

Stanovení mastných kyselin v pivu rychlou, rutinní metodou

Determination of Fatty Acids in Beer by Fast Routine Analyse

Tomáš HORÁK, Jiří ČULÍK, Marie JURKOVÁ, Pavel ČEJKA, Jana OLŠOVSKÁ

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. – Olšovská, J.: Stanovení mastných kyselin v pivu rychlou, rutinní metodou. *Kvasny Prum.* 59, 2013, č. 3, s. 58–62.

Mastné kyseliny v pivu pocházejí jednak z použitých surovin a jednak vznikají při kvašení a zrání piva. Vysoký obsah mastných kyselin v kvasném médiu může nepříznivě ovlivnit výslednou kvalitu piva. Proto je nutné mít k dispozici rychlou, rutinní metodu k jejich stanovení. Tato práce popisuje postup vyhovující těmto požadavkům pomocí metody stanovení mastných kyselin v pivu nebo mladině založené na technice extrakce na pevné fázi (SPE). K vlastnímu stanovení mastných kyselin bylo použito rychlejší plynové chromatografie s křemennou kapilární kolonou o vnitřním průměru 0,18 mm. K detekci byl použit plamenionizační detektor (FID). V práci jsou uvedeny pracovní charakteristiky předloženého postupu.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Olšovská, J.: Determination of fatty acids in beer by fast routine analyse. *Kvasny Prum.* 59, 2013, No. 3, p. 58–62.

Fatty acids in beer originate not only from raw materials but their content depends also on the duration of fermentation. An increased content of fatty acids during fermentation of wort can influence the quality of final beer. For this reason it is necessary to use a fast and routine analytical method for the determination of their concentration in beer or hopped wort. This paper presents a suitable procedure based on solid phase extraction (SPE). The final determination of fatty acids was carried out using faster gas chromatography with silica capillary column of 0.18 mm internal diameter. Flame ionization detector (FID) was used for the detection. Working parameters of this procedure are described in this study.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Olšovská, J.: Die Feststellung der Fettsäuren im Bier durch eine schnelle routine Methode. *Kvasny Prum.* 59, 2013, Nr. 3, S. 58–62.

Die Fettsäuren im Bier stammen einerseits aus den angewandten Rohstoffen, andererseits entstehen während der Gärung und der Lagerung des Bieres. Der hohe Gehalt an Fettsäuren kann die finale Qualität des Biers negativ beeinflussen, deswegen ist es notwendig, eine schnelle routine Methode zur ihrer Bestimmung zur Verfügung zu haben. Im Artikel wird ein diesen Anforderungen passendes Verfahren durch Feststellung der Fettsäuren im Bier oder in der Würze, gegründet mittels der Technik einer Extraktion auf der festen Phase (SPE) beschrieben. Zur eigenen Feststellung der Fettsäuren wurde eine schnellere Gaschromatographie mit Siliziumkapillarkolonnen (ID 0,18 mm) angewandt. Zur Detektion wurde ein Flammenionisationsdetektor (FDI) gebracht. In dem Artikel werden die Arbeitscharakteristiken des vorgeschlagenen Verfahrens beigefügt.

Klíčová slova: *mastné kyseliny, pivo, extrakce na pevné fázi (SPE), rychlejší plynová chromatografie*

Keywords: *fatty acids, beer, solid-phase extraction (SPE), faster gas chromatography*

1 ÚVOD

Na sensorických vlastnostech piva se podílí velké množství těkavých a netěkavých látek, které pivo obsahuje. Mnoho těchto látek produkují kvasinky během fermentace. Jednou z těchto sensoricky aktivních skupin látek jsou mastné kyseliny. Mají vliv na vitalitu kvasnic, mohou ovlivnit chuť piva a také stabilitu pивní pěny (Chen, 1980; Drost et al., 1971; Clapperton, 1978a).

Nižší mastné kyseliny, jako je kyselina hexanová, oktanová a dekanová, jsou vytvářeny kvasnicemi při fermentaci během biosyntézy vyšších mastných kyselin. Jejich vznik ovlivňuje celá řada faktorů. Mezi nejvýznamnější patří stres kvasnic, složení mladiny a stupeň provzdušnění. Nižší mastné kyseliny jsou odpovědné za žluklou nebo koží pachů (Clarke et al., 1981).

Příspěvek těchto kyselin k celkovému arómatu je aditivní. V důsledku toho se žluklá nebo koží pachů může projevit i v případě, že koncentrace jednotlivých kyselin nepřesahuje jejich prahovou koncentraci vnímání. Sensorické závady, které jsou důsledkem těchto kyselin, mají obvykle svůj původ ve fermentaci, kdy vzniká nadbytek těchto kyselin, než v infekci nebo surovinách (Meilgaard, 1975; Clapperton, 1978b).

