

# VYUŽITÍ NĚKTERÝCH MODERNÍCH EXTRAČNÍCH POSTUPŮ PRO KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ VICINÁLNÍCH DIKETONŮ V PIVU

## APPLICATION OF SOME MODERN SAMPLE PREPARATION PROCEDURES FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF VICINAL DIKETONES IN BEER

TOMÁŠ HORÁK, JIŘÍ ČULÍK, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER, 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@beer-research.cz

**Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Využití některých moderních extrakčních postupů pro kvantitativní stanovení vicinálních diketonů v pivu.** *Kvasny Prum.* 55, 2009, č. 3, s. 66–72.

Sledování obsahu vicinálních diketonů – 2,3-butandionu (diacetylu) a 2,3-pentandionu – v pivu je důležité, neboť při překročení prahové koncentrace vnímání dochází k nepříjemnému ovlivnění sensorických vlastností piva označovanému jako máselné aroma.

Práce se zabývá vývojem a optimalizací metody sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE), moderního postupu používaného při přípravě vzorků, pro stanovení vicinálních diketonů v pivu. Pracovní charakteristiky této metody byly porovnány s parametry mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Vlastní selektivní stanovení diacetylu a pentandionu bylo provedeno na plynovém chromatografu vybaveném detektorem elektronového záhytu.

**Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Application of some modern sample preparation procedures for quantitative determination of vicinal diketones in beer.** *Kvasny Prum.* 55, 2009, No. 3, p. 66–72.

The measurement of the content of the vicinal diketones in beer is important because these compounds, especially diacetyl, give beer a buttery off-flavour in concentrations above the flavour threshold.

This work is focused on evaluation and optimization of stir bar sorptive extraction (SBSE) the modern sample preparation procedure for the determination of vicinal diketones in beer. Validated parameters of this optimised method were compared with parameters of solid phase microextraction (SPME). The selective determination of diacetyl and pentandione was performed by gas capillary chromatography with electron capture detection.

**Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V.: Die Ausnützung von einigen modernen Extraktionsverfahren für eine quantitative Bestimmung von vicinalen Diketonen im Bier.** *Kvasny Prum.* 55, 2009, Nr. 3, S. 66–72.

Es ist wichtig den Gehalt von vicinalen Diketonen – 2,3-Butandion (Diacetyl) und 2,3-Pentandion – im Bier zu verfolgen, weil bei der Überschreitung des Perzeptionsschwellenwertes zur einen unangenehmen Beeinflussung der sensorischen Eigenschaften des Bieres (bezeichnet als Butteraroma) vorkommt.

Im Artikel werden die Entwicklung und Optimierung einer Methode der Sorptionsextraktion am Rührstab (SBSE), was ein für die Mustervorbereitung für die Bestimmung von vicinalen Diketonen im Bier modernes Verfahren ist. Die Arbeitscharakteristike dieser Methode wurden mit den Parametern einer Mikroextraktion an der festen Phase (SPME) verglichen. Die eigene selektive Diazetyl- und Pentandionbestimmung wurden am mit dem Elektronabfangdetektor vorhandenen Gaschromatograf durchgeführt.

**Горак, Т. – Чулик, Й. – Юркова, М. – Чейка, П. – Келлнер, В.: Использование некоторых современных экстракционных методов для количественного определения вицинальных дикетонів в пиве.** *Kvasny Prum.* 55, 2009, No. 3, стр. 66–72.

Исследование содержания вицинальных дикетонів – 2,3-бутандиона (диацетилаа и 2,3-пентандиона – в пиве является важным, потому что при превышении пороговой концентрации восприятия происходит неудобное воздействие сенсорических свойств пива, которое обозначается как масляный букет.

Дело занимается разработкой и оптимизацией метода сорбционной экстракции на месильной палочке (SBSE), современного метода используемого при приготовлении проб – для определения вицинальных дикетонів в пиве. Рабочие характеристики этого метода были соизмерены с параметрами микроэкстракции на твёрдой фазе (SPME). Собственное избирательное диацетила и пентандиона было произведено с помощью газового хроматографа оборудованного детектором электронного захвата.

**Klíčová slova:** vicinální diketony, mikroextrakce na pevné fázi (SPME), sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE), pivo

**Keywords:** vicinal diketones, solid phase extraction (SPME), stir bar sorptive extraction (SBSE), beer

### 1 ÚVOD

Vicinální diketony – 2,3-butandion (diacetyl) a 2,3-pentandion – patří k důležitým skupinám sensorických aktivních látek v pivu [1]. Prahová koncentrace smyslového vnímání diacetylu se udává mezi 0,05-0,10 mg/l [2, 3, 4, 5]. Po překročení této koncentrace dochází k nežádoucím změnám aroma piva, které bývá označováno jako máselné, po tvarohu nebo po syrovátce [6]. 2,3-Pentandion je podobný diacetylu, ale jeho prahová koncentrace je vyšší, okolo 1,0 mg/l, a po překročení tohoto množství má za následek medové aroma [2].

Ke vzniku těchto látek dochází spolu s mnoha dalšími sensorickými látkami při kvašení mladiny. Vznik a redukce vicinálních diketonů probíhá v několika fázích. Nejprve dochází k syntéze  $\alpha$ -aceto-hydroxykyseliny, dále pak jejich oxidativní dekarboxylací vznikají vicinální diketony a následuje jejich redukce [7, 8].

Ke stanovení vicinálních diketonů bylo vyvinuto mnoho různých metod. Velmi rozšířené jsou spektrofotometrické metody po destilaci s vodní párou. Nejrozšířenější spektrofotometrická metoda je založena na postupu Gjertsen a kol. a jeho dalších modifikacích [9, 10, 11].

### 1 INTRODUCTION

The vicinal diketones – diacetyl (2,3-butanedione) and 2,3-pentanedione – belong to the most important groups off-flavour in beer [1]. The diacetyl flavour threshold is about 0.05-0.10 mg/l [2, 3, 4, 5]. When diacetyl concentrations are higher then it is the flavour threshold than the increased concentrations result in a buttery aroma [6]. 2,3-Pentanedione is similar to diacetyl, however, the flavour threshold is higher, near to 1.0 mg/l, and resulting in a honey-like aroma [2].

These compounds are formed amongst many other compounds during the fermentation step of the brewing process. The formation and reduction of vicinal diketones takes place in several stages. At first  $\alpha$ -aceto-hydroxy acids are formed, then oxidative decarboxylation of  $\alpha$ -aceto-hydroxy acids to vicinal diketone takes part followed by reduction of vicinal diketones [7, 8].

Several different methods have been developed to determine the concentrations of vicinal diketones in beer. Spectrophotometric methods have been widely used. The most frequently used method is the one according to Gjertsen and its other modifications [9, 10, 11]. These methods involve steam distillation step.

Slabinou těchto destilačně-spektrofotometrických metod je nemožnost stanovit diacetyl a pentandion samostatně. Navíc během destilace může docházet k přeměně prekurzorů diacetylů na diacetyl nebo mohou vznikat vicinální diketony při zahřátí i jinou cestou jako výsledek Maillardových reakcí [12, 13]. V důsledku toho se stanovené množství diacetylů může lišit od skutečně přítomného volného diacetylů.

