VYUŽITÍ EXTRAKCE NA MÍCHACÍ TYČINCE PŘI ANALÝZE NĚKTERÝCH SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V PIVU A JEJÍ POROVNÁNÍ SE ZAVEDENÝMI POSTUPY

TOMÁŠ HORÁK, JÍŘÍ ČULÍK, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, JOSEF DVOŘÁK, DANUŠA HAŠKOVÁ a VLADIMÍR KELLNER

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2
horak@beerresearch.cz

Došlo 15.3.10, přepracováno 24.6.10, přijato 16.8.10.

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

Úvod

Pivo obsahuje velké množství senzoricky aktivních látek. Jedná se o těkavé i netěkavé látky, kterých bylo identifikováno přes 800. Překročení prahové hodnoty vnímání jedné nebo více látek běžně se vyskytujících pod prahovou hodnotou se může projevit jako senzorická závada[1]. Ale i příliš nízká koncentrace některé ze základních chuťových složek nebo úplná absence této látky může negativně ovlivňovat výslednou chuť a vůni piva[2]. Je pochopitelné, že celkový senzorický profil piva se kromě ceny a obalu rozhodujícím způsobem podílí na úspěchu piva na trhu. Důležitá je také stálost tohoto profilu, kdy zákazník nesmí být zklamán koupí téhož výrobku po určité době nebo během garantované trvanlivosti[3].

Z těchto důvodů se věnuje pozornost analytickému stanovení obsahu některých významných skupin senzoricky 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 aroma piva asi jednou pětinou[4]. Další skupinu tvoří vicinální diketony – butan-2,3-dion (diacetyl) a pentan-2,3-dion. Při překročení prahové koncentrace smyslového vnímání diacetylu dochází k nežádoucím změnám aroma piva, které bývá označováno jako máselné, po tvarohu nebo po syrovátce[5]. Pentan-2,3-dion je podobný diacetylu, ale jeho prahová koncentrace je vyšší, a její překročení má za následek medové aroma[6].

K analytickému stanovení těchto senzoricky aktivních látek se používají hlavně metody plynové chromatografie. K přípravě vzorku se využívají klasické postupy jako destilace s vodní parou následovaná extrakcí v systému kapalina-kapalina, "headspace" technika nebo extrakce na pevné fázi[7–10].

Vhodnou alternativou k těmto postupům je mikroextrakce na pevné fázi (Solid Phase Microextraction – SPME)[11] nebo sorpční extrakce na míchací tyčince (Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE). Tuto techniku vyvinul Baltussen a spol.[12]. Tento postup je založen na stejných principech jako mikroextrakce na pevné fázi, ale tím, že je použito podstatně větší množství polydimethylsiloxanové fáze (50–300 μl), dochází k výrazně většímu obohacení organických sloučenin z extrahované matrice a v důsledku toho vzrůstá citlivost 100 až 1000krát. Další výhoda SBSE spočívá v tom, že se jedná o magnetickou tyčinku zatavenou do skla, která je po deaktivaci pokryta polydimethylsiloxanovou fází, a tudíž celá extrakční tyčinka je mnohem méně náchylná k mechanickému poškození ve srovnání s křehkým křemenným vláknem použitým u SPME. Na druhou stranu SBSE tyčinka dodávaná firmou Gerstel pod názvem Twister je dostupná pouze s polydimethylsiloxanovou fází a je tudíž vhodná spíše pro izolaci méně polárních látek[13].

Vzhledem k vysokému zakoncentrování analytů na tyčince Twister je možné kromě tepelné desorpce analytů využít i zpětnou extrakci sledovaných látek z polydimethylsiloxanové fáze tyčinky Twister do malého množství organického rozpouštědla. Sníží se tím sice citlivost stanovení, ale pokud se sledované látky nevyskytují ve stopových koncentracích, lze je určit s dostatečnou přesností. Navíc při tomto způsobu není zapotřebí vysoké investice do termálního desorbéru[14].

Detailní popis principu a širokého aplikačního využití této techniky lze nalézt v přehledech[15,16].

Předložená práce se zabývá porovnáním SBSE postupu a konvenčních extrakčních metod použitých pro extrakci některých esterů a vicinálních diketonů z piva.

Experimentální část

Reagencie

Ethanol – Lach-Ner (Neratovice, ČR); methanol, hexan, dichlormethan, síran amonný – Merck (Darmstadt, Německo); helium v kvalitě 5.0, dusík v kvalitě ECD, vodík v kvalitě 5.0 a syntetický vzduch – Messer Technogas (Praha, ČR); ultračistá voda ze zařízení Milli-RO 5plus – Millipore (Billerica, USA).