Vyšší nenasyčené mastné kyseliny jako jsou linolová a linoleová kyselina mají velký význam z toho hlediska, že jejich oxidativní degradací vznikají látky odpovědné za starou chuť (Dominguez a Canales, 1974; Tressl et al., 1979).

Mastné kyseliny se obvykle stanovují pomocí plynové chromatografie. Před vlastní analýzou je však nutné mastné kyseliny z piva vyextrahovat, zkoncentrovat, eventuálně ještě přečistit. K tomu je možné využít různé extrakční postupy.

Při extrakci v systému kapalina-kapalina se obvykle používá velké množství drahých a zdraví nebezpečných rozpouštědel jako je

1 INTRODUCTION

Beer consists of many volatile and nonvolatile compounds that affect beer flavor, a combination of odor and taste. Many of these aroma compounds are synthesized by yeast during fermentation. Free fatty acids represent one group of these beer flavors that affect beer taste, the vitality of yeast, and also the foam stability of beer (Chen, 1980; Drost et al., 1971; Clapperton, 1978a).

Straight-chain acids as hexanoic, octanoic, and decanoic acids are formed by yeast during synthesis of long-chain fatty acids during fermentation. A number of factors influence their formation. The most important aspects are yeast strain, original gravity, wort composition, and degree of aeration (Clarke et al., 1981).

Rancid or goaty flavor is typical for these medium-chain fatty acids. The aroma contributions of these flavors are additive. Therefore, rancid and goaty off-flavors can occur even though none of the individual acids are present above threshold concentrations. Off-flavors due to these acids normally arise by their excess formation during fermentation, not other causes such as infection or raw materials (Meilgaard, 1975; Clapperton, 1978).

Unsaturated long-chain fatty acids such as linoleic and linolenic acids are especially of great importance because their oxidative degradation, by means of either enzymatic or free radical reactions, may lead to the formation of a characteristic aging flavor (Dominguez and Canales, 1974; Tressl et al., 1979).

Fatty acids are usually determined by gas chromatography. Sample preparation methods include extraction and also frequently concentration steps. Different techniques for sample preparations can be used.

Liquid-liquid extraction usually requires large volumes of expensive and possibly harmful organic solvents such as chloroform

chloroform (Chen, 1980), směs chloroformu a ethanolu (Drost et al., 1971), dichlormethan (Clapperton, 1978a), a směs ethylacetátu a n-pentanu (Clarke et al., 1981). Kromě toho tento postup je časově náročný.

Klasickou extrakci v systému kapalina-kapalina nahrazuje v posledních letech stále populárnější a oblíbenější extrakce na pevné fázi (SPE). Princip spočívá v zachycení sledovaných analytů, které jsou obsaženy v kapalně fázi, na speciálním sorbentu díky silným, ale reversibilním interakcím mezi analytem a povrchem stacionární fáze. Přitom by nemělo dojít k interakcím mezi stacionární fázi a složkami matrice. Mezi typické interakce patří hydrofobní van der Waalovy síly, vodíkové můstky, síly dipól-dipól nebo iontové výměnné interakce. Sorbent je umístěn mezi fritami v extrakční minikolonci určené na jedno použití. Cílem tohoto postupu je jednak odstranění interferujících látek obsažených v matici a jednak izolace a zakoncentrování (100x – 5000x) stanovených látek.

Metoda SPE zahrnuje čtyři po sobě jdoucí kroky: 1) Kondicionace sorbentu. V této fázi se SPE kolonka připraví na interakci se sorbentem. Často se provádí methanolem, vodou nebo pufrům. Jde o nezbytný krok pro reprodukovatelnou sorpci analytů. 2) Aplikace vzorku. S využitím podtlaku vytvořeného membránovou pumpou se vzorek 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 z matrice jsou odstraněny z povrchu stacionární fáze. 4) Eluce. Při tomto posledním kroku dochází k selektivní desorpci analyzovaných látek pomocí vhodného rozpouštědla (Merck, 2000; Merck, 2005).

Další technikou použitelnou ke stanovení mastných kyselin v pivu je mikroextrakce na pevné fázi – SPME. Jde o adsorpční/desorpční techniku vyvinutou Pawliszynem v 1. polovině 90. let minulého století (Procházková, 1999; Horák et al., 2005; Horák et al., 2009a).