Tyto nedostatky se snaží řešit chromatografické metody. Jejich hlavní výhodou je, že umožňují stanovit jak diacetyl, tak pentandion. To je významné z technologického hlediska, neboť tím lze zjistit, zda přítomný diacetyl v pivu vznikl přirozenou cestou nebo kontaminací laktobacily či pediokoky. Pokud vznikl přirozenou cestou, je totiž doprovázen pentandionem [14].

Některé postupy využívají vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). K přímému stanovení diacetylů použil Montville a kol. iontově výměnnou HPLC s UV detekcí [15]. Jiné postupy jsou založeny na HPLC s obrácenou fází (RP-HPLC) a fosforescenční detekcí [16], nebo používají derivatizaci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) a následnou analýzu pomocí RP-HPLC s UV detekcí [17]. K derivatizaci byl také použit o-fenylendiamin (OPD) [18] nebo totéž derivatizační činidlo bylo použito po zpracování vzorku extrakcí na pevné fázi (SPE) [19]. Další metody využívají RP-HPLC s fluorescenčním detektorem a derivatizujícím činidlem jsou 1,2-diamino-4,5-methyldioxybenzen [20] a 2,3-diaminonafalen (DAN) [21, 22].

Jiný přístup spočívá v derivatizaci vicinálních diketonů pomocí 1,2-diaminobenzenu a následné extrakci vzniklých chinoxalinů pomocí extrakce na pevné fázi. K vlastnímu stanovení analytů byla použita technika plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem [23, 24].

Plynová chromatografie se pro stanovení vicinálních diketonů používá nejčastěji ve spojení s headspace technikou. Tento postup se totiž vyznačuje velmi nenáročnou a rychlou přípravou vzorku, byť přitom dochází k mírnému zahřátí vzorku (většinou na teplotu okolo 40 °C). K detekci se většinou používá detektor elektronového zářítka (ECD) [12, 25, 26, 27]. Byl však použit i plamenoionizační detektor (FID) [28]. Nesrovnatelnou výhodou ECD ve srovnání s FID je podstatně vyšší citlivost (až o dva řády) a také větší selektivita, díky čemuž se eliminuje možnost ovlivnění výsledků přítomností interferujících látek. Optimalizací podmínek klasické headspace techniky a plynověchromatografické analýzy se zabýval Čulík a kol. [29].

Vývoj moderních analytických metod včetně postupů pro přípravu vzorků se nyní orientuje na miniaturizaci. Typickým příkladem je dnes již klasická technika – mikroextrakce na pevné fázi (SPME) – navržená již v první polovině devadesátých let minulého století Janusem Pawliszinem [30]. Tento postup je vhodnou a ekonomickou variantou ke klasické headspace technice. Vývojem a optimalizací metody SPME pro stanovení vicinálních diketonů v pivu se zabývaly práce Horáka a kol. [31, 32].

Jiným příkladem vývoje mikroextračních metod je extrakce na míchací tyčince (SBSE). Tuto techniku vyvíjel Baltussen a kol. [33]. 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 výhodou SBSE postupu spočívá v tom, že se jedná o magnetickou tyčinku zatavenou do skla, které je po deaktivaci pokryto 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 SPME vlákna jsou k dispozici v bohaté nabídce různých druhů pokrytí a jejich kombinací (polydimethylsiloxan, polyakrylát, Carbowax, polydimethylsiloxan/divinylbenzen, polydimethylsiloxan/Carboxen, divinylbenzen/Carboxen/polydimethylsiloxan, Carbowax/polyethylenglykol, Carbopack-Z/metal) a také s různou tloušťkou nanesené extrakční fáze, což umožňuje selektivní a zároveň vysoce citlivé stanovení široké škály různých analytů. Naproti tomu SBSE dodává firmou Gerstel pod názvem Twister je dostupná pouze s polydimethylsiloxanovou fází. Odlišné jsou velikosti Twisteru a množství nanesené fáze – délka 10 mm s tloušťkou fáze 0,5 mm nebo 1,0 mm, dále v délce 40 mm opět s tloušťkou fáze buď 0,5 mm nebo 1,0 mm. Ve všech případech je vnější průměr míchací tyčinky 3,2 mm. Twister o délce 10 mm se obvykle používá pro extrakci z objemu 1–50 ml, o délce 40 mm pro extrakci z objemů 100–250 ml [34].

Vzhledem k vysokému zakoncentrování analytů na Twisteru je možné kromě tepelné desorpce analytů využít i zpětnou extrakci sledovaných látek z polydimethylsiloxanové fáze Twisteru 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 způ-

solem, distilace-spektrofotometrické postupy mají nevýhodu v neúplné frakcionaci diacetylů z blízkých souvisejících sloučenin. Kromě toho při distilaci diacetylů mohou vznikat vicinální diketony, které by mohly být vytvořeny i jinou cestou než Maillardovými reakcemi [12, 13]. Proto je stanovené množství diacetylů odlišné od reálně přítomného diacetylů.

Pro vyhnutí ohřevu vzorku a následné konverze prekurzorů na vicinální diketony chromatografické metody byly rozvíjeny. Stanovení diacetylů a pentandionu je hlavní výhodou těchto postupů. Je důležité z technologického hlediska rozpoznání diacetylů, což lze provést touto cestou. Diacetyl je přítomen v pivu přirozeně a ne jako kontaminant [14].

Některé postupy jsou založeny na vysoké výkonnosti kapalinové chromatografie (HPLC). Montville a kol. použili iontově výměnnou HPLC s UV detekcí [15]. Další studie použily reverzní fázi HPLC (RP-HPLC) s fosforescenční detekcí [16] nebo derivatizaci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) následovanou analýzou s RP-HPLC s UV detekcí [17]. Jako derivatizační činidlo bylo také použito o-fenylendiamin (OPD) [18] nebo vzorky byly připraveny s pevnou fází (SPE) a derivatizovány s OPD [19]. Různé metody jsou založeny na RP-HPLC s fluorescenční detekcí a derivatizačními činidly jako 1,2-diamino-4,5-methyldioxybenzen [20] a 2,3-diaminonaphthalen (DAN) [21, 22].

Alternativní postupy vicinálních diketonů derivatizují pomocí 1,2-diaminobenzenu a deriváty byly extrahovány SPE sloupcem. Plynová chromatografie následovala selektivní detekcí těchto sloučenin [23, 24].

Other methods are based on the gas chromatographic headspace analysis. The advantage of these procedures are simplicity and fast sample preparation although the samples are mild heated (mostly at temperature about 40 °C). Electron capture detector (ECD) is generally used for detection [12, 25, 26, 27]. Flame ionization detector (FID) was also used in some applications [28]. The greatest advantage of ECD in comparison with FID consists in its substantial improvement of sensitivity (up to two place value) and also better selectivity due to the results aren't affected of any present interfering compounds. Čulík et al. studied optimal conditions of classical headspace technique and gas chromatographic determination [29].

