

Možnosti využití moderních metod přípravy vzorků pro plynově chromatografické analýzy při analýze nápojů a zejména piva. Část 3. – Mikroextrakce na pevné fázi a extrakce na míchací tyčince při analýze mastných kyselin v pivu

Possibilities of Utilization of Modern Sample Preparation Methods for Gas Chromatographic Analyses in Beverage and Namely Brewing Analytics. Part III. – Solid-Phase Microextraction and Stir Bar Sorptive Extraction in Fatty Acids Analysis in Beer

TOMÁŠ HORÁK, JIŘÍ ČULÍK, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER, JOSEF DVOŘÁK, DA-NUŠA HAŠKOVÁ

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. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Možnosti využití moderních metod přípravy vzorků pro plynově chromatografické analýzy při analýze nápojů a zejména piva. Část 3. – Mikroextrakce na pevné fázi a extrakce na míchací tyčince při analýze mastných kyselin v pivu. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 11–12, s. 418–422.

Mikroextrakce na pevné fázi (SPME) a sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE) patří mezi moderní a jednoduché postupy přípravy vzorků. Tato práce se zabývá využitím těchto technik pro stanovení mastných kyselin v pivu. Zatímco z SPME vlákna byly analyty uvolněny termální desorcí ve vyhřátém injektoru plynového chromatografu vybaveného křemennou kapilární kolonou ZB-WAX a plamenioni-začním detektorem, tak z míchací tyčinky byly vyextrahované látky uvolněny po zpětné extrakci do malého množství rozpouštědla a pak stanoveny na plynovém chromatografu. Kromě pracovních charakteristik obou postupů jsou uvedeny výhody a omezení těchto metod.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Possibilities of utilization of modern sample preparation methods for gas chromatographic analyses in beverage and namely brewing analytics. Part III. – Solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction in fatty acids analysis in beer. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 11–12, p. 418–422.

Solid-phase microextraction (SPME) and stir bar sorptive extraction (SBSE) are modern and simple sample preparation procedures. This study is focused on utilization of these techniques for the determination of fatty acids in beer. While from the coated fiber of the SPME analytes were thermally desorbed in the hot injector of the gas chromatograph equipped with a fused silica capillary column ZB-WAX and a flame ionisation detector thus in SBSE procedure analytes were desorbed by solvent back extraction and then analysed by gas chromatography. Working parameters and advantages together with limitations of both sample preparation methods are shown.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Möglichkeiten der Ausnutzung von modernen Methoden der Mustervorbereitung für Gas – chromatografische Analysen der Getränke insbesondere des Bieres. Teil III. – Mikroextraktion auf der festen Phase und Extraktion am Rührstab bei der Analyse der Fettsäuren im Bier. Kvasny Prum. 56, Nr. 11–12, S. 418–422.

Mikroextraktion auf der festen Phase (SPME) und Sorptionsextraktion am Rührstab (SBSE) gehören unter modernen und einfachen Mustervorbereitungsverfahren. Der Artikel befasst sich mit der Ausnutzung von diesen Technik zur Fettsäurenbestimmung im Bier. Während aus der SPME Faser durch die Thermal-desorption im geheizten Injektor des Gaschromatographs ausgestattet mit einer Siliziumkapillarkolonnen ZB – WAX und Flammenionisationsdetektor wurden die Elektrolyten freigesetzt, sind die extrahierte Stoffen aus dem Rührstab nach der Rückextraktion in die geringe Lösungs-menge freigesetzt worden und am Gaschromatograph festgestellt. Neben diesen Arbeitscharakteristiken von diesen zwei Verfahren wurden Vorteile und Beschränkungen dieser Methoden angeführt.

Klíčová slova: plynová chromatografie, mikroextrakce na pevné fázi (SPME), extrakce na míchací tyčince (SBSE), pivo, mastné kyseliny

Keywords: gas chromatography, solid-phase microextraction (SPME), stir bar sorptive extraction (SBSE), beer, fatty acids

1 ÚVOD

Mastné kyseliny jsou jednou ze skupin látek, které mohou ovlivnit senzoričké vlastnosti piva. Kromě toho mohou mít vliv na vitalitu kvasinek a také na stabilitu pивní pěny [1-3].