Další rozvoj mikroextrakčních technik dospěl k zavedení metody extrakce na míchací tyčince – SBSE. Tento postup je založen na sorpci analytů na tenký film z polydimethylsiloxanu (PDMS), kterým je pokryta míchací tyčinka (Baltussen et al., 1999). Vzhledem k podstatně většímu množství polydimethylsiloxanové fáze, do které se mohou extrahovat látky, dosahuje SBSE podstatně vyšší citlivosti než postup SPME (Bicchi et al., 2002). Využití této techniky při stanovení nižších a vyšších mastných kyselin v pivu je popsáno v pracích (Horák et al., 2008; Horák et al., 2009a; Horák et al., 2010).

Jak vyplývá z práce (Horák et al., 2009a), SPME technika je výhodná pro stanovení nižších mastných kyselin v pivu díky své jednoduchosti, reprodukovatelnosti, časově nenáročnosti a nízké ceně. Na druhé straně vlákno je velmi křehké a vyžaduje velice opatrné zacházení. Velká nevýhoda tohoto postupu spočívá v tom, že v rámci jednoho extrakčního kroku nelze stanovit jak nižší, tak vyšší mastné kyseliny. SBSE postup je v porovnání s SMPE daleko robustnější. Jde rovněž o velmi nenáročnou metodu, ale příprava extraktu tímto postupem trvá až pětikrát déle než u metody SPE. Navíc pořízení SBSE míchací tyčinky je velmi obtížné, neboť ji komerčně dodává pouze firma Gerstel. Z těchto důvodů se předložená práce zaměřuje na stanovení nižších i vyšších mastných kyselin v pivu metodou SPE.

Požadavky na dnešní analýzy zahrnují nejen získání přesných a reprodukovatelných výsledků, ale také nutnost jejich dodání v co nejkratší době. Jednou z možností, jak zkrátit celkovou dobu analytického stanovení, je urychlení plynové chromatografické separace využitím rychlejší plynové chromatografie. Toho lze dosáhnout použitím kapilárních kolon s vnitřním průměrem 0,1 mm. Nevýhoda těchto kolon spočívá v nutnosti vyvinout vysoký tlak na hlavě kolony, obvykle 600 kPa nebo ještě vyšší, dále nezbytnost rychlého ohřevu chromatografické pece a požadavky na detektory s rychle skenující elektronikou. Těmto zvýšeným nárokům nejsou všechny běžné chromatografy schopné vyhovět. Rozumným kompromisem, který umožní jak významné zkrácení plynové chromatografického stanovení, tak využití stávající instrumentace, je použití chromatografických kolon s vnitřním průměrem 0,18 mm. Pracovní podmínky na těchto tenkých kolonách lze velmi jednoduše získat "přeložením" podmínek na stávající konveční koloně pomocí "překladového" software (Horák et al., 2009b; Horák et al., 2009c; Snyder et al., 1992; Quimby et al., 1995).

V této práci je popsána extrakce nižších i vyšších mastných kyselin z piva pomocí SPE metody a jejich následné stanovení pomocí rychlejší plynové chromatografie. Jsou zde uvedeny pracovní charakteristiky uvedeného postupu včetně časových úspor při použití kolony o průměru 0,18 mm.

(Chen, 1980), a mixture of chloroform and ethanol (Drost et al., 1971), dichloromethane (Clapperton, 1978a), and a mixture of ethyl acetate and n-pentane (Clarke et al., 1981). These techniques are generally time-consuming.

Classical liquid-liquid extraction can be successfully replaced by a solid phase extraction procedure (SPE). 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 the 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 matrix-interfering components and partly isolation as well as selective enrichment by factors of 100 to 5000 of the determined compounds.

The 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 in 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. In this last step the selective desorbing of the analytes of interest takes place using a suitable solvent (Merck, 2000; Merck, 2005).

Solid Phase Microextraction (SPME) is another method suitable for the determination of fatty acids in beer. This procedure is an adsorption/desorption technique and has been developed by Prof. Pawliszyn in the first half of 90's (Procházková, 1999; Horák et al., 2005; Horák et al., 2009a).

Another development of microextraction methods led to a procedure called stir bar sorptive extraction – SBSE. This method is based on the sorption of analytes onto a thick film of polydimethylsiloxane coated on a stir bar (Baltussen et al., 1999). SBSE had been shown to have a much higher sensitivity than SPME due to the higher volume of the polydimethylsiloxane phase, in which the amount of analyte extracted is proportional to the coating thickness, increasing the limit of detection during sampling (Horák et al., 2008; Horák et al., 2009a; Horák et al., 2010).

