



Možnosti využití moderních metod přípravy vzorků pro plynově chromatografické analýzy při analýze nápojů a zejména piva. Část 2. – Extrakce na míchací tyčince

Possibilities of Utilization of Modern Sample Preparation Methods for Gas Chromatographic Analysis of Beverages and especially Beer. Part II. – Stir Bar Sorptive Extraction

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

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2

Research Institute of Brewing and Malting PLC, Brewing Institute Prague, Lípová 15, CZ-120 44 Prague 2, Czech Republic
e-mail: horak@beerresearch.cz

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Možnosti využití moderních metod přípravy vzorků pro plynově chromatografické analýzy při analýze nápojů a zejména piva. Část 2. – Extrakce na míchací tyčince. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 10, s. 390–395.

Mezi moderními postupy pro přípravu vzorků zastává extrakce na míchací tyčince významné místo. Tato technika se používá hlavně pro extrakci těkavých a středně těkavých látek z kapalných vzorků. Práce diskutuje vliv důležitých parametrů nutných k optimalizaci SBSE extrakce (doba extrakce, pH vzorku, iontová síla, vliv organických činidel, teploty, míchání, derivatizace, desorpční podmínky). Pozornost je také věnována vývoji nových fází, které by umožnily další rozšíření použití SBSE techniky. Práce se také zabývá přehledem aplikací SBSE metody při analýze nápojů a zejména piva.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Possibilities of utilization of modern sample preparation methods for gas chromatographic analysis of beverages and especially beer. Part II. – Stir Bar Sorptive Extraction. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 10, p. 390–395.

Stir bar sorptive extraction takes an important role in modern sample preparation procedures. This method is used mainly for the extraction of volatile and semi-volatile organic compounds from aqueous samples. This review is focused on overview of the important parameters to be evaluated in the optimization of SBSE extraction (extraction time, sample pH, ionic strength, effect of organic agents, temperature, agitation, derivatization, desorption conditions). Attention is also alerted to developments of new phases which are necessary for another expansion of SBSE technique. This work also reports a number of SBSE applications in beverage analysis especially in brewing analysis.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Möglichkeiten der Ausnutzung von modernen Methoden der Mustervorbereitung für Gas – chromatografische Analysen der Getränke insbesondere des Bieres. Teil 2. – Extraktion am Rührstab. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 10, S. 390–395.

Unter den modernen Muster Vorbereitungsverfahren nimmt Extraktion am Rührstab einen bedeutenden Platz ein. Diese Technik wird oftmals zur Extraktion der flüchtigen und mittelflüchtigen Stoffe aus den flüssigen Mustern angewandt. In dem Artikel wird der Einfluss zur Optimierung der SBSE Extraktion wichtigen Parameter (Extraktionszeit, pH Wert des Musters, Ionkraft, Einfluss des organischen Mittels, der Temperatur, des Rührens, der Derivatization und der Desorptionsbedingungen) diskutiert. Die Aufmerksamkeit wird auch der Entwicklung der neuen Phasen, die eine weitere SBSE Technik Verbreiterung ermöglichen, gewidmet. Der Artikel befasst sich auch mit der Übersicht von Applikationen der SBSE Methode der Getränkeanalyse vorzugsweise des Bieres.

Klíčová slova: plynová chromatografie, příprava vzorků, extrakce na míchací tyčince (SBSE), pivo, pivovarská analytika

Key words: gas chromatography, sample preparation, stir bar sorptive extraction (SBSE), beer, brewing analytics

1 ÚVOD

Jak vyplynulo z předešlé části této série článků [1], současné trendy v analytické chemii jednoznačně směřují ke zjednodušení a miniaturizaci přípravy vzorků. Dalším významným rysem je minimalizace spotřeby organických rozpouštědel a zpracovávaného objemu vzorku. V konečném důsledku to vede také ke snížení finančních nákladů na analýzu.

Mikroextrakce se dá definovat jako extrakce, kde objem fáze, do které se extrahuje, je velmi malý ve srovnání s objemem extrahovaného vzorku. Většinou extrakce není úplná, dochází k vyextrahování pouze podílu stanovených látek. Kolik látky rozpuštěné v roztoku se vyextrahuje do extrakční fáze, závisí od afinity látky k extrakční fázi, rozdělovacího koeficientu látky mezi vzorkem a extrakční fází a také od fyzikálně chemických vlastností látky [2, 3].