Nasycené mastné kyseliny (hexanová – dekanová kyselina) vznikají během kvašení [4]. Tyto kyseliny se vyznačují žluklým nebo kozím aroma. Senzorické příspěvky těchto kyselin jsou kumulativní. Proto se tedy tyto cizí příchutě mohou projevit i tehdy, když koncentrace žádné z těchto kyselin nepřesahuje prahovou hodnotu vnímání [5].

Obsah vyšších mastných kyselin jako je kyselina linolová a linolenová je významný z toho hlediska, že jejich oxidativní degradaci může dojít ke vzniku typické staré chuti [6].

Z těchto důvodů je nutné mít k dispozici vhodnou analytickou metodu umožňující rychlé stanovení mastných kyselin v pivu.

Mastné kyseliny se obvykle stanovují metodou plynové chromatografie. Při přípravě vzorků je možné namísto dříve používaných postupů založených na destilaci s vodní párou [7,8] nebo modernějších postupů využívajících extrakci na pevné fázi [9,10] s výhodou použít moderní metody jako je mikroextrakce na pevné fázi nebo sorpční extrakce na míchací tyčince.

1 INTRODUCTION

Fatty acids are part of group of compounds which have an impact on beer flavours. Except this they can influence the vitality of yeasts and also the foam stability of beer [1-3].

Straight-chain acids (hexanoic – decanoic acids) are formed during fermentation [4]. These medium-chain fatty acids are characterized by rancid or goaty flavour. The aroma contribution for these acids are additive. So from these reasons the off-flavours can occur even if none of the individual acids are present above threshold concentrations [5].

The contents of long-chain fatty acids such as linoleic and linolenic acids are important due to a typical ageing flavour can be formed by their oxidative degradation [6].

From this reasons quick and reliable methods for determination of free fatty acids in beer are necessary.

Free fatty acids are usually determined by gas chromatography. Instead of steam distillation procedures widely spread in the past [7,8] or modern solid phase extraction techniques [9,10] new modern methods as solid-phase microextraction or stir bar sorptive extraction can be advantageously used with convenience.

Princip a využití mikroextrakce na pevné fázi (SPME) v pivovarské analytice bylo popsáno v úvodním článku této série [11]. Teorie a možnosti praktického uplatnění sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE) jsou popsány v následující práci [12].

V této práci jsou na konkrétním příkladě stanovení volných mastných kyselin v pivu ukázány možnosti dvou mikroextrakčních technik – SPME v headspace uspořádání a SBSE s následnou zpětnou extrakcí do organického rozpouštědla. Jsou diskutovány výhody a nevýhody obou postupů a také porovnány pracovní charakteristiky výše zmíněných metod.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie, standardy

Ethanol, síran amonný – Lach – Ner, s. r. o., ČR; helium v kvalitě 5.0, vodík v kvalitě 5.0 a syntetický vzduch – Messer, ČR; ultračistá voda – Milli-RO 5plus firmy Millipore, USA.

Kyselina hexanová (kapronová), heptanová, oktanová (kaprylová), nonanová (pelargonová), dekanová (kaprinová), undekanová, dodekanová (laurová), tridekanová, tetradekanová (myristová), pentadekanová, hexadekanová (palmitová), heptadekanová, oktadekanová (stearová), cis-9-oktadekanová (olejová), cis-9,cis-12-oktadecadienová (linolová) a cis,cis,cis-6,9,12-oktadekatrienová (linoleová) a derivatizační činidlo BF₃ v 10% methanolu byly nakoupeny od Sigma-Aldrich, USA.

Vzorky piva plzeňského typu, vyrobené a balené v České republice, byly zakoupeny v běžné maloobchodní síti.

2.2 Podmínky plynové chromatografie

Vlastní stanovení probíhalo na plynovém chromatografu Chrompack CP 9001 vybaveném split/splitless injektorem a plamenoionizačním detektorem. K separaci 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 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. Nástřík byl prováděn ve splitless módu, split ventil byl otevřen po 0,5 min. Injektor i plamenoionizační detektor byly vyhřáty na teplotu 250 °C. Jako nosný plyn bylo využito helium v kvalitě 5.0, tlak na kolonu byl 150 kPa při 75 °C.

2.3 Headspace SPME

K extrakci bylo použito SPME vlákno s fází typu Carbowax-Divinylbenzen o tloušťce vrstvy 65 μ m. Vlákno bylo umístěno v manuálním držáku pro SPME vlákna a vše bylo zakoupeno od Supelco, USA.

