4] 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
- [5] Donley, J. R.: Solid-Phase Extraction of Hop Acids from Beer or Wort for Subsequent Analysis. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50**, 1992, s. 89
- [6] 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
- [7] Procházková, D.: Mikroextrakce tuhou fází – SPME. *Kvasny Prum.* **45**, 1999, s. 321
- [8] Literatura firmy Supelco: SPME – mikroextrakce tuhou fází – příprava v jednom kroku, 2001, s. 6
- [9] Horák, T., Čulík, J., Čejka, P., Jurková, M., Kellner, V.: Stanovení vicinálních diketonů v pivu metodou SPME. *Kvasny Prum.* **47**, 2001, s. 316
- [10] 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
- [11] Mikulíková, R., Prýma, J., Havlová, P.: Vyuzítí SPME/GC/MS při stanovení senzoricky aktivních látek v pivu a sladu, poster na 3. Mezinárodní pivovarnické a sladovnické konferenci, Bratislava, 2002
- [12] Scarlata, C., J., Ebeler, S., E.: Head-space Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Dimethyl Sulfide in Beer. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1999, s. 2505
- [13] Sandra, P., Baltussen, E., David, F., Hoffmann, A.: A Novel Technique for Aqueous Samples: Stir Bar Sorptive Extraction. *Applikační list fy Gerstel*, 1/2000
- [14] Pfannkoch, E., Whitecavage, J., Hoffmann, A.: Stir Bar Sorptive Extraction:

Enhancing Selectivity of the PDMS Phase. Aplikční list fy Gerstel, 2/2001
[15] David, F., Sandra P., Hoffmann, A., Harms, D., Nietzsche, F.: Elucidation of the Hoppy Aroma in Beers by Stir Bar and Headspace Sorptive Extraction Followed by Thermal Desorption – CGC – MS/PFPD.

Aplikční list fy Gerstel, 4/2001
[16] 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. Aplikční list fy Gerstel, 5/2001

*Zpracováno na základě přednášky uvedené na 3. Mezinárodní pivovarnické a sladovnické konferenci v Bratislavě 10. – 12. 4. 2002
Do redakce došlo 6. 5. 2002*

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Nové trendy v přípravě vzorků pro analýzu senzoricky aktivních látek v pivo. Kvasný Prum. 48, 2002, č. 7–8, s. 186–188.

K nejpoužívanějším metodám pro přípravu vzorků piva k analýze senzoricky aktivních látek patří destilace s vodní párou nebo extrakce v systému kapalina-kapalina. Dominantním trendem posledních let v analytické chemii byla miniaturizace jako výsledek stále stoupajících požadavků na rychlost a spolehlivost analytických metod společně s ekonomickými aspekty. K typickým příkladům miniaturizace v přípravě vzorků patří extrakce na pevné fázi (SPE), mikroextrakce na pevné fázi (SPME) a nejnověji i sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE).

Na konkrétních příkladech jsou demonstrovány možnosti využití těchto nových způsobů přípravy vzorků pro analýzu senzoricky aktivních látek v pivo. U všech výše zmíněných metod jsou diskutovány jejich přednosti, ale i nedostatky.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: New Trends in Sample Preparation Methods for the Determination of Flavour Compounds in Beer. Kvasný Prum. 48, 2002, No. 7–8, pp. 186–188.

The most popular sample preparation methods for the determination of flavour compounds in beer are usually based on steam distillation or liquid-liquid extraction. During the past years, miniaturisation has become

a dominant trend in analytical chemistry as a result of increasing demands on faster and valid analysis together with economical aspects. Typical examples of miniaturisation in sample preparation techniques are solid-phase extraction (SPE), solid-phase microextraction (SPME) and the latest technique stir bar sorptive extraction (SBSE).

The possible using of these new sample preparation methods for the determination of flavour compounds in beers are demonstrated on the specific examples. The benefits and also disadvantages of all mentioned techniques are discussed.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Neue Trends in der Probenaufbereitung für die Analyse sensorisch aktiver Stoffe im Bier. Kvasný Prum. 48, 2002, Nr. 7–8, S. 186–188.