Typickým příkladem takových postupů je mikroextrakce na pevné fázi (SPME) a extrakce na míchací tyčince (SBSE). Jde o techniky, kde během jednoho kroku dochází k extrakci a zároveň zakoncentrování sledovaných analytů, čímž se zároveň redukuje i čas nutný pro přípravu vzorku.

Extrakce na míchací tyčince byla vyvinuta ve Výzkumném ústavu pro chromatografii (Kortrijk, Belgie) v roce 1999 týmem pod vedením prof. Sandry [4]. Technika byla uvedena na trh firmou Gerstel (Mülheim, Německo) pod komerčním názvem Twister. SBSE je postup

1 INTRODUCTION

As the previous article of this series shown [1] current trends in analytical chemistry unambiguously lead up to the simplification and miniaturization of sample preparation. Another important feature is minimization of organic solvent and sample volumes. The reduction of analytical cost is also another positive effect.

Microextraction can be defined as an extraction procedure where the volume of the extracting phase is very small in comparison with the volume of the sample. In many cases the extraction is not exhaustive with only a part of fraction of determined compounds. The extraction efficiency depends upon solute partitioning between the sample matrix and the extraction phase. Partition is controlled by the physicochemical properties of the solute, the sample matrix and the extraction phase. [2, 3]

Solid-phase microextraction (SPME) and stir bar sorptive extraction (SBSE) represent typical examples of these procedures. These methods combine extraction and concentration of the analytes of interest in a single step, thereby the time necessary to prepare the samples is reduced.

Stir bar sorptive extraction was developed at the Research Institute of Chromatography (Kortrijk, Belgium) in 1999 by Sandra and co-workers [4]. The technique was commercialized by Gerstel (Mülheim, Germany) under the name Twister. SBSE represents procedure ca-



umožňující extrakci a zakoncentrování látek z kapalných matric bez použití rozpouštědel [5, 6].

2 PRINCIP A TEORIE EXTRAKCE NA MÍCHACÍ TYČINCE

Tato sorpčně extrakční metoda je založena na stejných principech jako SPME – na rozdělení mezi matricí vzorku a extrakční fází. Na rozdíl od SPME vlákna pokrytého polymerem, se SBSE skládá ze tří hlavních částí: 1) magnetické míchací tyčinky, která je nutná k přenosu rotačního momentu magnetického míchadla do kapalného vzorku, 2) tenkého skleněného pouzdra, ve kterém je umístěna magnetická míchací tyčinka a 3) vrstvy polydimethylsiloxanového (PDMS) sorbentu, do kterého se analyty extrahují. Skleněný obal míchací tyčinky je důležitý k tomu, aby zabránil rozkladu PDMS vrstvy, která by jinak mohla být katalyzována kovy magnetické míchací tyčinky [7]. Míchací tyčinka je obvykle dlouhá 10–20 mm pokrytá 25–125 μl (0,3–1,0 mm tloušťka vrstvy) PDMS.

Analyty jsou rozděleny nebo absorbovány do PDMS fáze. Adsorpce je podstatně slabší proces než adsorpce, takže látky mohou být desorbovány při nižších teplotách, což je příznivé pro stanovení termolabilních látek. Další důležitou skutečností je, že kapacita PDMS fáze pro danou látku není ovlivněna přítomností vysokého obsahu vody nebo i jiných látek, protože v PDMS fázi se každá sloučenina vyznačuje svým vlastním rovnovážným stavem a nedochází tak k nežádoucímu vytěšňování. Na druhé straně degradační částí PDMS fáze obsahují typické křemíkové hmotnostní fragmenty, které se objeví v chromatogramu při použití hmotnostního detektoru [3,4].

Extrakce látky z kapalné fáze do extrakční fáze se řídí rozdělovacím koeficientem látky mezi PDMS a kapalnou fází. Tento rozdělovací koeficient velmi dobře koreluje s rozdělovacím koeficientem oktanol-voda ($K_{o/w}$). I když to není úplně přesné, tak hodnota rozdělovacího koeficientu oktanol-voda poskytuje velmi dobrou představu, jestli vůbec sloučenina bude a pokud ano, tak jak dobře, extrahována pomocí metody SBSE [3,5].