Miniaturization has become a dominant trend in evolution of modern analytical methods including sample preparation. A solid phase microextraction (SPME) is a typical example. This method was developed by Pawliszyn during first part of 90<sup>th</sup> years of last century [30]. This procedure is suitable and economical alternative to classical headspace technique. Horák et al. tested and evaluated SPME method for the determination of vicinál diketones in beer [31, 32].

Stir bar sorptive extraction (SBSE) is another example of development of microextraction methods. This technique was shown by Baltussen et al. [33]. This process is based on the same principles as solid phase microextraction, and because much more polydimethylsiloxane phase is used (50–300 µl), the enrichment factor is consequently higher and sensitivity is increased by a factor of 100 to 1000. In this technique of SBSE, magnetic stirring rods are incorporated in glass jackets and coated with a layer of polydimethylsiloxane phase. So the stir bar is much more robust and worse destroyed than the fragile silica fiber used in SPME. On the other hand SPME fibers are available in wide range of different phases and their combinations (polydimethylsiloxane, polyacrylate, Carbowax, polydimethylsiloxane/divinylbenzene, polydimethylsiloxane/Carboxen, divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane, Carbowax/polyethylene glycol, Carbopack-Z/metal) and also with different thickness of extraction phases. The great advantage of SPME procedures is their highly selective and sensitive determination for wide spectrum of different analytes. While SBSE delivered by Gerstel and named as Twister is available only with polydimethylsiloxane phase. Several different types of Twisters are offered – 10 mm length with 0,5 mm respectively 1.0 mm phase thickness or 40 mm length also with 0.5 mm respectively 1.0 mm phase thickness. In all cases o.d. of stir bar are 3.2 mm. Typically the 10 mm stir bars are used for 1–50 ml sample volumes and the 40 mm stir bars are used for 100–250 ml sample volumes [34].

Due to great efficiency the stir bar can be desorbed not only by thermal desorption but also by using of a small volume of organic solvent alternatively. This procedure followed by gas chromatographic separation leads to lower sensitivity but in case of compounds in non

sobu není zapotřebí vysoké investice do termálního desorbéru. Tento přístup byl s úspěchem použit při stanovení některých senzorycky aktivních látek, jako jsou estery nebo nižší mastné kyseliny v pivu metodou plynové chromatografie [35, 36] nebo hořkých kyselin v pivu metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie [37].

Cílem této práce bylo otestovat možnost využití extrakce na míchací tyčince pro stanovení vicinálních diketonů v pivu. Po extrakci byly látky následovně zpětně extrahovány z polydimethylsiloxanové fáze do organického rozpouštědla a analyzovány na plynovém chromatografu s detektorem elektronového záchytu. Pracovní charakteristiky tohoto postupu byly porovnány s parametry techniky SPME.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie, standardy

Ethanol, chlorid sodný – Lach-Ner, s. r. o., ČR; hexan – Merck, Německo; helium v kvalitě 5,0, dusík v kvalitě ECD – Messer, ČR; ultračistá voda – Milli-RO 5plus firmy Millipore, USA.

Diacetyl (2,3-butandion), 2,3-pentandion, 2,3-hexandion – Merck, Německo.

### 2.2 Materiál a přístroje

Držák SPME vlákna, vlákno 65  $\mu\text{m}$  Carbowax/divinylbenzen – Supelco, USA; Twister o délce 10 mm, vnějším průměru 3,2 mm a tloušťce polydimethylsiloxanové fáze 0,5 mm – Gerstel, Německo; 20 ml headspace vialky, 2 ml šroubovací vialky, 350  $\mu\text{l}$  skleněné inserty, PTFE silikonová septa, víčka, uzavírací a otevírací kleště – CRS, USA; magnetické míchadlo – MLW RH3, Polsko; pinzeta – Chirana, ČR; plynový chromatograf CP 9001 – Chrompack, Holandsko; automatický dávkovač vzorků ASG 40 – Labio, ČR; plynový chromatograf HRGC 5300 Mega series – Carlo Erba, Itálie.

### 2.3 Příprava vzorku

Všechny pokusy vedoucí k optimalizaci podmínek stanovení a pro proměření kalibračních křivek byly prováděny na modelovém roztoku 5% obj. ethanolu ve vodě. Validační parametry byly měřeny na reálných vzorcích piv z maloobchodní sítě. Vzorky piv byly přechovávány v chladničce při teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$  až do doby analýzy.

#### 2.3.1 SBSE metoda

Před první aplikací a každým dalším použitím byl Twister kondicionován po dobu 1 h při teplotě 300  $^{\circ}\text{C}$  v atmosféře helia při průtoku 50 ml/min. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl Twister připraven pro další extrakci.

Do 20 ml headspace vialky bylo napipetováno 10 ml vzorku obohaceného přídatkem 2,3-hexandionu jako vnitřního standardu o výsledné koncentraci 40  $\mu\text{g/l}$ . Poté byl do vzorku vložen Twister. Vialka byla uzavřena septem krytým hliníkovou fólií a umístěna na magnetické míchadlo, kde byl vzorek míchán při 800  $\text{min}^{-1}$  za laboratorní teploty. Po skončení extrakce byl Twister opatrně pinzetou vyjmut, krátce opláchnut redestilovanou vodou a osušen. Pro zpětnou extrakci analytů z polydimethylsiloxanové fáze byl Twister vložen do 350  $\mu\text{l}$  skleněného insertu s 200  $\mu\text{l}$  hexanu. Tento insert byl umístěn do šroubovací vialky o objemu 2 ml a na magnetickém míchadle míchán při 800  $\text{min}^{-1}$  za laboratorní teploty. Po skončení extrakce z Twisteru byly 2  $\mu\text{l}$  eluátu nastříknuty na kapilární kolonu plynového chromatografu.

#### 2.3.2 SPME metoda

Použití SPME metody bylo založeno na postupu popsáném v práci Horáka a kol. [32].

Před prvním použitím se SPME vlákno ponechalo kondicionovat v nástříkovém prostoru chromatografu při teplotě 250  $^{\circ}\text{C}$  přes noc. Extrakce na vlákno byla prováděna z headspace prostoru nad 3 ml vzorku ve skleněné vialce o objemu 10 ml uzavřené teflonovým septem opatřeným hliníkovou fólií. Vzorek byl obohacen interním standardem (2,3-hexandion) o výsledné koncentraci 40  $\mu\text{g/l}$ . Ke zvýšení účinnosti extrakce bylo použito vysolení pomocí 1,5 g chloridu sodného. Před vsunutím vlákna byla vialka po dobu 10 s intenzivně protřepána v ruce. Vlastní SPME extrakce probíhala po dobu 30 min za laboratorní teploty bez míchání. Ihned po skončení extrakce byly analyty extrahované na SPME vlákne analyzovány plynovou chromatografií prostřednictvím jejich termální desorpce v injektoru plynového chromatografu.

### 2.4 Podmínky plynové chromatografie

Stanovení vicinálních diketonů při použití metody SBSE probíhalo na plynovém chromatografu Chrompack CP 9001, který byl opatřen

trace concentration levels these analytes can be determined with satisfactory accuracy. Moreover no thermal desorption unit is requested and so SBSE with solvent back extraction offers an effective and low-cost opportunity for the isolation of compounds in milligrams or hundredth of milligrams per litre concentration levels. By this way some flavours as esters or free medium-chain fatty acids in beer have been analyzed by gas chromatography [35, 36] or bitter acids in beer by high performance liquid chromatography [37].