Vzorky piva byly před analýzou vychlazeny na 4 °C. Všechny pokusy vedoucí k porovnání pracovních charakteristik byly prováděny na modelovém roztoku 5 % obj. ethanolu ve vodě. Před použitím bylo vlákno kondicionováno v injektoru plynového chromatografu při teplotě 250 °C po dobu 30 min. Extrakce byla založena na podmínkách popsaných Horákem a kol. [13].

Extrakce byla prováděna v headspace prostoru nad 4 ml vzorku obohaceného přísadkami kyseliny heptanové a undekanové, které byly využity jako vnitřní standardy (výsledná koncentrace každé kyseliny byla 1,3 mg/l), ve skleněné vialce o objemu 20 ml uzavřené septem krytým hliníkovou fólií. K podpoře extrakce bylo využito vysolení pomocí 1,0 g síranu amonného. Před zahájením SPME extrakce byla vialka se vzorkem intenzivně třepána po dobu 10 s. Extrakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 30 min.

Po extrakci bylo vlákno termálně desorbováno při teplotě 250 °C v nástříkovém prostoru plynového chromatografu po dobu 5 min. Injektor plynového chromatografu byl osazen linerem o vnitřním průměru 0,75 mm. Podmínky chromatografické separace jsou popsány v kap. 2.2.

2.3 Analýzy metodou SBSE

K extrakci byla použita míchací tyčinka o délce 10 mm a vnějším průměru 3,2 mm pokrytá polydimethylsiloxanovou (PDMS) vrstvou o tloušťce 0,5 mm. Tato míchací tyčinka pod komerčním názvem Twister byla zakoupena od Gerstel, Německo.

Twister byl před použitím kondicionován ve skleněné trubičce při teplotě 300 °C po dobu 60 min v atmosféře helia o průtoku 50 ml/min. Mastné kyseliny byly vyextrahovány vložení Twisteru do 10 ml

Principles and utilization of solid-phase microextraction (SPME) in brewing analytics has been described in the introductory article of this series [11]. The theory and possibilities of practical use of stir bar sorptive extraction (SBSE) has been given in last paper [12].

The determination of free fatty acids in beer was chosen in this paper as an example for demonstration of possibilities of two sample preparation microextraction techniques – SPME procedure in headspace mode and SBSE method followed by solvent back extraction. The advantages and limitations of both procedures are discussed and working parameters of above mentioned techniques are compared.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Reagents, standards

Ethanol, ammonium sulphate were purchased from Lach – Ner, s. r. o., ČR; helium quality 5.0, hydrogen quality 5.0 and synthesis air were purchased from Messer, ČR; ultrapure water was obtained from Milli-RO 5plus made by Millipore, USA.

Hexanoic (caproic), heptanoic, octanoic (caprylic), nonanoic (pelargonic), decanoic (capric), undecanoic, dodecanoic (lauric), tridecanoic, tetradecanoic (myristic), pentadecanoic, hexadecanoic (palmitic), heptadecanoic, octadecanoic (stearic), cis-9-octadecenoic (oleic), cis-9,cis-12-octadecadienoic (linoleic) and derivatization agent boron trifluoride – 10% in methanol were obtained from Sigma-Aldrich, USA.

Beer samples were fresh commercial lagers of the pilsner type, produced and bottled in the Czech Republic.

2.2 GC analysis

The GC analysis was carried out using a Chrompack CP 9001 gas chromatograph with split/splitless injector and a flame ionization detector. 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 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. The split-splitless injector was used, and the split vent was opened after 0.5 min. Temperatures of the injector and the flame ionisation detector were 250 °C. The carrier gas was helium quality 5.0 with a column head pressure of 150 kPa at 75 °C.

2.3 Headspace SPME

A manual SPME device and Carbowax-Divinylbenzene 65 μ m fibers were obtained from Supelco (USA).

Bottled commercial beers were kept cool (4 °C) until they were analysed. 5 % V/V ethanol solution was used for the experiments leading to comparisons of working parameters. Before use, the fiber was pre-conditioned in the GC injection port at 250 °C for 30 min. The extraction procedure was based on conditions described by Horák et al. [13].