The study of Horák et al. (2009a) showed that SMPE technique is suitable for the determination of medium-chain fatty acids in beer due to its simplicity, repeatability, low time consumption, and low cost. On the other hand, the fiber is fragile and its use requires careful manipulation. A great disadvantage of this procedure is the impossibility of determining also long-chain fatty acids after the same common extraction step. The SBSE method is much more robust than the SPME fiber. SBSE procedure is also very simple, but the sample preparation by this technique takes up to five times more time than SPE method. Moreover, the stir bar used in SBSE method is produced commercially only by Gerstel GmbH and it is very difficult to buy it. For these reasons this paper is focused on the determination of medium-chain in common with long-chain fatty acids in beer by SPE procedure.

Laboratories nowadays must not only provide accurate and reproducible results but high-throughput analysis is also necessary. One way for acceleration of the whole analytical procedure lies in using faster gas chromatography. Narrow bore capillary columns with 0.1 mm internal diameter can be successfully used for this. A disadvantage of these columns consists in the necessity of high head pressure, usually 600 kPa or higher, the need to facilitate the quick heating of chromatographic oven, and detectors with electronics enabling high sampling frequency. Not all conventional gas chromatographs are suitable for these requirements. Capillary columns with 0.18 mm internal diameter represent a reasonable compromise for time shortening of gas chromatographic analyses and also for simultaneous use of the current instrumentation. The working conditions of these narrow bore columns can be easily translated from operating conditions of conventional columns by the method translation software. (Horák et al., 2009b; Horák et al., 2009c; Snyder et al., 1992; Quimby et al., 1995)

The aim of this study is the development and validation of the method for determination of fatty acids in beer. Therefore, extraction of medium-chain and also long-chain fatty acids from beer by the SPE method was optimized. Consequently, faster gas chromatography method was developed for the determination of these compounds. The working parameters of this procedure including speed gains obtained by column with 0.18 mm internal diameter are shown.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Použité materiály, standardy

SPE kolony LiChrolut EN 200 mg/3ml (ethylvinyl benzen divinyl benzen polymer s extrémně velkým specifickým povrchem) byly zakoupeny od fy Merck.

Volné mastné kyseliny jako kyselina isobutanová, butanová (másečná), isopentanová, pentanová (valerová), hexanová (kapronová), heptanová, oktanová (kapylová), nonanová (pelargonová), dekanová (kaprinová), undekanová, dodekanová (laurová), tridekanová, tetradekanová (myristová), pentadekanová, hexadekanová (palmitová), heptadekanová, oktadekanová (stearová), oktadecadienová (linolová), oktadekatrienová (linolenová), oktadecenová (olejová) byly pořízeny od fy Supelco v čistotě > 99 %.

Methylestery kyselin dekanové, dodekanové, tridekanové, tetradekanové, pentadekanové, hexadekanové, heptadekanové, oktadekanové, oktadecadienové, oktadekatrienové, oktadecenové rovněž pocházely od fy Supelco, rovněž v čistotě > 99 %.

Derivatizační činidlo BF3 – methanol 14% (v/v) bylo nakoupeno od fy Fluka.

Dále byly použity kyselina chlorovodíková a rozpouštědla hexan, dichlormethan, chloroform, ethanol a methanol. Tyto chemikálie byly zakoupeny od fy Merck.

Ultračistá voda byla získána ze zařízení Millipore Milli – Q.

Plyny v tlakových lahvích – helium v kvalitě 5.0, vodík v kvalitě 5.0, syntetický vzduch a dusík v kvalitě 4,6 dodal Messer Praha.

Vakuový SPE manifold pro 12 vzorků a membránová pumpa byly nakoupeny od fy Supelco.

Chromatografická kolona DB-WAX o délce 10 m, vnitřním průměru 0,180 mm a tloušťce filmu 0,18 μm byla pořízena od fy Agilent J&W.

Vzorky piva pilsněského typu vyrobené v ČR pocházely z obchodní sítě.

2.2 Metoda

2.2.1 SPE extrakce

Postup extrakce mastných kyselin z piva vycházel z práce Hage, 1987, kdy pomocí SPE metody jsou volné mastné kyseliny vyextrahovány z piva. Nižší mastné kyseliny jsou přímo stanoveny na plynovém chromatografu. Vyšší mastné kyseliny se derivatizací převedou na příslušné methylestery.

SPE kolony byly nejprve kondicionovány 2,5 ml methanolu a následně promyty 5,0 ml vody. Poté bylo kolonkou za pomoci vakua vytvořeného membránovou vývěvou prosáto 20 ml odpěněného vzorku piva, které bylo okyseleno 1,0 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové a obohaceno přidávkem 10 μl ethanolového roztoku vnitřních standardů (heptanová kyselina, pentadekanová kyselina ve výsledné koncentraci 1,3 mg/l piva). K odstranění interferencí byla v dalším kroku kolonka promyta 5,0 ml ultračisté vody. Potom byla kolonka vysušena pod mírným proudem dusíku. Nakonec byly mastné kyseliny eluovány pomocí chloroformu – 2 x 0,5 ml – oba podíly byly spojeny a celkový extrakt byl následně analyzován.