Isoamyl-acetát, ethyl-kapronát, ethyl-kaprylát, fenyl-acetát, ethyl-kaprinát, fenylethyl-acetát, ethyl-laurát, ethyl-myristát, ethyl-palmitát, butan-2,3-dion, pentan-2,3-dion, hexan-2,3-dion – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

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

Aparatura

Tyčinka Twister o délce 10 mm o vnějším průměru 3,2 mm a tloušťce polydimethylsiloxanové fáze 0,5 mm byla zakoupena od firmy Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Německo). 20 ml "headspace" nádobky, šroubovací nádobky o objemu 2 ml se skleněnými inserty o objemu 350 µl, PTFE silikonová septa, víčka, uzavírací a otevírací kleště byly pořízeny od firmy CRS (Louisville, USA). Dále bylo použito magnetické míchadlo RH3 (MLW, Polsko), pinzeta (Chirana, ČR), destilační přístroj Büchi 323, (Büchi, Švýcarsko) a laboratorní třepačka WL–1, (WL, Polsko).

Stanovení esterů probíhalo na plynovém chromatografu CP 9001(Chrompack, Nizozemí), který byl opatřen automatickým dávkovačem vzorků ASG 40 (Labio, ČR). Vicinální diketony byly stanoveny na plynovém chromatografu HRGC 5300 (Carlo Erba, Itálie), který byl pro headspace analýzu opatřen dávkovačem HSS 3950 (Dani, Itálie).

Pracovní postupy

Stanovení některých esterů
Destilace s vodní parou s následnou extrakcí kapalina-kapalina

Metoda je založena na práci Dostálka a spol.[7]. Vzorek o objemu 50 ml okyselený na pH 2 se předestiloval s vodní parou na destilačním přístroji Büchi. Destilát se jímal do baňky s 10 ml extrakční směsí hexan:dichlormethan (1:1) ponořené v kádince s ledovou tříští. Analyty byly vytřepány do směsi rozpouštědel hexan:dichlormethan (1:1) na třepačce WL–1 při intenzitě 10 kmitů/min po dobu 1 h. Po skončení třepání a rozdělení fází byl extrakt zahuštěn na objem 1 ml pod jemným proudem dusíku.

SBSE extrakce

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^{-1}. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl Twister připraven pro další extrakci.

Podmínky extrakce vycházely z práce Horáka a spol.[17]. Do nádobky o objemu 20 ml bylo přidáno 10 ml vzorku. Extrakce byla prováděna mícháním tyčinky Twister při 1200 ot/min po dobu 60 min za laboratorní teploty. Zpětná extrakce z tyčinky Twister byla provedena jeho mícháním při 1200 ot/min v 200 µl směsi hexan:dichlormethan (1:1) po dobu 40 min.

Plynová chromatografie

K separaci analytů byla použita 30 m dlouhá kapilární kolona ZB-WAX firmy Phenomenex s vnitřním průměrem 0,32 mm a tloušťkou filmu 0,25 µm. 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. Dělící 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 s tlakem na kolonu 150 kPa při teplotě 80 °C.

Stanovení vicinálních diketonů
"Headspace" metoda

Analýza proběhla podle postupu European Brewery Convention (EBC)[8]. Do nádobky o objemu 20 ml bylo naváženo 3,5 g síranu amonného a přidáno 10 ml vzorku a 50 µl 2,3-hexandionu (vnitřní standard). V headspace dávkovači byla nádobka se vzorkem temperována při teplotě 35 °C po dobu 40 min. Poté byl 1 ml parní fáze nastříknut na chromatografickou kolonu.

SBSE extrakce

Před použitím byla tyčinka Twister kondicionován způsobem popsaným v odstavci "SBSE extrakce".

Do nádobky o objemu 20 ml byly naváženy 2 g chloridu sodného a přidáno 10 ml vzorku obsahující hexan-2,3-dion jako vnitřní standard (výsledná koncentrace 40 µg l^{-1}). Vzorek byl míchán s tyčinkou Twister při 800 ot/min za laboratorní teploty po dobu 20 min. Zpětná extrakce analytů byla provedena mícháním tyčinkou Twister v 200 µl hexanu při 800 ot/min během 20 min při laboratorní teplotě[18].