The aim of this work was tested possibility of utilization of stir bar sorptive extraction for the determination of vicinal diketones in beer. After extraction to the polydimethylsiloxane phase of Twister, the solvent back extraction of sorbed compounds was applied. An aliquot of this extract was then injected into a gas chromatograph fitted with electron capture detector. Working parameters of this procedure were compared with parameters of SPME method.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Materials, standards

Analytical reagent grade ethanol, sodium chloride (Lach-Ner, Czech Republic), hexane (Merck, Germany), helium 5.0 quality, nitrogen ECD quality (Messer, Czech Republic), purified water (Milli-RO 5plus, Millipore, USA) were used.

Standards of analyzed compounds – diacetyl (2,3-butanedione), 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione were purchased from Merck (Germany).

### 2.2 Instruments

SPME holder, SPME fiber Carbowax/divinylbenzene 65  $\mu\text{m}$  (Supelco, USA). Twister – 10 mm length, 3.2 mm o. d. and 0.5 mm thickness of polydimethylsiloxane (Gerstel, Germany); 20 ml headspace vials, 2 ml screw vials, glass inserts 350  $\mu\text{l}$ , PTFE silicon septa, caps, hand crimper and hand decapper (CRS, USA); magnetic stirrer (MLW RH3, Poland); tweezer (Chirana, Czech Republic); gas chromatograph CP 9001 (Chrompack, Holland); autosampler ASG 40 (Labio, Czech Republic); gas chromatograph HRGC 5300 Mega series (Carlo Erba, Italy).

### 2.3 Sample preparation

A solution of 5 % V/V ethanol was used for the evaluation of the method and for the calibration curves. All analyzed beer samples were fresh commercial lagers of the Pilsner type, produced and bottled in the Czech Republic. Bottled beers were kept cool (4  $^{\circ}\text{C}$ ) until they were analysed.

#### 2.3.1 SBSE method

Before the first using and before any another using the Twister was reconditioned in glass tube at 300  $^{\circ}\text{C}$  with 50 ml/min helium for 1 hour. Twister was ready for another use after cooling.

Sample extraction was performed by placing 10 ml of sample amount spiked with 2,3-hexanedione as internal standard at final concentration level 40  $\mu\text{g/l}$  in a 20 ml glass vial, adding Twister. The vial was capped with aluminium coated septum and stirring at room temperature with 800 rpm. After extraction the Twister was removed with forceps, rinsed briefly in distilled water. For back extraction the Twister was placed in to 350  $\mu\text{l}$  glass insert containing 200  $\mu\text{l}$  of hexane. This insert was put in 2 ml vial and stirring at room temperature with 800 rpm again. An aliquot (2  $\mu\text{l}$ ) of this extract was injected into the GC column.

#### 2.3.2 SPME method

SPME method was based on procedure shown by Horák et al. [32].

SPME fiber was conditioned in gas chromatograph's injector heated at 250  $^{\circ}\text{C}$  over night before the first using. The extraction conditions utilized headspace SPME of 3 ml of sample in a 10 ml glass vial capped with aluminium coated teflon septum. Samples were spiked by internal standard (2,3-hexanedione) at final concentration level 40  $\mu\text{g/l}$ . For better extraction 1.5 g of sodium chloride was added. The vial with sample was vigorously shaken manually for 10 s before immersion of SPME fiber. Than headspace SPME was followed for 30 min at ambient temperature without stirring. Immediately after finishing of the extraction procedure compounds of interest were analyzed by gas chromatography using thermal desorption of fiber in injector of gas chromatograph.

### 2.4 Gas chromatographic conditions

The determination of vicinal diketones after SBSE method was carried out using a gas chromatograph Chrompack CP 9001 equipped

automatickým dávkovačem vzorků Labio ASG 40. K separaci analytů byla použita 60 m dlouhá křemenná 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. K nástřiku byl použit split-splitless injektor v režimu splitless. Split ventil byl otevřen po uplynutí 0,35 min. Injektor byl vyhříván na teplotu 220 °C, teplota detektoru elektronového záchytu byla optimalizována s ohledem na maximální citlivost při současné minimalizaci znečištění sběrné elektrody detektoru. Jako nosný plyn bylo použito helium v kvalitě 5,0, tlak na kolonu byl 150 kPa při teplotě 75 °C. Dusík v kvalitě ECD byl použit jako make-up plyn k oplachu ECD.

Při použití metody SPME bylo použito plynového chromatografu Carlo Erba HRGC 5300 Mega series. Použitá kolona, teplotní program a teploty injektoru a detektoru byly stejné jako v případě výše popsaného stanovení po extrakci SBSE. Pouze v nástřikovém prostoru injektoru byl použit vstupní liner s vnitřním průměrem pouze 1 mm. SPME vlákno bylo ponecháno v injektoru po dobu 5 min, aby došlo k jeho kondicionaci pro další stanovení.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Optimalizace teploty detektoru elektronového záchytu

Je známo, že diony poskytují dobrou odezvu na detektoru elektronového záchytu. Velikost signálu je však silně závislá na teplotě detektoru, přičemž citlivost se výrazně zvyšuje s klesající teplotou [38]. Z tohoto důvodu byla proměřena závislost odezvy vicinálních diketonů na teplotě ECD (obr. 1). Celková odezva vicinálních diketonů při teplotě 180 °C dosahovala sice jen 74 % velikosti odezvy získané při teplotě detektoru 150 °C, ale na druhé straně se snižující se teplotou detektoru významně stoupá možnost jeho kontaminace a tedy nutnost častého čištění sběrné elektrody. Proto ve všech pokusech byl detektor ECD vyhříván na teplotu 180 °C.

#### 3.2 Optimalizace metody SBSE

Posunutí fázové rovnováhy lze docílit přidávkou solí anorganických kyselin. Z tohoto důvodu byl testován vliv přidávku chloridu sodného na extrakci vicinálních diketonů, a to při přidávku 0–4 g soli k 10 ml vzorku. Z obr. 2 je patrné, že s rostoucí koncentrací soli se zvyšuje odezva vicinálních diketonů. Odezva diacetylu při přidávku 1,0, 2,0 a 4,0 g soli je 1,69, 3,45 a 3,40krát větší než odezva bez přidávku soli. Pro 2,3-pentandion je za stejných podmínek odezva 1,49, 3,45 a 7,66krát vyšší než odezva bez přidávku soli.

Přidání 4 g soli ve srovnání s přidávkou 2 g má za důsledek zvýšení celkové odezvy vicinálních diketonů jen o okolo 2 %. Při množství okolo 2 g chloridu sodného tedy zřejmě dochází k saturaci vysovolovacího efektu.

Relativní směrodatná odchylka poměru odezvy diacetylu k odezvě vnitřního standardu dosahuje hodnoty 14 %. Pro 2,3-pentandion tato veličina nabývá hodnoty 11 %. Z toho vyplývá, že pro poměr odezvy sledovaných látek k odezvě vnitřního standardu nemá uplatnění vysovolovací efektu význam. V dalších zkouškách bylo použito navážky 2 g NaCl.