Pro stanovení nižších mastných kyselin (C4 – C10) byly 2 μl tohoto chloroformového extraktu nastříknuty na kolonu plynového chromatografu.

Ke stanovení vyšších mastných kyselin (C12 – C18) bylo nutné chloroformový extrakt odpařit pod jemným proudem dusíku a provést methylyaci vyšších mastných kyselin přidávkem 0,1 ml derivatizačního činidla BF3 – methanol 14% (v/v). Derivatizace probíhala po dobu 20 min při teplotě 95 °C. Reakce je zastavena přidáním 0,2 ml vody a důkladným protřepáním. Poté se v ultrazvukové lázni methylestery vyšších mastných kyselin vyextrahují do 0,2 ml hexanu. Extrakce se provádí po dobu 2 min.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials, standards

SPE cartridges LiChrolut EN 200 mg/3ml (ethylvinyl benzene divinyl benzene polymer with an extremely large specific surface) were purchased from Merck.

Free fatty acids such as isobutanoic acid, butanoic (butyric), isopentanoic, 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 and were of > 99% purity.

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 and were also of > 99% purity.

Derivatization agent BF3 – methanol 14% (v/v) was supplied by Fluka.

Analytical reagent grade hydrochloric acid and solvents such as hexane, dichloromethane, chloroform, ethanol and methanol were from Merck.

Purified water was produced from Millipore Milli – Q.

Helium quality 5.0, hydrogen quality 5.0, synthetic air, and nitrogen quality 4.6 were obtained from Messer Prague.

Vacuum SPE manifold for 12 samples and membrane pump were purchased from Supelco.

Gas chromatographic column DB-WAX 10 m length, 0.180 mm internal diameter and 0.180 mm film thickness was produced by Agilent J&W.

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

2.2 Method

2.2.1 SPE extraction

The procedure of fatty acids extraction from beer was based on the study of Hage, 1987. In this method free fatty acids are extracted from beer by SPE technique. Medium-chain fatty acids are determined immediately using gas chromatography. Long-chain fatty acids are at first derivatized to their methylesters and then analysed by gas chromatography.

SPE columns were initially activated with 2.5 ml of methanol and washed by 5.0 ml of purified water. Then 20 ml of degassed beer sample with 1.0 ml of 1 M hydrochloric acid and spiked with internal standards (heptanoic and pentadecanoic acids, each acid at a concentration of 1.3 mg/l of beer) was added. Interferences were

Tab. 1 Pracovní charakteristiky metody SPE při stanovení mastných kyselin v pivu. *r* – korelační koeficient při použití lineární regrese / Working characteristics of the SPE method for the determination of fatty acids in beer, *r* – regression coefficient of the standard curve.

Sloučenina / Compound	<i>r</i>	Výtěžnost / Recovery (%)	Opakovatelnost / Repeatability RSD (%)
Isomáselná kyselina / Isobutyric acid (i-C4)	0.9995	96	7.1
Máselná kyselina / Butyric acid (C4)	0.9998	98	7.8
Isovalerová kyselina / Isovaleric acid (i-C5)	0.9997	97	7.6
Valerová kyselina / Valeric acid (C5)	0.9998	98	5.3
Kapronová kyselina / Caproic acid (C6)	0.9996	107	7.6
Kapylová kyselina / Caprylic acid (C8)	0.9999	107	7.5
Nonanová kyselina / Nonanoic acid (C9)	0.9999	97	8.3
Kaprinová kyselina / Capric acid (C10)	0.9999	98	7.0
Laurová kyselina / Lauric acid (C12)	0.9998	103	5.8
Myristová kyselina / Myristic acid (C14)	0.9993	95	16
Palmitová kyselina / Palmitic acid (C16)	0.9978	115	12
Stearová kyselina / Stearic acid (C18)	0.9971	108	14
Olejová kyselina / Oleic acid (C18)	0.9986	105	11
Linolová kyselina / Linoleic acid (C18)	0.9989	98	11
Linoleová kyselina / Linolenic acid (C18)	0.9988	110	13

2.2.2 GC analýza

Stanovení jak nižších, tak vyšších mastných kyselin bylo provedeno za stejných podmínek na plynovém chromatografu Chrompack CP 9001 vybaveného split/splitless injektorem a plamenoionizačním detektorem (FID). Plynový chromatograf byl vybaven automatickým dávkovačem vzorků Labio ASG 40 od fy Labio.