Plynová chromatografie

K separaci analytů byla použita 60 m dlouhá kapilární kolona J&W Scientific DB 624 s vnitřním průměrem 0,32 mm a tloušťkou filmu 1,8 µm. Kolona byla temperována na teplotu 75 °C po dobu 10 min, poté následoval teplotní gradient 5 °C/min do teploty 120 °C. Při této teplotě kolona zůstala po dobu 1 min. Injektor byl vyhříván na teplotu 220 °C, detektor elektronového záchytu na 180 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium v kvalitě 5,0, tlak na koloně byl 150 kPa při teplotě 75 °C. Dusík v kvalitě ECD byl použit jako přídavný plyn k oplachu elektrody ECD.

Výsledky a diskuse

Pro porovnání metod byly proměřeny pracovní charakteristiky stanovení jako linearita, výtěžnost a opakovatelnost. Výsledky pro stanovení esterů jsou uvedeny v tab. I, pro stanovení vicinálních diketonů v tab. II.

Stanovení některých esterů

Pro všechny stanovované estery byly proměřeny devítibodové kalibrační křivky v rozsahu koncentrací 0,015 až 30 mg l^{-1} v 5% roztoku ethanolu. Při použití lineární regrese ležely korelační koeficienty v rozmezí 0,9987 až 0,9998 pro destilační metodu a v rozsahu 0,9988–0,9999 v případě metody SBSE. Obě metody se tedy vyznačují vysokou linearitou.

Správnost metody byla ověřena pomocí výtěžnosti. Nejprve byl změřen přirozený obsah stanovovaných esterů

Tabulka I
Pracovní charakteristiky (linearita, výtěžnost a opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka) stanovení vybraných esterů piva pomocí destilace s vodní parou následované extrakcí kapalina-kapalina a pomocí metody SBSE

Látka	Destilace s vodní parou a extrakce kapalina-kapalina			SBSE		
	korelační koeficient	výtěžnost [%]	opakovatelnost [%]	korelační koeficient	výtěžnost [%]	opakovatelnost [%]
Isoamyl-acetát	0,9995	80	10	0,9992	107	5,2
Ethyl-kapronát	0,9992	74	12	0,9988	104	3,1
Ethyl-kaprylát	0,9996	71	13	0,9994	85	2,1
Fenyl-acetát	0,9998	82	11	0,9999	102	6,7
Ethyl-kaprinát	0,9997	70	12	0,9996	78	7,3
Fenylethyl-acetát	0,9987	89	12	0,9991	94	7,3
Ethyl-laurát	0,9991	75	14	0,9988	81	5,8
Ethyl-myristát	0,9995	79	12	0,9998	83	6,2
Ethyl-palmitát	0,9991	73	12	0,9995	84	6,1

Tabulka II
Pracovní charakteristiky (linearita, výtěžnost a opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka) stanovení vicinálních diketonů v pivu pomocí headspace metody a metody SBSE

Látka	Headspace metoda			SBSE		
	korelační koeficient	výtěžnost [%]	opakovatelnost [%]	korelační koeficient	výtěžnost [%]	opakovatelnost [%]
Diacetyl	0,9984	95	9,9	0,9980	46	20
Pentan-2,3-dion	0,9970	98	4,8	0,9965	86	5,6

v pěti komerčních vzorcích piv. Poté byly tytéž vzorky piv obohaceny přídavkem sledovaných analytů na koncentrační hladině 7,5 mg l^{-1}. Výtěžnosti se pohybovaly v rozmezí 70–89 % pro destilační postup a v rozsahu 78–107 % pro techniku SBSE.

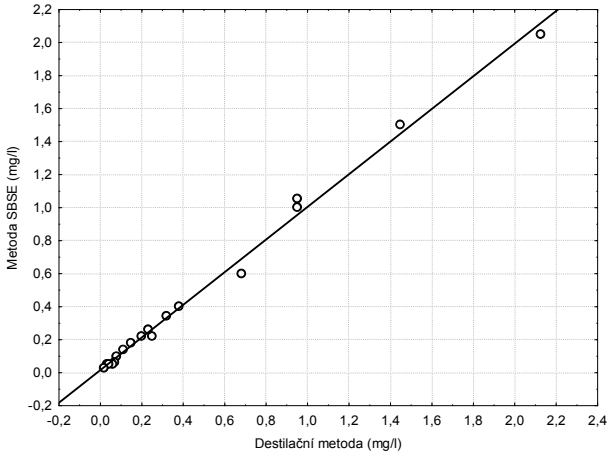
Opakovatelnost metody byla zjištěna opakovanou analýzou jednoho a téhož vzorku piva (pětkrát během jednoho dne). Relativní směrodatné odchylky se nacházely v intervalu 10–14 % u destilační metody resp. 2,1–7,3 % u SBSE postupu.