Rozdělovací koeficient mezi PDMS a vodnou fází ($K_{PDMS/w}$) je definován jako poměr mezi koncentrací analytu v PDMS fázi (C_{PDMS}) a koncentrací ve vodě (C_w) v rovnovážném stavu. Tento poměr je roven poměru množství látky v PDMS (m_{PDMS}) k množství tohoto analytu ve vodné fázi (m_w) násobeno fázovým poměrem (kde odpovídá V_w/V_{PDMS}). [3,5]. (Viz rovnice (1))

$$(1) K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = C_{PDMS}/C_w = m_{PDMS}/m_w \times V_w/V_{PDMS} = \beta \times m_{PDMS}/m_w$$

Výtěžnost, vyjádřená jako poměr vyextrahovaného množství látky (m_{PDMS}) k množství látky v kapalné fázi ($m_o = m_w + m_{PDMS}$), je závislá na rozdělovacím koeficientu $K_{PDMS/w}$ a na β , viz rovnice (2).

$$(2) m_{PDMS}/m_o = (K_{PDMS/w} / \beta) / (1 + (K_{PDMS/w} / \beta))$$

Z rovnice (2) vyplývá, že výtěžnost extrakce ovlivňují pouze dva faktory – $K_{PDMS/w}$ a β . Čím vyšší je množství PDMS a čím nižší je β , tím vyšší bude extrakční výtěžnost [3, 5].

V SPME technice maximální objem PDMS nanosený na vlákno činí okolo 0,5 μl při tloušťce filmu 100 μm . Při typickém objemu vzorku 10 ml je fázový poměr 2×10^4 . Z toho vyplývá, že kvantitativní extrakce bude dosaženo pouze pro sloučeniny, jejichž $K_{o/w} > 10^5$. Na druhé straně při SBSE metodě je na míchací tyčince nanoseno 25–125 μl PDMS, a tudíž situace je mnohem příznivější. Míchací tyčinka pokrytá 100 μl PDMS fáze může být použita k extrakci 10 ml vodného vzorku a povede to k hodnotě koeficientu s hodnotou 100. To naznačuje, že látky s $K_{o/w}$ větší než 500 budou kvantitativně extrahovány do PDMS fáze nanosené na míchací tyčinku. Pro analyty s $K_{o/w} < 10^5$ tím dochází nejen k lepší kvantifikaci, ale především se velmi zlepšuje citlivost, a to 50 až 250krát [3,4,8].

3 EXTRAKČNÍ POSTUP

Praktické provedení sorpční extrakce na míchací tyčince spočívá v umístění vzorku do headspace vialky nebo do jiné vhodné uzavíratelné nádoby. Do vzorku se vloží míchací tyčinka a vzorkem se míchá do ustanovení rovnováhy, obvykle mezi 30 až 240 min. Doba extrakce závisí na takových parametrech, jako jsou objem vzorku, rychlost míchání, teplota a velikost míchací tyčinky. Všechny tyto parametry se musí při konkrétní aplikaci optimalizovat. Po skončení extrakce se pomocí pinzety míchací tyčinka vyndá a opláchně se

pable of extracting and concentrating compounds from liquid matrices without the use of solvents [5, 6].

2 PRINCIPLE AND THEORY OF STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION

This sorptive extraction technique is based on the same principles as SPME – partitioning of solute between the sample matrix and the extraction phase. In contrast of the SPME fibre coated by polymer, SBSE has three essential parts: 1) a magnetic stirring rod, which is necessary for transferring the rotation movement of a magnetic stirring plate to the liquid sample, 2) a thin glass jacket that covers the magnetic stirring rod and 3) a layer of polydimethylsiloxane (PDMS) sorbent into which the analytes are extracted. The glass envelope is essential to prevent the decomposition of the PDMS layer, which would otherwise be catalysed by the metals in the magnetic stirring rod [7]. Stir bar is usually of 10–20 mm length and coated with 25–125 μl (0.3–1.0 mm thickness of layer) of PDMS.

Analytes are partitioned or sorbed into the volume of PDMS phase. The sorption is a much weaker process than adsorption. So compounds can be desorbed at lower temperatures thus is positive for the determination of thermolabile compounds. Another important fact is that the capacity of PDMS phase for a certain compound is not influenced by the presence of high amounts of water or other analytes, because all solutes have their own partitioning equilibrium into the PDMS phase and displacement does not occur. On the other hand degradation fragments of PDMS sorbent all contain characteristic silicone mass fragments which can be detected in chromatogram using of mass selective detectors [3,4].