Dále byla testována závislost odezvy vicinálních diketonů na době extrakce. Výsledky jsou patrné z obr. 3. Při extrakci po dobu 40 min se celková odezva všech sledovaných látek zvýšila jen o 4 % ve srovnání s dobou extrakce 20 min. Naproti tomu celková odezva po 20

with autosampler Labio ASG 40. Analytes were separated on 60 m x 0.32 mm i. d. fused silica capillary column of J&W Scientific DB 624 with 1.8 μm film thickness. The GC column was maintained at 75 °C for 10 min, ramped at a rate of 5 °C/min to 120 °C and then held at this temperature for 1 min. The split-splitless injector was used in splitless mode and the split vent was opened after 0.35 min. The injector was heated at 220 °C. The temperature of electron capture detector was optimized with respect to maximum sensitivity and present minimization of contamination of collecting electrode of the detector. The carrier gas was helium 5.0 quality with a column head pressure of 150 kPa at 75 °C. Nitrogen ECD quality was used as make-up gas for rinse of ECD.

In case of SPME a gas chromatograph Carlo Erba HRGC 5300 Mega series was used. The capillary column, temperature program and the injector and detector temperatures were the same as in SBSE method mentioned above. Just liner only with 1 mm of internal diameter was used in injector. SPME fiber was left in heated injector for 5 min and so it was conditioned for another use.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Optimization of the electron capture detector temperature

It is well known that diones give a strong signal with ECD detection. This signal is very temperature dependent with significantly more sensitivity at a decreasing temperature of the detector [38]. From this reason the dependence of responses of the vicinal diketones on ECD temperature was measured (Fig. 1). The total response of the vicinal diketones at 180 °C reached only 74 % of the response obtained at 150 °C. However with decreasing of the detector temperature the risk of contamination of ECD eminently increases and cleaning of the collecting electrode is often necessary. So the ECD was heated at 180 °C in all experiments.

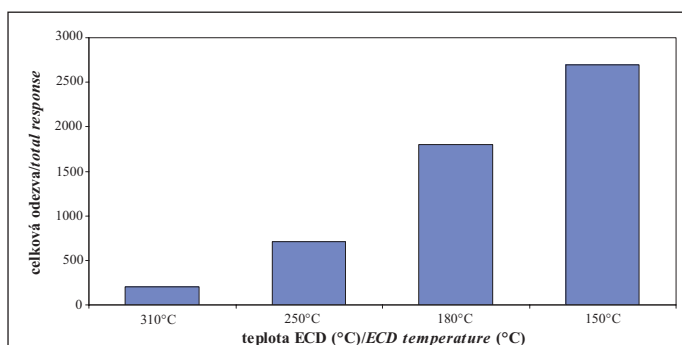
#### 3.2 Development of the method

The effect of the addition of salt of inorganic acids can influence the phase equilibrium. So the salting-out effect of the sodium chloride on extraction of the vicinal diketones was examined by addition of varying concentration of salt (0–4 g) to 10 ml of the sample. Figure 2 demonstrates that the salting-out effect obviously took place. The responses of vicinal diketones increase with the amount of salt. The responses of diacetyl are 1.69, 3.45 and 3.40 times greater than the response without salt. At the same conditions the responses of 2,3-pentanedione are greater 1.49, 3.45 and 7.66 times than without salt.

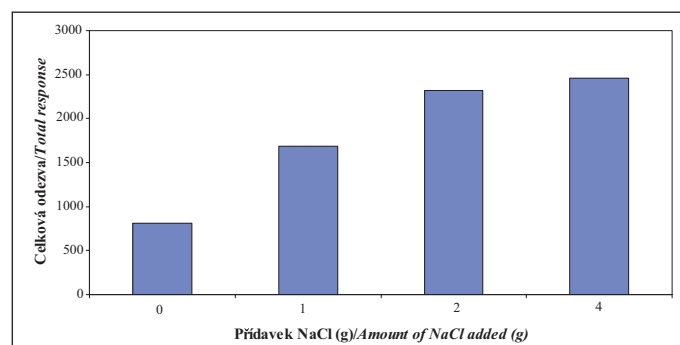
The addition of 4.0 g of salt increases the total response of the vicinal diketones only about 2 % in comparison with the addition of 2 g. The salting-out effect evidently reached saturation about 2 g of sodium chloride.

A coefficient of variation of the response ratio of diacetyl to internal standard is reaching the value 14 %. For 2,3-pentanedione this coefficient of variation takes the value 11 %. This observation demonstrates that the values of the response ratio are constant regardless of the significant salting-out effect. In all further tests the addition of 2 g of NaCl was used.

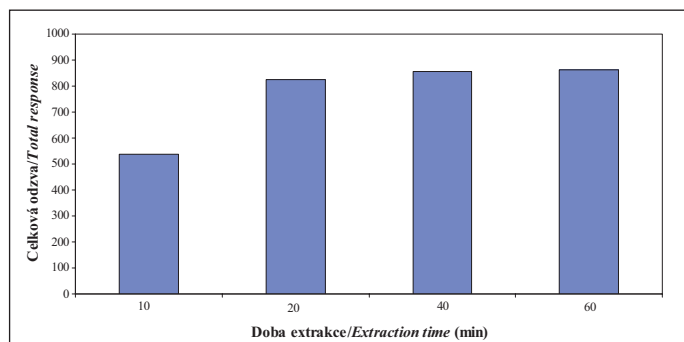
In the next experiment, the effect of the sampling time on the extraction was tested. Results are shown in Fig. 3. After 40 min extraction time the responses of all compounds of interest increased only for 4 % in comparison with 20 min sampling time. However in



Obr. 1 / Fig. 1 Závislost odezvy vicinálních diketonů na teplotě detektoru ECD / The dependence of response of the vicinal diketones on the ECD temperature



Obr. 2 / Fig. 2 Vliv přidávku soli (NaCl) na celkovou velikost odezvy vicinálních diketonů / Effect of the addition of salt (NaCl) on the total response of the vicinal diketones



Obr. 3 / Fig. 3 Vliv délky extrakce Twister míchací tyčinkou na celkovou odezvu vicinálních diketonů / Effect of the sampling time on the total response of vicinal diketones extracted by the Twister stir bar

min extrakce vzrostla o 53 % v porovnání s extrakční dobou 10 min. Pro další experimenty byla zvolena extrakční doba 20 min.