Zu den am meisten applizierten Methoden zur Aufbereitung von Bierproben zur Analyse der sensorisch aktiven Substanzen gehört die Destillation mit Wasserdampf oder Extraktion im System Flüssigkeit-Flüssigkeit. Der dominierende Trend der letzten Jahre in der analytischen Chemie war die Miniaturisierung als Ergebnis der stets wachsenden Anforderungen an die Geschwindigkeit und Verlässlichkeit der analytischen Methoden zusammen mit ökonomischen Aspekten. Zu den typischen Beispielen der Miniaturisierung in der Probenaufbereitung gehört die Extraktion auf fester Phase (SPE), Mikroextraktion auf fester Phase (SPME) und

neuestens auch die Sorptions-Extraktion auf dem Mixstäbchen (SBSE).

Auf konkreten Beispielen werden die Möglichkeiten der Anwendung dieser neuen Verfahren zur Aufbereitung der Proben für die Analyse sensorisch aktiver Substanzen im Bier demonstriert. Bei allen oben angeführten Methoden werden nicht nur ihre Vorteile, sondern auch die Nachteile diskutiert.

Горак, Т. – Чулик, Я. – Юркова, М. – Чейка, П. – Келлер, В.: Новые тренды в подготовке образца для анализа сенсорически активных веществ в пиве. Кvasný Prum. 48, 2002, No. 7–8, стр. 186–188.

Частейшим методом для подготовки образца для анализа сенсорически активных веществ в пиве является дистилляция водяным паром или экстрагирование в системе жидкость-жидкость. Главным трендом последнего времени в аналитической химии была миниатюризация как результат непрерывно нарастающих требований на скорость и надежность аналитических методов вместе с экономическими аспектами. Типичным примером миниатюризации в подготовке образца являются экстрагирование на твердую фазу (SPE), микроэкстрагирование на твердую фазу (SPME) и самое новейшее – сорбционное экстрагирование на мешильную палочку (SBSE).

На конкретных примерах указаны возможности использования этих новых способов подготовки образца для анализа сенсорически активных веществ в пиве. У всех указанных методов обсуждаются их преимущества и недостатки.

NEJISTOTA MĚŘENÍ – JEJÍ STANOVENÍ A INTERPRETACE

UNCERTAINTY IN MEASURING – ITS ASSESSMENT AND INTERPRETATION

JIRÍ ČULÍK, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER, MARIE JURKOVÁ, TOMÁŠ HORÁK, Pivovarský ústav Praha, VÚPS a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2

Klíčová slova: nejistota měření, validace metod, interpretace výsledků

Keywords: uncertainty, validation of methods, interpretation of results

Fenomémem, se kterým se budeme nyní a nepochybně i v budoucnu setkávat stále častěji, a který se již stal nedílnou součástí certifikátů vydávaných akreditovanými laboratořemi, je **údaj o nejistotě měření**. Zlí jazykové tvrdí, že vyjadřování nejistoty měření je božím trestem analytickým chemikům za zpupnost, s jakou často prezentovali své výsledky. Ve skutečnosti se však jedná o velmi praktický údaj, který velmi mnoho napoví o kvalitě výsledku a usnadní jeho další interpretaci.

1 ZÁKLADNÍ LEGISLATIVNÍ POŽADAVKY

Evropská norma EN ISO/IEC 17025

(Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří) [1], článek 5.4.6. **vyžaduje, že zkušební laboratoře musí používat postupy pro odhad nejistoty měření.** Při odhadování nejistoty musí být přitom za použití vhodných metod analýzy vzaty v úvahu všechny složky nejistoty, které jsou v dané situaci důležité.

Dále norma požaduje, aby zkušební protokoly obsahovaly:

- „údaj o nejistotě měření (kde je to potřebné)“ a současně v bodě 5.10.3.1. stanovuje, že
- „informace o nejistotě je v protokolech o zkouškách vyžadována, pokud je nutná platnost nebo použití vý-

sledků zkoušky, pokud to zákazník ve svých pokynech požaduje nebo má-li nejistota vliv na soulad s mezní hodnotou danou specifikací“.

Návody k určení nejistoty jsou uvedeny v řadě publikací [2–14].

Důvody pro stanovení hodnoty nejistoty jsou následující:

- Nejistota výsledku je kvantitativním znakem jeho jakosti.
- Vyjádření nejistoty výsledku dovoluje porovnání výsledků různých laboratoří (nebo v rámci jedné laboratoře), nebo jejich porovnání s referenčními hodnotami danými specifikacími nebo normami. Tato informace může