Destilační metoda se vyznačuje horší výtěžností a zejména opakovatelností. Tato skutečnost zřejmě souvisí s tím, že při tomto postupu je zapotřebí tří kroků – destilace, extrakce do rozpouštědla a zakoncentrování odfoukáváním – na rozdíl od dvou kroků u SBSE – extrakce a reextrakce do rozpouštědla.

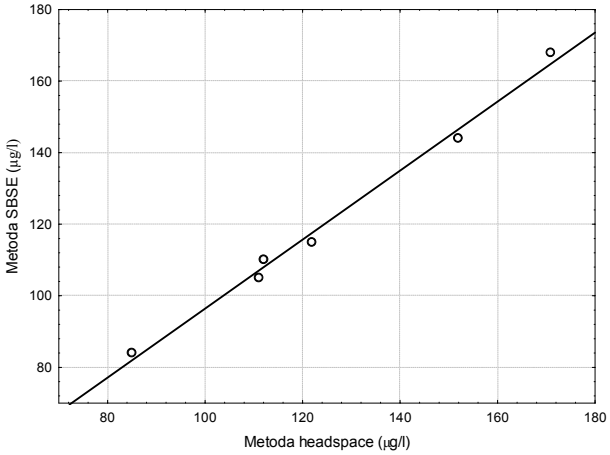
Obě metody byly použity ke stanovení obsahu výše uvedených esterů ve třech různých vzorcích piv plzeňského typu. Každý vzorek byl analyzován třikrát. Korelace výsledků je znázorněna na obr. 1. Korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,9973.

Stanovení vicinálních diketonů

Pro vicinální diketony byly proměřeny pětibodové kalibrační křivky v koncentračním rozsahu 0,010 až 0,400 mg l^{-1} v 5% roztoku ethanolu. Při použití lineární regrese ležely korelační koeficienty v rozmezí 0,9984–0,9970 pro headspace metodu a v rozsahu 0,9980–0,9965 v případě metody SBSE. Z hodnot korelačních koeficientů vyplývá, že metody jsou srovnatelné. Diacetyl není však možné technikou SBSE měřit v nižších koncentracích (<0,100 mg l^{-1}). Tuto podstatně nižší citlivost je možné vysvětlit takto: extrakce látky do polydimethylsiloxanové fáze nanesené na míchací tyčince lze charakterizovat pomocí distribuce analytu mezi oktanolem a vodou popsanou pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol-voda ($K_{o/w}$)[19,20]. Hodnota log $K_{o/w}$ pro pentan-2,3-dion činí –0,85, zatímco pro diacetyl tato veličina nabývá hodnoty –1,34. Menší citli-



Obr. 1. **Korelace výsledků stanovení vybraných esterů v pivu destilační metodou a technikou SBSE**



Obr. 2. **Korelace výsledků stanovení vicinálních diketonů v pivu headspace metodou a technikou SBSE**

vost, horší výtěžnost a opakovatelnost (viz níže) SBSE postupu pro stanovení diacetylu je pravděpodobně dána tím, že v důsledku jeho menší molekulové hmotnosti a vyšší polarity má tato látka větší tendenci zůstat spíše ve vodní fázi než přejít do nepolární polydimethylsiloxanové vrstvy.

Správnost metody byla ověřena pomocí výtěžnosti. Po změření přirozeného obsahu vicinálních diketonů v pěti komerčních vzorcích piv byly tytéž vzorky obohaceny přídavkem sledovaných analytů na koncentrační hladině 0,150 mg l^{-1}. Výtěžnosti se pohybovaly v rozmezí 95 až 98 % pro headspace metodu a v rozsahu 46–86 % pro techniku SBSE.

Opakovatelnost metody byla zjištěna opakovanou analýzou jednoho a téhož vzorku piva (pětkrát během jednoho dne). Relativní směrodatné odchylky se nacházely v intervalu 9,9–4,8 % u headspace metody resp. 20–5,6 % u SBSE postupu.

Ke srovnání metod byly oběma postupy změřeny vicinální diketony ve třech různých vzorcích piv plzeňského typu. Každý vzorek byl analyzován třikrát. Ke kvantitativnímu vyhodnocení bylo použito metody vnitřního standardu (hexan-2,3-dion). Na obr. 2 je ilustrována shoda výsledků s dosaženým korelačním koeficientem 0,9961.