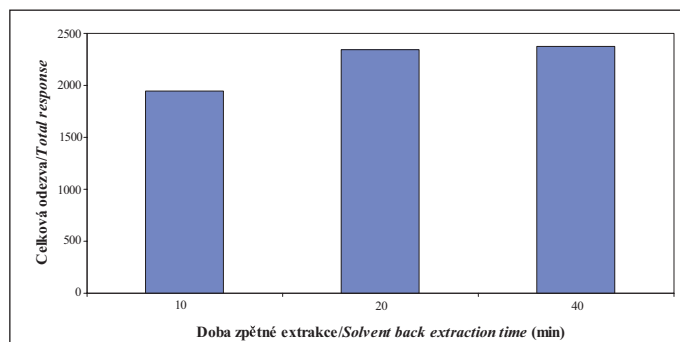
Vliv různé doby zpětné extrakce látek absorbovaných Twisterem do rozpouštědla na velikost celkové odezvy sledovaných látek ukazuje obr. 4. Zpětná extrakce látek je zřejmě úplná již po 20 min. Po 20 min reextrakce totiž odezvy vzrostly o 20 % ve srovnání s velikostí odezvy po 10 min zpětné extrakce. Naproti tomu pokud se reextrakční doba prodloužila z 20 min na 40 min, velikost ploch analyzovaných látek se zvětšila o necelé 2 %. Proto v dalších pokusech byla prováděna zpětná extrakce po dobu 20 min.

### 3.3 Validace metody

Pracovní charakteristiky optimalizované SBSE metody jsou uvedeny v tab. 1 až 3 společně s parametry SPME postupu.

Pro vicinální diketony byly proměřeny pětibodové kalibrační křivky v koncentračním rozsahu 0,100 mg/l až 0,400 mg/l pro diacetyl a 0,010 mg/l až 0,400 mg/l pro 2,3-pentandion v 5% obj. roztoku ethanolu. Lepší shody bylo dosaženo proložení jednotlivých kalibračních bodů kvadratickou křivkou namísto lineární regrese. Korelační koeficienty při lineární regresi byly lepší než 0,996, při kvadratické lepší než 0,997. Z porovnání hodnot korelačních koeficientů techniky SBSE a SPME (tab. 1) vyplývá, že mezi metodami není rozdíl, avšak diacetyl není možné metodou SBSE měřit v nižších koncentracích (< 0,100 mg/l).

Opakovatelnost metody byla zjištěna opakovanou sorpční extrakcí na míchací tyčince jednoho a téhož vzorku piva pětkrát během jednoho dne. Poté byl tentýž vzorek piva obohacen přidavkem vicinálních diketonů (0,150 mg/l každé látky). Při porovnání s SPME postupem (tab. 2) je vidět, že 2,3-pentandion poskytuje srovnatelně výborné výsledky opakovatelnosti v obou metodách. V případě diacetylu je však u techniky SBSE dosaženo výrazně horších výsledků. Zřejmě je to možné vysvětlit následovně: extrakce látky do polydimethylsiloxanové fáze nanesené na míchací tyčince lze charakterizovat pomocí distribuce analytu mezi oktánolem a vodou popsané pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol-voda ( $K_{o/w}$ ) [39, 40]. Hodnota  $\log K_{o/w}$  pro 2,3-pentandion



Obr. 4 / Fig. 4 Vliv různé délky zpětné extrakce Twisteru na celkovou odezvu vicinálních diketonů / Influence of different solvent back extraction times on the total responses of vicinal diketones extracted by the Twister stir bar

comparison with 10 min sampling time the total response was greater for 53 % after 20 min sampling time. So for another experiments a 20-min sampling time can be selected.

Fig. 4 demonstrates the influence of different solvent back extraction times to the total responses of the compounds of interest. The solvent back extraction was obviously completed after 20 min. The total responses increased for 20 % after 20 min reextraction time in contrast with 10 min of solvent back extraction. On the other hand if the solvent back extraction time increased from 20 min to 40 min, the peak area of analysed compounds increased less than 2 %. The 20-min solvent back extraction time was selected for further experiments.

### 3.3 Method validation

Working characterizations of optimized SBSE method including parameters of SPME procedure are shown in tab. 1 up to 3.

The five point's calibration curves throughout a range of concentrations from 0.100 mg/l to 0.400 mg/l for diacetyl and from 0.010 mg/l to 0.400 mg/l for 2,3-pentanedione in the 5 % V/V ethanol were measured. A slightly better fit is reached by a quadratic curve than to a linear curve. The correlation coefficients to straight lines were better than 0.996, for quadratic curves fit were better than 0.997. The comparison of correlation coefficients of SBSE and SPME methods (tab. 1) results no statistical differences but diacetyl couldn't be measured at low concentration levels (< 0.100 mg/l) by SBSE methods.

The repeatability of the method was investigated by repeating stir bar sorptive extraction (5 times during the same day) of one and the same beer sample. Then the same beer sample was spiked by vicinal diketones at concentration level 0.150 mg/l of each compound. 2,3-pentanedione succeeded similar good results of repeatability by SBSE method as by SPME procedure (tab. 2). In case of diacetyl SBSE technique showed much worse output as SPME method. This could be explained by this. Efficiency of analyte partitioning into the polydimethylsiloxane phase on the stir bar is similar to the distribu-

Tab. 1 Typ regrese a korelační koeficienty pro kalibraci vicinálních diketonů při použití metody SBSE a SPME / Type of regression and correlation coefficients for the calibration of vicinal diketones obtained by SBSE and SPME method

Látka / Compound	SBSE		SPME	
	Korelační koeficient / Correlation coefficient		Korelační koeficient / Correlation coefficient	
	Lineární regrese / Linear curve	Polynom 2. řádu / Quadratic curve	Lineární regrese / Linear curve	Polynom 2. řádu / Quadratic curve
diacetyl	0.998	0.999	0.986	0.999
2,3-pentandion / 2,3-pentanedione	0.996	0.997	0.993	0.999

Tab. 2 Opakovatelnost stanovení vicinálních diketonů v pivu metodou SBSE a SPME / Repeatability of the SBSE and SPME procedure for the determination of vicinal diketones in beer

Látka / Compound	SBSE		SPME	
	Opakovatelnost / Repeatability RSD (%)	Přídavek 0,150 mg/l Opakovatelnost / Spike 0,150 mg/l Repeatability RSD (%)	Opakovatelnost / Repeatability RSD (%)	Přídavek 0,150 mg/l Opakovatelnost / Spike 0,150 mg/l Repeatability RSD (%)
diacetyl	20	12	6.6	3.7
2,3-pentandion / 2,3-pentanedione	5.6	3.7	5.6	4.1

činí -0,85, zatímco pro diacetyl tato veličina nabývá hodnoty -1,34. Pravděpodobně horší výtěžnost a i opakovatelnost diacetylu je dána tím, že v důsledku jeho menší molekulové hmotnosti a vyšší polaritativnosti má tato látka větší tendenci zůstat spíše ve vodní fázi než přejít do nepolární polydimethylsiloxanové vrstvy. Naproti tomu SPME vlákno s fází Carbowax/divinylbenzen je podstatně vhodnější pro extrakci polárních sloučenin.

Robustnost SBSE metody byla ověřena pomocí porovnání odezvy vicinálních diketonů o koncentraci 0,150 mg/l každé látky v závislosti na různém obsahu ethanolu ve vzorku (0 %, 0,5 %, 1,0 %, 4,0 %, 5,0 %, 8,0 % obj.). Poměr odezvy diacetylu a vnitřního standardu vykazuje RSD 5,1 %, pro poměr odezvy 2,3-pentandionu a vnitřního standardu je RSD 4,3 %. Metoda SPME z výše popsaných důvodů poskytuje lepší výsledky RSD (tab. 3).