Headspace SPME was applied for all analyses. The SPME fiber was exposed to the headspace above 4 ml of the sample with the addition of heptanoic and undecanoic acids as internal standards (final concentration: 1.3 mg/l of each acid) in a 20 ml glass vial with an aluminum-coated septum. The extraction was supported by salt out effect using 1.0 g of ammonium sulphate. The vial was vigorously shaken for 10 sec prior to the commencement of headspace SPME. The extraction was carried out at ambient temperature for 30 min.

After exposure the fiber was thermally desorbed at 250 °C in the injection port of gas chromatograph for 5 min. The injector was equipped with a 0.75 mm i.d. inlet liner. The gas chromatographic conditions are described in chapter 2.2.

2.4 SBSE analysis

The stir bar of a length of 10 mm and 3.2 mm o. d. with a 0.5 mm thickness of polydimethylsiloxane (PDMS) coating was used for the extraction. This stir bar commercial called Twister was supplied from Gerstel, Germany.

Before use, the Twister was conditioned in a glass tube at 300 °C for 60 min by passing helium through tube by flow rate of 50 ml/min. Fatty acids were extracted by placing 10 ml of sample spiked with internal standards (heptanoic, undecanoic, tridecanoic and pentadecanoic acids – 1.3 mg/l of each internal standard) in a 20 ml glass

vzorku obohaceného vnitřními standardy (kyseliny heptanová, undekanová, tridekanová a pentadekanová – výsledná koncentrace každé kyseliny byla 1,3 mg/l) v 20 ml skleněné vialce. Vialka byla uzavřena víčkem s PTFE/silikonovým septem. Extrakce probíhala za podmínek popsaných Horákem a kol. [14]. Twisterem bylo mícháno rychlostí 1000 ot/min po dobu 60 min za laboratorní teploty. Po skončení extrakce byl Twister pomocí pinzety vyndán ze vzorku, krátce opláchnut destilovanou vodou a osušen buničitou vatou. Pro zpětnou extrakci do rozpouštědla byl poté Twister vložen do insertu o objemu 350 μ l obsahujícím 200 μ l rozpouštědla dichlormethan:hexan v poměru 50:50. Insert byl vložen do vialky o objemu 2 ml a uzavřen PTFE/silikonovým septem a vložen na míchadlo při 1000 ot/min po dobu 40 min.

Ke stanovení nižších mastných kyselin ($C_6 - C_{12}$) byly 2 μ l výše získaného extraktu nastříknuty na kolonu plynového chromatografu a separace proběhla za podmínek popsaných v kap. 2.2.

Ke stanovení vyšších mastných kyselin bylo nutné získaný SBSE extrakt odpařit pod jemným proudem dusíku a derivatizovat methylací pomocí 0,1 ml BF_3 v 10% methanolu po dobu 20 min při teplotě 95 °C. Reakce byla zastavena přidáním 0,1 ml vody. Methylestery vyšších mastných kyselin byly extrahovány do 0,1 ml hexanu v ultrazvukové lázni po dobu 2 min [15]. Podmínky chromatografické separace byly stejné jako při stanovení nižších mastných kyselin.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro všechny stanovované volné mastné kyseliny byla proměřena kalibrační křivka v rozsahu koncentrací běžných pro pivo pšezněského typu (0,0015 mg/l až 8 mg/l) v 5 % obj. roztoku ethanolu. Jak vyplývá z tab. 1, lepší shody bylo dosaženo proložení jednotlivých kalibračních bodů kvadratickou křivkou namísto lineární regrese. Korelační koeficienty nižších mastných kyselin při použití lineární regrese ležely pro metodu SPME v rozmezí 0,9951 až 0,9983, pro SBSE extrakci v rozmezí 0,9919 až 0,9995. Při aplikaci kvadratické křivky rozsah hodnot korelačních koeficientů byl od 0,9956 do 0,9993 pro SPME postup, respektive od 0,9931 do 0,9993 pro SBSE metodu.

Vzhledem k tomu, že při použití metody SPME dochází v injektoru plynového chromatografu k termální desorpci všech analytů vyextrahovaných na SPME vlákno, nelze tímto postupem v rámci jednoho extrakčního kroku stanovit jak nižší, tak vyšší mastné kyseliny. Ke stanovení vyšších mastných kyselin by bylo nutné SPME extrakci opakovat. Následná derivatizace vyšších mastných kyselin přímo na vlákne je sice možná, ale použití, respektive manipulace s diazometanovým činidlem není úplně bezproblémové [16]. Z tohoto důvodu byly vyšší mastné kyseliny stanoveny jen SBSE postupem. Korelační koeficienty pro tyto kyseliny leží v intervalu 0,9981–0,9998 v případě lineární regrese a v rozmezí 0,9994–0,9997 při použití kvadratické křivky.