Závěr

Postup extrakce na sorpční tyčince s následnou extrakcí do rozpouštědla se dá uplatnit pro analýzu senzoricky aktivních látek v pivu. Při stanovení esterů je tento postup výhodnější než destilace s vodní parou a následující extrakcí do rozpouštědla jednak z hlediska pracovních charakteristik (lepší výtěžnost a opakovatelnost), jednak vzhledem k jednoduššímu provedení. Pro určení obsahu vicinálních diketonů je jednoznačně lepší headspace technika, a to nejen pro své pracovní charakteristiky umožňující stanovit koncentrace diacetylu pod hladinou 0,100 mg l^{-1}, ale tento postup je také jednodušší a rychlejší. Na druhé straně, pokud není k dispozici headspace dávkovač, může metoda SBSE posloužit jako levná alternativa za předpokladu, že vzorky obsahují vyšší koncentrace diacetylu.

Tato práce je součástí Výzkumného záměru MSM 6019369701.

LITERATURA

1. Meilgaard M. C.: Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. *12*, 107 (1975).
2. Čejka P.: Kvasný Prům. *43*, 167 (1997).
3. Dienstbier M., Jandová L., Sladký P., Dostálek P.: Chem. Listy *104*, 86 (2010).
4. Arkima V., Jounela-Eriksson P.: *17th EBC Congress, Berlin*, *1979*, Proceedings of the European Brewery Convention Congress, str. 43.
5. Shimwell J. L., Kirkpatrick W. F.: J. Inst. Brew. *45*, 137 (1939).
6. Fix G.: Brew. Tech. *1(2)*, 3 (1993).
7. Dostálek P., Kwaczek P., Řezáč J., Čepička J.: Kvasný Prům. *41*, 302 (1995).
8. European Brewery Convention. Analytica EBC, 5th update: Method 9.24.2 – Vicinal diketones in beer: gas chromatographic method. Fachverlag Hans Carl, Nűrnberg 2005.
9. Alvarez P., Malcorps P., Sa Almeida A., Ferreira A., Meyer A. M., Dufour J. P.: J. Am. Soc. Brew. Chem. *52*, 127 (1994).
10. Pejin J., Grujic O., Markov S., Kocic-Tanackov S.: J. Am. Chem. Soc. *64*, 52 (2006).
11. Procházková D.: Chem. Listy *96*, 827 (2002).

12. Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C.: J. Microcolumn Sep. *11*, 737 (1999).
13. Kirchner M., Matisová E.: Chem. Listy *98*, 396 (2004).
14. Popp P., Bauer C., Wennrich L.: Anal. Chim. Acta *436*, 1 (2001).
15. Lancas F. M., Queiroz M. E. C., Grossi P., Olivares I. R. B.: J. Sep. Sci. *32*, 813 (2009).
16. Sánchez-Rojas F., Bosch-Ojeda C., Cano-Pavón J. M.: Chromatographia *69*, 79 (2009).
17. Horák T., Kellner V., Čulík J., Jurková M., Čejka P.: J. Inst. Brew. *113*, 154 (2007).
18. Horák T., Čulík J., Jurková M., Čejka P., Kellner V.: Kvasný Prům. *55*, 66 (2009).
19. De Bruin L. S., Josephy P. D., Pawliszyn J. B.: Anal. Chem. *70*, 1986 (1998).
20. Beltran J., Lopez F. J., Cepria O., Hernandez F.: J. Chromatogr., A *808*, 257 (1998).

T. Horák, J. Čulík, M. Jurková, P. Čejka, J. Dvořák, D. Hašková, and V. Kellner *(Research Institute of Brewing and Malting, Prague):* **Utilization of Stir Bar Sorption Extraction in Analysis of Some Beer Flavours and Its Comparison with Established Procedures**

For the determination of beer flavours well-established methods require sample preparation by distillation, liquid-liquid extraction or headspace methods. In the past years, microextraction methods became popular. The stir bar sorption extraction (SBSE) is one of them. This article presents utilization of SBSE followed by solvent re-extraction in the determination of some esters and α-diketones in beer. The parameters (linearity, accuracy and repeatability) and also the determination of compounds of interest by SBSE are compared with steam distillation followed by liquid-liquid extraction, usually used for beer ester analysis, and the headspace technique used for α-diketones.