The extraction of compounds from the aqueous phase into the extraction medium is determined by the partition coefficient of the analytes between the PDMS and the aqueous phase. This partitioning coefficient has been correlated with the octanol-water ($K_{o/w}$). Although it is not fully correct, the octanol-water distribution coefficient gives a very good idea if and how successfully a given compound can be extracted with SBSE method [3,5].

The distribution coefficient between PDMS and aqueous phase ($K_{PDMS/w}$) is defined as the ratio of the analyte concentration in PDMS (C_{PDMS}) and of the concentration in water (C_w) at equilibrium. This ratio is equal to the ratio of the mass of the solute in the PDMS (m_{PDMS}) over the mass of the solute in the aqueous phase (m_w) times the phase ratio (where correspond V_w/V_{PDMS}). [3,5]. (See Eq. (1))

$$(1) K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = C_{PDMS}/C_w = m_{PDMS}/m_w \times V_w/V_{PDMS} = \beta \times m_{PDMS}/m_w$$

The recovery, expressed as the ratio of the extracted amount of analyte (m_{PDMS}) over the original amount of analyte in aqueous phase ($m_o = m_w + m_{PDMS}$), is dependent upon the distribution coefficient $K_{PDMS/w}$ and on β , as described in Eq. (2).

$$(2) m_{PDMS}/m_o = (K_{PDMS/w} / \beta) / (1 + (K_{PDMS/w} / \beta))$$

Result from Eq.(2) shows that only two factors affect the recovery of an analyte, $K_{PDMS/w}$ and β . The higher the PDMS amount, the lower β and the higher extraction efficiency. [3,5]

In SPME the maximum volume of PDMS coated on to the fiber is about 0.5 μl and film thickness 100 μm . For a typical sample volume of 10 ml the phase ratio is 2×10^4 , implying that quantitative extraction is obtained only for compounds for which $K_{o/w} > 10^5$. On the other hand, in SBSE method 25 – 125 μl PDMS coating are used. A stir bar coated with 10 μl PDMS can easily be used to extract 10 ml of aqueous sample, leading to a value equal to 100, which implies that analytes with a $K_{o/w}$ in excess of 500 are quantitatively extracted in a PDMS phase coated on a stir bar. For compounds with $K_{o/w} < 10^5$ not only better quantification is achieved but first of all sensitivity increases by a factor of 50–250 [3,4,8].

3 EXTRACTION PROCEDURE

In practice stir bar sorptive extraction is performed by placing a sample in a headspace vial or other container. The stir bar is added and the sample is stirred until the partition equilibrium time is reached typically for between 30 and 240 min. The extraction time depends on such parameters as the sample volume, stirring speed, temperature and stir bar dimension. All these parameters must be optimized for a given application. After extraction, the stir bar is removed with for-

destilovanou vodou, aby se odstranily cukry, proteiny nebo jiné zbytky extrahované matrice. Dále se tyčinka usuší pomocí buničité vaty. Při oplachování míchací tyčinky podle práce autorů David a kol. nedochází ke ztrátě vyextrahovaných látek, protože absorbované analyty jsou přítomny uvnitř PDMS fáze [9].

Další možností využití techniky SBSE je vzorkování z headspace prostoru. V tomto případě se míchací tyčinka umístí pomocí speciálního držáku do headspace prostoru nad kapalinou nebo pevným vzorkem [9].

SBSE extrakci kyselých nebo zásaditých látek lze ovlivnit úpravou pH. Vzhledem k povaze PDMS vrstvy mohou být z matrice vyextrahovány pouze nepolární, neionizované látky. Pokud se tedy vhodným způsobem upraví pH, slabé kyseliny a zásady mohou být převedeny do svých neutrálních forem, ve kterých mohou být extrahovány do PDMS fáze.

Pokud se zvýší teplota, při které se provádí extrakce, poklesne hodnota rozdělovacího koeficientu látky rozpuštěné ve vzorku mezi PDMS fází a extrahovaným vzorkem. Na druhé straně díky snížení viskozity vzorku může dojít ke zvýšení difuze, což nakonec povede ke zkrácení ekvilibrační doby extrakce. Z toho plyne, že při optimalizaci SBSE metody je nutné zvolit vhodnou teplotu extrakce, při které bude dosaženo dostatečné citlivosti za přijatelnou dobu extrakce [9].