Z výsledků je patrné, že obě metody se v daném koncentračním rozmezí vyznačují vysokou linearitou.

Správnost metod byla ověřena pomocí výtěžnosti. Nejprve byl změřen přirozený obsah volných mastných kyselin v pěti reálných vzorcích piv. Poté byly tytéž vzorky piv obohaceny přidáním mastných kyselin na koncentrační hladině 2 mg/l každé látky. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2. Výtěžnost SPME metody se nacházela v rozmezí

vial, adding the Twister. The vial was crimped with a PTFE/silicone septum. Extraction procedure was based on conditions described by Horák et al. [14]. Twister was stirred with 1000 rpm for 60 min at ambient temperature. After extraction the Twister was removed with forceps, rinsed briefly in distilled water and dried with a lint-free tissue. For solvent back extraction the Twister was placed into a 350 μ l glass insert containing 200 μ l of the solvent mixture dichloromethane:hexane, 50:50. This insert was immersed into 2 ml vial closed by a PTFE/silicone septum and stirred at 1000 rpm for 40 min again.

For the determination of free medium-chain fatty acids ($C_6 - C_{12}$) 2 μ l of this extract was injected into the gas chromatographic column and the analytes were separated under conditions described in chapter 2.2.

For the determination of long-chain fatty acids this SBSE extract was evaporated under gently stream of nitrogen and then derivatized by methylation using 0.1 ml of BF_3 in 10% methanol during 20 min at 95 °C. Reaction was stopped by the addition of 0.1 ml of water. Methyl esters of fatty acids were extracted with 0.1 ml of hexane in an ultrasonic bath for 2 min [15]. The same gas chromatographic parameters were used as for the determination of medium-chain fatty acids.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Calibration curves have been measured for all determined fatty acids throughout a range covering the concentration usually found in beer of pilsner type (concentration 0.0015 to 8 mg/l for each compound) in 5 % v/v ethanol solution. As Tab. 1 shows a better fit to a quadratic curve than to a linear curve have been obtained. For all fatty acids the correlation coefficients to straight lines were from 0.9951 to 0.9983 for SPME methods and from 0.9919 to 0.9995 for SBSE procedure. For quadratic curves SMPE and SBSE fits ranged from 0.9956 to 0.9993 and from 0.9931 to 0.9993, respectively.

Inasmuch as all analytes extracted on SPME fiber are thermally desorbed in injector port of gas chromatograph, the long-chain fatty acids cannot be determined together with medium-chain fatty acids in one extraction step. For the determination of long-chain fatty acids another SPME extraction is necessary. Further on fiber derivatization of long-chain fatty acids is possible but using and manipulation of diazomethane methylation agent is not without problems [16]. From this reason long-chain fatty acids were determined only by SBSE procedure. Correlation coefficients to straight line for these analytes ranged from 0.9981 to 0.9998 and from 0.9994 to 0.9997 for quadratic regression.

These results show that both methods are characterized by high linearity in the examined concentration ranges.

The accuracy of the procedures was investigated by conducting recovery tests. At first the natural concentrations of the fatty acids in five different beers were determined. Then the same beers were spiked with each acid in concentration at level 2 mg/l. The results are summarized in Tab. 2. Recoveries ranged from 95 to 110 % by using SPME method. For SBSE technique recoveries of medium-chain fatty acids were much worse (57–89 %). The cause of this poor recovery probably consists in the fact that nonpolar polydimethylsiloxane stir bar coating was used for extraction of polar medium-chain fatty acids (especially caproic acid) and these polar compounds tend to stay be-

Tab. 1 Korelační koeficienty pro stanovení volných mastných kyselin v pivu pomocí metody SPME a SBSE / Correlation coefficients for the determination of free fatty acids in beer by SPME and SBSE