Chromatografická kolona byla vytemperována na počáteční teplotu 120 °C a po nástřiku vzorku byla tato teplota udržována po dobu 0,7 min. Následoval teplotní gradient 30 °C/min až do teploty 200 °C a při této teplotě byla kolona ponechána po dobu 6 min. Nástřik byl prováděn v režimu split, dělicí poměr byl 1:10. Teplota injektoru i detektoru byla shodná, 220 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium v kvalitě 5.0 a tlak na hlavu kolony byl nastaven na 200 kPa při teplotě 120 °C.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci validace metody byla ověřována linearita, výtěžnost a opakovatelnost metody SPE. Za tímto účelem byly připraveny standardní roztoky sledovaných analytů v 5% (v/v) roztoku ethanolu. Výsledky jsou uvedeny v *tab. 1*.

Kalibrační křivky byly proměřeny v rozsahu od 0,0015 až 8 mg/l, který pokrývá obvyklé koncentrace volných mastných kyselin v pivu pšněnského typu. Jak vyplývá z *tab. 1*, korelační koeficienty pro všechny stanovené látky při použití lineární regrese ležely v rozmezí 0,9971 až 0,9999. V daném koncentračním rozsahu se metoda vyznačuje vysokou linearitou.

Správnost metody byla ověřena pomocí výtěžnosti. Nejprve byl změřen přirozený obsah volných mastných kyselin v pěti reálných vzorcích piv. Poté byly tytéž vzorky piv obohaceny přidavkem mastných kyselin na koncentrační hladině 2 mg/l každé látky. Výtěžnost nižších mastných kyselin se pohybovala v rozmezí 96–107 %, s průměrnou hodnotou 100 %. Výtěžnost vyšších mastných kyselin byla 95–115 %, s průměrnou hodnotou 105 %. Výborné hodnoty výtěžnosti pro všechny stanovené analyty potvrzují vysokou účinnost a tedy vhodnost použití daného typu SPE kolony.

Opakovatelnost metod byla zjištěna pětinásobným opakováním celého postupu během jednoho dne na jednom a témž vzorku piva. Z výsledků uvedených v *tab. 1* je patrné, že pro nižší mastné kyseliny se hodnota relativní směrodatné odchylky (RSD) nachází v intervalu

Tab. 2 Relativní směrodatná odchylka retenčních časů (RSD tr) a relativní směrodatná odchylka relativních ploch (RSD A) mastných kyselin na koloně DB WAX 10 m, 0,18 mm I.D., 0,18 μ / *Relative standard deviation of retention times (RSD tr) and relative standard deviation of relative peak areas (RSD A) of fatty acids obtained on column DB WAX 10 m, 0.18 mm I.D., 0.18 μ.*

Sloučenina / Compound	RSD t _r (%)	RSD A (%)
Isomáselná kyselina / <i>Isobutyric acid</i>	0.11	4.5
Máselná kyselina / <i>Butyric acid</i>	0.09	2.0
Isovalerová kyselina / <i>Isovaleric acid</i>	0.10	3.2
Valerová kyselina / <i>Valeric acid</i>	0.09	1.9
Kapronová kyselina / <i>Caproic acid</i>	0.08	0.7
Heptanová kyselina (vnitřní standard) / <i>Heptanoic acid (internal standard)</i>	0.06	0.7
Kaprylová kyselina / <i>Caprylic acid</i>	0.08	1.0
Pelargonová kyselina / <i>Pelargonic acid</i>	0.04	1.2
Kaprinová kyselina / <i>Capric acid</i>	0.02	2.7
Laurová kyselina / <i>Lauric acid</i>	0.09	6.4
Tridekanová kyselina (vnitřní standard) / <i>Tridecanoic acid (internal standard)</i>	0.05	2.2
Myristová kyselina / <i>Myristic acid</i>	0.10	1.2
Pentadekanová kyselina (vnitřní standard) / <i>Pentadecanoic acid (internal standard)</i>	0.10	0.8
Palmitová kyselina / <i>Palmitic acid</i>	0.04	1.2
Heptadekanová kyselina (vnitřní standard) / <i>Heptadecanoic acid (internal standard)</i>	0.03	2.8
Stearová kyselina / <i>Stearic acid</i>	0.04	3.5
Olejová kyselina / <i>Oleic acid</i>	0.03	1.6
Linolová kyselina / <i>Linoleic acid</i>	0.05	2.3
Linolenová kyselina / <i>Linolenic acid</i>	0.03	4.6

removed in the next step by washing with 5.0 ml purified water. Another step included drying under mild nitrogen flush. Finally chloroform (2 × 0.5 ml) was used for fatty acid elution.

For the determination of medium-chain fatty acids (C4 – C10) 2 μl of this chloroform extract was injected into the GC column.