#### 4 ZÁVĚR

Na základě provedených experimentů byly navrženy tyto pracovní podmínky metody SBSE pro stanovení vicinálních diketonů v pivu: 10 ml vzorku s 2,3-hexanedionem jakožto vnitřním standardem (výsledná koncentrace 40 µg/l) ve vialce o celkovém objemu 20 ml a přidavkem 2,0 g chloridu sodného. Vzorek míchat Twisterem (délka 10 mm, tloušťka polydimethylsiloxanové fáze 0,5 mm) při 800 min<sup>-1</sup> za laboratorní teploty po dobu 20 min. Zpětná extrakce analytů se provede mícháním Twisteru v 200 µl hexanu při 800 min<sup>-1</sup> během 20 min při laboratorní teplotě.

Technika sorpční extrakce na míchací tyčince následovaná zpětnou extrakcí vicinálních diketonů z polydimethylsiloxanové fáze do organického rozpouštědla je levnou, jednoduchou, alternativní metodou za předpokladu, že se diacetyl vyskytuje ve vzorku v koncentrační úrovni nad 0,100 mg/l. Při nižší koncentraci vzhledem k malé účinnosti extrakce polárního diacetylu do nepolární fáze Twisteru nelze metodu SBSE použít. To je zásadní nevýhoda, která omezuje použití tohoto postupu oproti SPME technice. SPME postup je i časově méně náročný, vzhledem ke křehkosti vlákna, ale vyžaduje zručné a opatrné zacházení.

#### 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.

Lektorovala doc. Ing. Daniela Šmogrovičová, CSc.  
Do redakce došlo 1. 12. 2008

#### Literatura / References

- Stewart, G.: Fermentation-yesterday, today and tomorrow. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **14**, 1977, 1–15.
- Fix, G.: Diacetyl: Formation, reduction and control. Brew. Tech. **1**(2), 3.12, 1993.
- Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., Penttilä, M.: Recent advances in the malting and brewing industry. J. Biotechnol. **65**, 1998, 85–98.
- Sigsgaard, P.: Breeding of new brewer's yeast. Cerevisia Biotechnol. **19**, 1994, 29–32.
- Wainwright, R.: Diacetyl – a review, Part I – analytical and biochemical considerations: Part II – brewing experience. J. Inst. Brew. **79**, 1973, 451–470.
- Shimwell, J. L., Kirkpatrick, W. F.: New light on the 'Sarcina' question. J. Inst. Brew. **45**, 1939, 137–145.
- Boulton, C., Quain, D.: Biochemistry of fermentation – vicinal diketones. In: Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science, United Kingdom, 2001, 128–137.
- Hansen, J., Kiehlbrandt, M.: Modification of biochemical pathways in industrial yeast. J. Biotechnol. **49**, 1996, 1–12.
- Gjertsen, P., Unstrup, S., Trolle, B.: Diacetyl im Bier. Eine schnelle und empfindliche Methode zur Bestimmung von Diacetyl im Bier. Monatsschr. Brauerei **17**, 1964, 232–234.
- Esser, K. D., Kremkow, C.: Bestimmung des Diacetylgehalts im Bier. Monatsschr. Brauerei **23**, 1970, 11–14.

Tab. 3 Robustnost SBSE a SPME metody vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka (RSD) poměru ploch sledované látky k ploše vnitřního standardu / *Robustness of SBSE and SPME method expressed as relative standard deviation (RSD) of the response ratios of compounds of interest and internal standard*

Látka / Compound	SBSE Robustnost / Robustness RSD (%)	SPME Robustnost / Robustness RSD (%)
diacetyl	5.1	3.9
2,3-pentandion / 2,3-pentandione	4.3	3.0

tion of the analyte between octanol and water as described by octanol-water partition coefficient ( $K_{o/w}$ ) [39, 40]. The value of the log  $K_{o/w}$  for 2,3-pentanedione is -0.85 while the value of log  $K_{o/w}$  for diacetyl reached only -1.34. So the likely reason for poor recovery and also repeatability is related to the fact that the lower molecular weight diacetyl is too polar and tends to stay behind in the aqueous phase. On the other hand SPME fibers coated with Carbowax/divinylbenzene are much more suitable for extraction of polar compounds.

The robustness of the method was tested as the influence of varying concentration of ethanol ((0 %, 0.5 %, 1.0 %, 4.0 %, 5.0 %, 8.0 % V/V) to the extraction of vicinal diketones. The relative standard deviations of response ratios for diacetyl to 2,3-hexanedione and for 2,3-pentanedione to 2,3-hexanedione are 5.1 % and 4.3 %, respectively. SPME procedure gave better values of RSD according above mentioned reasons (tab. 3).

#### 4 CONCLUSIONS

The procedure SBSE for the determination of the vicinal diketones in beer devised for the practical extraction utilized 10 ml of the sample with addition of internal standard (2,3-hexanedione at final concentration 40 µg/l) in 20 ml vial including 2.0 g of sodium chloride and stirring with Twister (length 10 mm, film thickness of polydimethylsiloxane phase 0.5 mm) with 800 rpm for 20 min at room temperature. Solvent back extraction of the Twister used 200 µl of hexane with 800 rpm for 20 min at room temperature.

The proposed stir bar sorptive extraction followed by solvent back extraction of the vicinal diketones from the polydimethylsiloxane phase to organic solvent is low cost, easy to use and an alternative procedure providing that the concentration of diacetyl in beer is higher than 0.100 mg/l. At low concentration levels due to poor efficiency of extraction of polar diacetyl into non-polar Twister phase the SBSE method cannot be used. This fundamental drawback limits using of this procedure compared to SPME technique. SPME process is also a less time consuming but due to the fiber fragility the competent and careful manipulation is necessary.

#### Acknowledgements

The financial support by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM 6019369701) and by members of the Czech Beer and Malt Association is gratefully acknowledged.

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

- Zürcher, Ch., Gruss, R.: Vergleich von gaschromatographischer und spektrophotometrischer VDK-Bestimmung. Monatsschr. Brauerei **30**, 1977, 13–15.
- Morrison, N. M., Bendiak, D. S.: Today's diacetyl: the total vicinal diketone profile of beer. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **24**, 11987, 14–20.
- Hodge, J. E.: Origins of flavors in foods. Nonenzymatic browning reactions. In Symposium on Foods: The Chemistry and Physiology of Flavors; Schultz, H. W., Day, E. A., Libbey, L., M.: AVI Publishing Co.: Westport, CT, 1967, 465–491.
- Engan, S.: Off-flavours in beer. Brauwelt Int. III/1991, 217–223.
- Montville, T. J., Meyer, M. E., Hau, A. H. M., Huang, G. T. C.: High-pressure liquid chromatography and wide-bore capillary gas-liquid chromatography methods for quantification of acetoin and diacetyl from bacterial cultures. J. Microbiol. Methods **7**, 1987, 1–8.
- Baumann, R. A., Gooijer, C., Velthorst, N. H., Frei, R. W.: Sensitive detection of diacetyl in liquid chromatography using time-resolved sensitized phosphorescence. Anal. Chem. **57**, 1985, 1815–1818.
- Matsuura, H., Fujiyama, K., Minagawa, N., Sawa, J.: Determination of acetoin, diacetyl and acetaldehyde in foods by HPLC. Bunseki Kagaku **39**, 1990, 405–409.
- Moree-Testa, P., Saint-Jalm, Y.: Determination of  $\alpha$ -dicarboxyl compounds in cigarette smoke. J. Chromatogr. **217**, 1981, 197–208.