Látka / Compound	SPME korelační koeficienty / SPME correlation coefficients		SBSE korelační koeficienty / SBSE correlation coefficients	
	Lineární křivka / Linear curve	Kvadratická křivka / Quadratic curve	Lineární křivka / Linear curve	Kvadratická křivka / Quadratic curve
Kapronová kyselina / Caproic acid	0.9951	0.9956	0.9935	0.9931
Kaprylová kyselina / Caprylic acid	0.9976	0.9977	0.9919	0.9963
Kaprinová kyselina / Capric acid	0.9983	0.9993	0.9928	0.9956
Laurová kyselina / Lauric acid	0.9979	0.9983	0.9995	0.9993
Myristová kyselina / Myristic acid			0.9998	0.9994
Palmitová kyselina / Palmitic acid			0.9991	0.9995
Stearová kyselina / Stearic acid			0.9985	0.9994
Olejová kyselina / Oleic acid			0.9984	0.9995
Linolová kyselina / Linoleic acid			0.9981	0.9996
Linolenová kyselina / Linolenic acid			0.9987	0.9997

Tab. 2 Výťažnost a opakovatelnost SPME a SBSE postupů při stanovení volných mastných kyselin v pivu (CV – variační koeficient) / Recovery and repeatability of SPME and SBSE procedures for the determination of free fatty acids in beer (CV – variation coefficient)

Látka / Compound	SPME			SBSE		
	Obohacení / Spike (2 mg/l)		Opakovatelnost / Repeatability	Obohacení / Spike (2 mg/l)		Opakovatelnost / Repeatability
	Výtěžnost / Recovery (%)	CV (%)	CV (%)	Výtěžnost / Recovery (%)	CV (%)	CV (%)
Kapronová kyselina / Caproic acid	110	1.8	3.7	57	5.8	6.7
Kaprylová kyselina / Caprylic acid	103	4.3	2.3	84	5.2	6.2
Kaprinová kyselina / Capric acid	98	4.5	4.8	87	4.0	4.7
Laurová kyselina / Lauric acid	95	5.8	5.1	89	3.2	4.1
Myristová kyselina / Myristic acid				94	8.5	15.2
Palmitová kyselina / Palmitic acid				99	9.5	14.8
Stearová kyselina / Stearic acid				110	12.0	16.3
Olejevá kyselina / Oleic acid				97	10.3	15.0
Linolová kyselina / Linoleic acid				95	12.1	15.3
Linolenová kyselina / Linolenic acid				95	12.1	15.3

95–110 %. U metody SBSE byla výtěžnost nižších mastných kyselin podstatně horší (57–89 %). Příčina této malé výtěžnosti spočívá pravděpodobně v tom, že jako extrakční fáze je použita nepolární polydimethylsiloxanová vrstva Twisteru, do níž se tyto polární (zejména kyselina kapronová) nižší mastné kyseliny extrahují obtížně. Extrakci látky z kapalně fáze do extrakční fáze je možné, i když ne úplně přesně, popsat pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol-voda ($K_{o/w}$) [17,18]. Hodnoty rozdělovacích koeficientů oktanol-voda pro stanovené látky jsou uvedeny v tab. 3. Podle práce Baltussen a kol. [19] budou Twisterem kvantitativně vyextrahovány látky s $K_{o/w}$ větším než 500 (odpovídá $\log K_{o/w} > 2,70$). Hodnota $\log K_{o/w}$ pro kyselinu kapronovou je pouze 1,88, což naznačuje, že tato látka se bude obtížně extrahovat. Experimentálně dosažená výtěžnost 57 % pro tuto kyselinu tento teoretický předpoklad potvrzuje. Výtěžnosti vyšších mastných kyselin, jejichž $\log K_{o/w} > 6,10$, dosahovaly podle očekávání vysokých hodnot 94–110 %.

Opakovatelnost metod byla zjištěna pětinásobným opakováním celého postupu během jednoho dne na jednom a téměř vzorku piva. Z výsledků uvedených v tab. 2 je vidět, že pro kyseliny kapronovou a kaprylovou byla hodnota relativní směrodatné odchylky (RSD) zhruba dvakrát horší při použití metody SBSE než u SPME postupu. To je zřejmě způsobeno jejich horší výtěžností. Naproti tomu u dalších homologických kyselin (kaprinová a laurová) jsou hodnoty RSD u obou postupů srovnatelné. Výrazně vyšší hodnoty opakovatelnosti (14,8–16,3 %) pro vyšší mastné kyseliny (myristovou – linolenovou) lze vysvětlit tím, že k jejich stanovení jsou ještě zapotřebí další dva kroky – derivatizace a následná extrakce methylesterů do hexanu. Každý z těchto kroků přispívá svým dílem k výsledné hodnotě RSD. Nicméně i tyto hodnoty RSD jsou plně akceptovatelné.