For the determination of long-chain fatty acids (C12 – C18) the chloroform extract was evaporated under mild nitrogen flush and methylated with 0.1 ml of BF₃-methanol 14% (v/v) for 20 min at 95 °C. Derivatization was stopped by the addition of 0.2 ml of water, and hand shaking. After that all fatty acid methyl esters were extracted with 0.2 ml hexane in an ultrasonic bath for 2 min.

2.2.2 GC analysis

Analyses of both medium- and long-chain fatty acids were carried out using a Chrompack CP 9001 gas chromatograph with a split/splitless injector and a flame ionization detector (FID) under the same chromatographic conditions. The gas chromatograph was equipped with Labio ASG 40 autosampler.

The chromatographic column was maintained at 120 °C and after sample injection this temperature was kept for 0.7 min. Then the column oven was ramped at a rate of 30 °C/min to 200 °C, and held isothermally for 6 min. The split mode with split ratio 1:10 was used. Temperatures of the injector and detector were 220 °C. The carrier gas was helium of 5.0 quality with a column head pressure of 200 kPa at 120 °C.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of working parameters of the method for the determination of fatty acids in beer is necessary for its routine use. The parameters to be determined included linearity, recovery, and repeatability. Standard solutions of compounds of interest were prepared in a 5% (v/v) ethanol solution for these tests. The results are shown in *Tab. 1*.

Calibration curves were measured throughout a range of the free fatty acids covering the concentration usually found in beers of pilsner type (concentration from 0.0015 to 8 mg/l). As shown in *Tab. 1*, the correlation coefficients to the straight line for all determined fatty acids were in the range from 0.9971 to 0.9999. The method is characterized by high linearity in the examined concentration range.

The accuracy of the methods was investigated by conducting a recovery test. The test was performed by measuring the natural concentrations of the fatty acids in five beer samples. Then the same beers were spiked with a known amount of each acid (2.0 mg/l), and concentrations of fatty acids were determined again. The recoveries of medium-chain fatty acids were in the range of 96–107 % with an average of 100 %. The recoveries of long-chain fatty acids were in the range of 95–107 % with an average of 105 %. The very good values of recoveries for all determined analytes confirm the suitability of using this type of SPE column.

The intra-day repeatability of the method was examined by repeating the whole procedure five times with the same beer sample. The results demonstrated that relative standard deviations (RSD) extended from 5.8 to 8.3 % with an average of 7.1 % for medium-chain fatty acids. For long-chain fatty acids RSD ranged from 11 to 16 % with an average of 12.8 %. The results show that long-chain fatty acids are char-

5,8 až 8,3 %, s průměrnou hodnotou 7,1 %. Pro vyšší mastné kyseliny nabývá RSD hodnot 11 až 16 %, v průměru 12,8 %. Z výsledků je zřejmé, že vyšší mastné kyseliny mají horší hodnoty opakovatelnosti než nižší mastné kyseliny, což zřejmě souvisí s dalšími kroky v rámci přípravy vzorku – derivatizace za účelem získání příslušných methyl esterů a jejich následné extrakci do hexanu. Oba tyto kroky podle očekávání přispívají ke zhoršení hodnot opakovatelnosti. Na druhé straně i tyto hodnoty jsou plně akceptovatelné.

Při ověřování vhodnosti použití tenké kolony o vnitřním průměru 0,18 mm byla pozornost zaměřena na opakovatelnost retenčních časů. Pro kvantitativní analýzu je také podstatné, aby zůstával konstantní poměr jednotlivých látek při opakované analýze téhož vzorku. Za tímto účelem bylo provedeno sedmkrát opakované měření stejného vzorku. V tab. 2 jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky retenčních časů a relativní směrodatné odchylky relativní plochy (vzhledem k celkové ploše integrovaných píků) chromatografických píků. Z výsledků vyplývá, že reprodukovatelnost, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka, retenčních časů je lepší než 0,11 %. Relativní směrodatná odchylka pro plochu stanovených látek vykazuje hodnoty lepší než 6,4 %.

4 ZÁVĚR

Předložená práce ukázala, že použití SPE metody s využitím kolonek LiChrolut EN 200 mg/3 ml je vhodné k rutinní analýze mastných kyselin v pivu (opakovatelnost pro všechny stanovené látky je lepší než 16 %). Použití kapilární kolony o vnitřním průměru 0,18 mm umožňuje zkrátit dobu vlastního stanovení pod 4 min, a tak zvýšit jak kapacitu laboratoře, tak využití stávajících plynových chromatografů.

Poděkování

Tato práce byla vypracována za podpory MZE-RO1012-Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin.