19. Verhagen, L. C., de Jong, R. L., Strating, J.: Analysis of vicinal diketones in beer by high-performance liquid chromatography. *Proc. Cong. Eur. Conv.* **21**, 1987, 615–622.
20. Yamaguchi, M., Ishida, J., Xuan-Xuan, Z., Nakamura, M., Yoshitake, T.: Determination of glyoxal, methylglyoxal, diacetyl and 2,3-pentandione in fermented foods by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liquid Chromatogr.* **17**, 1994, 203–211.
21. Damiani, P., Burini, G.: Determination of diacetyl in butter as 2,3-diaminonaphthalene derivative, using a fluorometric procedure or reverse phase liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **71**, 1988, 462–465.
22. McCarthy, L. S.: Analysis of diacetyl and 2,3-pentanedione in beer by HPLC with fluorometric detection. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 1995, 178–181.
23. Pejin, J. D., Grujic, O. S., Marjanovic, N. J., Marjanovic, N. J., Vujić, D. N., Kocić-Tanackov, S. D.: Determination of diacetyl and 2,3-pentandione in beer by GC/MS using solid-phase extraction columns. *APTEFF* **33**, 2002, 45–54.
24. Pejin, J., Grujic, O., Markov, S., Kocić-Tanackov, S.: Application of GC/MS method using SPE columns for quantitative determination of diacetyl and 2,3-pentandione during beer fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **64**, 2006, 52–60.
25. Ulbert, F.: Headspace Gas Chromatographic Estimation of Some Yogurt Volatiles. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **74**, 1991, 630–634.
26. Buckee, G. K., Mundy, A. P.: Determination of vicinal diketones in beer by gas chromatography (headspace technique) – collaborative trial. *J. Inst. Brew.* **100**, 1994, 247–253.
27. Hardwick, B. C.: Selective Measurement of Acetohydroxy Acid Precursors of Vicinal Diketones in Beer by Decarboxylation with Aniline Hydrochloride. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**, 1994, 106–110.
28. Lee, S. M., Drucker, D. B.: Analysis of acetoin and diacetyl in bacterial culture supernatants by gas-liquid chromatography. *J. Clinical Microbiol.* **2**, 1975, 162–164.
29. Čulík, J., Horák, T., Jurková, M., Kellner, V.: Vliv zvoleného způsobu kalibrace a typu kolony na výsledky získané při stanovení vicinálních diketonů metodou headspace. Poster na Mezinárodní pivovarnické a sladovnické konferenci, Bratislava, 1998.
30. Arthur, C. L., Pawliszyn, J.: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused optical fibres. *Anal. Chem.* **62**, 1990, 2145–2148.
31. Horák, T., Kellner, V., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P.: Solid phase microextraction – the new alternative for the determination of the vicinal diketone in beer. Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Budapest, Fachverlag Hans Carl, 2001, 757–763.
32. Horák, T., Čulík, J., Čejka, P., Jurková, M., Kellner, V.: Stanovení vicinálních diketonů v pivu metodou SPME. *Kvasny Prum.* **47**, 2001, 316–321.
33. 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 Separation.* **11**, 1999, 737–747.
34. Sandra, P., Baltussen, E., David, F., Hoffmann, A.: A novel extraction technique for aqueous samples: Stir bar sorptive extraction. *AppNote 1/2000*, Gerstel, 2000, 1–5.
35. Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V.: Extrakce na míchací tyčince – nová možnost při analýze některých sensoricky aktivních látek v pivu. *Kvasny Prum.* **54**, 2008, 102–107.
36. 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.
37. 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. *AppNote 5/2001*, Gerstel, 2001, 1–6.
38. Penton, Z.: Determination volatiles in beer with automated SPME and GC/MS/ECD. *Varian Application Note*, Number 15.
39. De Bruin, L. S., Josephy, P. D., Pawliszyn, J. B.: Solid-Phase Microextraction of Monocyclic Aromatic Amines from Biological Fluids. *Anal. Chem.* **70**, 1998, 1986–1992.
40. Beltran, J., Lopez, F. J., Cepria, O., Hernandez, F.: Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water symplex. *J. Chromatogr. A*, 808, 1998, 257–263.



## Vitamins 2008

Od 9. do 11. září 2008 se uskutečnil na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně 8. ročník mezinárodní konference VITAMINS – Nutrition and Diagnostics. Kvasný průmysl byl již tradičně mediálním partnerem akce. Hlavními organizátory byly společnost Radanal, s. r. o., Pardubice, Společnost pro výživu, Praha a Univerzita Tomáše Bati (UTB) ve Zlíně. Záštitu nad konferencí převzali ministr školství, mládeže a tělovýchovy Mgr. Ondřej Liška a rektor UTB prof. Ignác Hoza.

Konference byla zařazena do systému vzdělávání České lékařnické komory, České asociace sester a Komory vysokoškolsky vzdělaných odborných pracovníků ve zdravotnictví ČR. Do Zlína přijelo cca 200 účastníků z 15 zemí.

Registrováno bylo 36 přednášek a 56 posterů. Přednášky byly rozděleny do bloků: „Separace a detekce bioaktivních látek“, „Otázka co pít“, „Doplňky stravy“. Jednacím jazykem byla angličtina, jeden blok věnovaný doplňkům stravy byl prezentován v češtině. Každý z nás, kdo se někdy v minulosti zúčastnil některé z předcházejících konferencí, potvrdí, že jde o konference velmi užitečné a úspěšné.

Jedním ze zajímavých témat byla změna životního stylu lidí na počátku 21. století. Současná generace při změně životního stylu směrem k sedavému zaměstnání, častému pobytu v dopravních prostředcích a úbytku pohybu ztratila rovnováhu mezi příjmem a výdejem energie. To je zásadní problém. Je to vidět na USA, které jsou vývojově před námi, a odkud k nám přišel třeba způsob rychlého stravování. Studie ukazují, že většina populace bude trpět obezitou a nemocemi, které se na ni navazují. Cílem konference bylo přispět k rozšiřování pochopení, že úspěšné používání různých doplňků stravy je podmíněno znalostmi o jejich působení. Jinak doplňky stravy nebudou pomáhat a jejich nadužívání může i škodit. Stále platí, že například na hubnutí je nejlépejší pilulkou pohyb, ale nesmíme zapomínat na správnou výživu. Na konferenci se setkali lékaři, kteří se zabývají zdravotními problémy spojenými s nesprávnou výživou, odborníci na technologii výroby potravin, jejich analýzu a hodnocení.

Z pronesených příspěvků je vydán sborník. Informace byly předány i do časopisů, věnujících se výživě a zdravému životnímu stylu.

Podle materiálů Radanal, s. r. o., zpracoval Vladimír Kellner