4 ZÁVĚR

Z výše uvedených výsledků je vidět, že pro stanovení mastných kyselin v pivu lze použít oba moderní postupy přípravy vzorků – SPME a SBSE. Obě techniky se vyznačují jednoduchostí, výbornou opakovatelností a žádnou nebo minimální spotřebou rozpouštědel.

Pro stanovení nižších mastných kyselin je vhodnější metoda SPME s vláknem potaženým fází typu Carbowax-Divinylbenzen. Pro tyto látky dosahuje toto SPME vláknem lepší výtěžnosti a opakovatelnosti než nepolární fáze Twisteru. Další nezanedbatelnou výhodou SPME postupu je jeho výrazně nižší časová náročnost (35 min oproti 160 min při použití SBSE metody). Na druhé straně značná nevýhoda spočívá v ne-

hind the aqueous phase instead partitioning into the nonpolar polydimethylsiloxane phase. The extraction of compounds from the aqueous phase into the extraction medium can be described, although not fully corrected, by the partition coefficient octanol-water ($K_{o/w}$) [17,18]. The values of partition coefficients octanol-water for the compounds of interest are shown in Tab. 3. Baltussen et al. [19] exposed that analytes with $K_{o/w}$ greater than 500 (correspond to $\log K_{o/w} > 2,70$) will be quantitatively extracted by Twister. The value of $\log K_{o/w}$ for caproic acid reaches only 1.88 and indicates that this compound could be hardly extracted. This hypothesis is experimentally confirmed by measured recovery which reached value only 57 % for this compound. Recoveries of long-chain fatty acids which $\log K_{o/w} > 6.10$ achieved as supposed high-level values 94 – 110 %.

The repeatability of the methods was examined by repeating both procedures five times during the same day on the same beer sample. From the Tab. 2 is clear that relative standard deviation (RSD) for caproic and caprylic acids reached considerably worse value by using SBSE in comparison with SPME procedure. This is evidently caused by poorer recoveries of those compounds. On the other hand RSD of other homologous acids (capric and lauric) are similar in both sample preparation procedures. Significantly higher values of repeatability (14.8–16.3 %) for long-chain fatty acids (myristic – linolenic) could be explained by the fact that for the determination of these compounds two another steps are necessary – derivatization followed by methylesters extraction into hexane. Each of these partial steps contributes to the final RSD value. But it must be said that these RSD values are fully acceptable.

4 CONCLUSIONS

These results indicated that both modern sample preparation techniques – SPME and SBSE – could be used for the determination of fatty acids in beer. Both procedures are characterized by simplicity, very good repeatability and no or minimal solvent consumption.

SPME procedure with fibre coated with Carbowax-Divinylbenzene is better for the determination of medium-chain fatty acids. For these compounds this SPME fibre reached better recoveries and repeatabilities than nonpolar Twister phase. Another indispensable advantageous of SPME process is much low time consumption (35 min against 160 min in SBSE method). On the other hand a great disadvantage is impossibility of determination also long-chain fatty acids after the same common extraction step.

The advantage of SBSE is based on the fact that stir bar is

Tab. 3 Hodnoty rozdělovacích koeficientů oktanol-voda pro nižší a vyšší mastné kyseliny / Values of partitioning coefficients for medium and long-chain fatty acids

Látka / Compound	$\log K_{o/w}$
Kapronová kyselina / Caproic acid	1.88
Kaprylová kyselina / Caprylic acid	3.05
Kaprinová kyselina / Capric acid	4.09
Laurová kyselina / Lauric acid	4.60
Myristová kyselina / Myristic acid	6.10
Palmitová kyselina / Palmitic acid	7.17
Stearová kyselina / Stearic acid	8.23
Olejevá kyselina / Oleic acid	7.73
Linolová kyselina / Linoleic acid	7.05
Linolenová kyselina / Linolenic acid	6.46

možnosti současného stanovení vyšších mastných kyselin v rámci jednoho extrakčního kroku.

Výhoda sorpční extrakce na míchací tyčince se zakládá na tom, že míchací tyčinka je podstatně robustnější než křehké SPME vlákno. Zacházení s SBSE je rovněž jednoduché, ale proces extrakce a následné reextrakce zabere podstatně více času.