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

LITERATURA / REFERENCES

- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C., 1999: Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J. Microcolumn Sep.* 11: 737–747.
- Bicchi, C., Iori, C., Rubiolo, P., Sandra, P., 2002: Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE) and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted Arabica coffee and coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* 50: 449–459.
- Clapperton, J. F., 1978: Fatty acids contributing to caprylic flavour in beer. The use of profile and threshold data in flavour research. *J. Inst. Brew.* 84: 107–112.
- Clapperton, J.F., 1978: Caprylic flavour as a feature of beer flavour. *J. Inst. Brew.* 84: 90–92.
- Clarke, B. J., Davine, D. F., Hawthorne, D. B., Kavanagh, T. E., Moulder, P. J., 1981: Factors affecting the formation of medium chain fatty acids during fermentation. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 18: 188–194.
- Dominguez, X.A., Canales, A.M., 1974: Oxidation of beer. A rational mechanism for the degradation of unsaturated fatty acids and the formation of unsaturated aldehydes. *Brewers Digest* 49: 40–47.
- Drost, B.W., Van Eerde, P., Hoekstra, S.F., Strating, J., 1971: Fatty acids and staling of beer. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Estoril, Elsevier Scientific: Amsterdam, The Netherlands:* 451–458.
- Hage, T., 1987: 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:* 106–110.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., 2005: Determination of the fatty acids in beer by SMPE. *Kvasny Prum.* 51: 374–377.
- Horák, T., Čulík, T., Čejka, P., Jurková, M., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D., 2009: 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: 11081–11085

acterized by worse repeatability than medium-chain fatty acids. This could be explained by other necessary steps in sample preparation – derivatization for conversion of free long-chain fatty acids to their methylesters, followed by hexane extraction. Not surprisingly, both these steps contribute to worse repeatability. On the other hand, all these values are fully acceptable.

The suitability of the narrow column with 0.18 mm internal diameter was tested by the repeatability of retention times. During chromatographic analyses it is very important that retention times should stay constant, for qualitative data as well as the relative sample composition are needed to obtain quantitative data. To test this, seven times repeated analyses of the same beer sample were performed for each fatty acid. *Tab. 2* gives the relative standard deviations of retention times and relative standard deviations of relative chromatographic peaks areas. As one can see from this table the reproducibility of retention times is better than 0.11 %. The relative standard deviation of peak areas of compounds of interest is better than 6.4 %.

4 CONCLUSIONS

This study has shown that the use of the SPE method with LiChrolut EN 200 mg/3 ml columns is suitable for routine determination of fatty acids in beer (repeatability for all determined compounds is better than 16 %). Application of capillary columns with internal diameter 0.18 mm reduces the analytical run under 4 min and so both high laboratory throughput and utilization of existing conventional gas chromatographs are reached.

Acknowledgements

This work was performed with the support of MZE-RO1012 project “Research of the quality and processing of malting and brewing raw materials”.

The authors also thank to close colleagues for their help and friendly atmosphere in the laboratory.

- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., 2008: Determination of free medium-chain fatty acids in beer by stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A*, 1196–1197: 96–99.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D., 2009: Faster gas chromatography and its utilization in brewing, part 1. – theoretical and practical aspects. *Kvasny Prum.* 55: 250–254.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D., 2009: Faster gas chromatography and its utilization in brewing, part 3. – the determination of some low volatile beer flavours. *Kvasny Prum.* 55: 304–309.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D., 2010: 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: 418–422.
- Chen, E. C.-H., 1980: Utilization of wort fatty acids by yeast during fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 38: 148–153.
- Literatura firmy Merck, 2000: *ChromBook*, 2nd Edition: 15.
- Literatura firmy Merck, 2005: *ChromBook* 2006/07: 22–23.
- Meilgaard, M. C., 1975: Flavor chemistry of beer. Part I: Flavor interaction between principal volatiles. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 12: 107–117.
- Procházková, D., 1999: Mikroextrakce tuhou fází – SMPE. *Kvasny Prum.* 45: 321–322.
- Quimby, B.D., Giarrocco, V., Klee, M.S., Hewlett-Packard Application Note 228–294, February 1995, publication number (43) 5963–5190E.
- Snyder, W.D., Blumberg, L., in: Sandra, P., Lee, M.L. (Eds.), *Proc. 14th Int. Symp. On Capillary Chromatography*, Baltimore, May 1992: 28.
- Tressl, R., Bahri, D., Silwar, R., 1979: Formation of aldehydes by oxidation of lipids and their importance as “off-flavour” components in beer. *European Brewery Convention*; IRL Press, Oxford University Press: Oxford, U.K.: 27–41.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 11. 12. 2012
Přijato k publikování / Accepted for publication: 4. 2. 2013