Ačkoli obě techniky představují zaměnitelné alternativy, v případě požadavku na stanovení pouze nižších mastných kyselin v pivu je metoda SPME výhodnější. Pokud je nutno stanovit obsah jak nižších, tak vyšších mastných kyselin, bez problémů je možno využít techniku SBSE.

Poděkování

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

Autoři si dále velmi vážící pomoci a rad kolegů, kteří tak přispěli k vytvoření skvělé atmosféry v laboratoři.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 18. 5. 2010

Přijato k publikování / Accepted for publication: 7. 9. 2010

LITERATURA / REFERENCES

- Chen, E. C.-H.: Utilization of wort fatty acids by yeast during fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **38**, 1980, 148–153.
- Drost, B. W., van Eerde, P., Hoekstra, S. F., Strating, J. Fatty acids and staling of beer. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Estoril, Elsevier Scientific: Amsterdam, The Netherlands, 1971*, 451–458.
- Clapperton, J. F.: Caprylic flavour as a feature of beer flavour. *J. Inst. Brew.* **84**, 1978, 90–92.
- Clarke, B. J., Davine, D. F., Hawthorne, D. B., Kavanagh, T. E., Moulder, P. J.: Factors affecting the formation of medium chain fatty acids during fermentation. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **18**, 1981, 188–194.
- Clapperton, J. F.: Fatty acids contributing to caprylic flavour in beer. The use of profile and threshold data in flavour reseach. *J. Inst. Brew.* **84**, 1978, 107–112.
- Dominguez, X. A.; Canales, A. M.: Oxidation of beer. A rational mechanism for the degradation of unsaturated fatty acids and the formation of unsaturated aldehydes. *Brewers Digest* **49**, 1974, 40–47.
- 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.
- Van der Meersche, J., Devreux, A., Masschelein, C. A.: Formation des acides volatils dans la maturation de la bière. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Berlin (West), EBC: Zoeterwoude, The Netherlands, 1979*, 787–800.
- Hage, T. in: Free fatty acids in beer – the use of a bonded-phase column in the extraction of free fatty acids for gas chromatographic assay. *Proceedings of the Fourth European Conference on Food Chemistry, Loen, Volume 1, Norwegian Food Research Institute, Ås, Norway, 1987*, 106–110.
- Battistutta, F., Buiatti, S., Zenarola, C., Zironi, R.: Rapid analysis of free medium-chain fatty acids and related ethyl esters in beer using SPE and HRGC. *J. High Resolut. Chromatogr.* **17**, 1994, 662–664.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D.: Možnosti využití moderních metod přípravy vzorků pro plynově chromatografické analýzy při analýze nápojů a zejména piva. Část I. – Literární přehled. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, 358–366.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D.: Možnosti využití moderních metod přípravy vzorků pro plynově chromatografické analýzy při analýze nápojů a zejména piva. Část II. – Extrakce na míchací tyčince. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, 390–395.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V.: Stanovení mastných kyselin v pivu technikou SPME. *Kvasny Prum.* **51**, 2005, 374–377.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V.: Determination of free medium-chain fatty acids in beer by stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A* **1196–1197**, 2008, 96–99.
- Horák, T., Čulík, J., Čejka, P., Jurková, M., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D.: Analysis of free fatty acids in beer: Comparison of solid-phase extraction, solid-phase microextraction, and stir bar sorptive extraction. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2009, 11081–11085.
- Pan, L., Adams, M., Pawliszyn, J.: Determination of fatty acids using solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **67**, 1995, 4396–4403.
- Lancas, F. M., Queiroz, M. E. C., Grossi, P., Olivares, I. R. B.: Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. *J. Sep. Sci.* **32**, 2009, 813–824.
- David, F., Tienpont, B., Sandra, P.: Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. *LCGC North Am.* **21**, 2003, 108–118.
- 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 Sep.* **11**, 1999, 737–747.

Nové knihy z produkce VÚPS, a. s.

Zbýněk Likovský: Držitelé, provozovatelé a vedoucí pivovarů českých zemí 1869–1989

Vyšla v září 2010

Cena: 440 Kč (včetně DPH)

Pivovarský kalendář 2011

Vyšel 22. listopadu 2010

Cena: 160 Kč (včetně DPH)

Chmelařská ročenka 2011

Vyjde 25. ledna 2011

Cena: 160 Kč (včetně DPH)

Objednávky: boudova@beerresearch.cz