K účinné extrakci velmi hydrofobních látek jako jsou např. polycyklické aromatické uhlovodíky nebo polychlorované bifenyly se do vzorku přidává okolo 10 % obj. organiky, aby se minimalizovala adsorpce na stěnách [10].

Zvýšení výtěžností polárních látek s nízkou hodnotou $K_{o/w}$ je možné dosáhnout pomocí derivatizace. Derivatizační reakce, které je možné použít ve vodných matricích, zahrnují acylaci fenolů pomocí anhydridu kyseliny octové, esterifikaci kyselin, acylaci aminů pomocí chlormravenčanu ethylnatého a oximaci aldehydů a ketonů pomocí *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin hydrochloridu [7,11–14].

4 DESORPCE ANALYTŮ

Desorpce vyextrahovaných analytů z PDMS fáze může být provedena buď pomocí termální desorpce, nebo zpětnou extrakci pomocí malého objemu vhodného rozpouštědla. Při plynově chromatografickém stanovení je výhodnější použít termální desorpci. Desorpci rozpouštědlem lze použít nejen v kombinaci s plynovou chromatografií, ale také i s kapalinovou chromatografií. V tomto případě se míchací tyčinka vloží do malé vialky, většinou do insertu vialky, a přidá se obvykle okolo 100–200 μ l organického rozpouštědla vhodného pro plynově chromatografické stanovení nebo mobilní fáze v případě kapalinové chromatografie [15,16].

5 NOVÉ FÁZE – DALŠÍ VÝVOJ SBSE

Hlavní nevýhoda výše popsané sorpční extrakce spočívá v nepolární povaze PDMS fáze. Z tohoto důvodu SBSE metoda je rozšířena hlavně pro extrakci nepolárních nebo slabě polárních látek. Extrakce silně polárních látek ($\log K_{o/w} < 3$) je obtížná. Lze je vyextrahovat jedině po jejich vhodné derivatizaci, což ale není vždy možné.

Z tohoto důvodu je snaha vyvinout Twister s dvěma nebo i více fázemi, a tak využít extrakční možnosti různých typů fází. Bicchi a kol. vyvinuli Twister s dvěma fázemi, kromě PDMS fáze použili různé na uhlíku vázané adsorbenty [17]. Podařilo se tak významným způsobem zlepšit výtěžnost těkavých polárních látek. Liu a kol. popsali použití kompaktní a termálně stabilní porézní fáze pro extrakci polycyklických aromatických uhlovodíků, n-alkanů a pesticidů z vody [18].

Pro přímé vzorkování v biologických matricích připravil Lambert a kol. SBSE fázi využívající alkyl-diol-silikagel [19]. Jako nové polymerní fáze pro SBSE navrhli Neng a kol. polyuretanové pěny. Tyto pěny se vyznačují mimořádnou stabilitou a vynikající mechanickou odolností. Tyto pěny se mohou stát vhodnou alternativou k běžné PDMS fázi pro extrakci polárních analytů v stopových koncentracích. Také zlepšují extrakci triazinových herbicidů ve vodě [20–22].

Jiná fáze obsahující kopolymer stearylesteru kyseliny methakrylové a ethylendimethakrylátu je vhodná pro současné stanovení šesti steroidních pohlavních hormonů v moči [23]. Jiný polymer poly(vinylpyridin-ethyl dimethakrylát) byl účinný pro cílenou extrakci fenolu a *p*-nitrofenolu [24]. Kopolymer vinylpyrrolidonu a divinylbenzenu účinně extrahoval polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a fenoly. Tato fáze je schopná extrahovat i některé ionty těžkých kovů jako Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} a Cd^{2+} [25].

ceps, rinsed with purified water for removing of adsorbed sugars, proteins or other matrix components. The stir bar is dried with lint-free tissue. According to David et. al. during rinsing of stir bar no loss of extracted compounds appears because the sorbed analytes are present inside the PDMS phase [9].

Another possibility of utilization of SBSE technique is headspace sampling. In this case the stir bar can be placed in headspace volume above a liquid or solid sample by a special holder [9].

SBSE extraction of either acidic or basic analytes can be influenced by an adjustment of matrix pH. This is related to the fact that PDMS phase can extract only neutral species from matrix. So, if the sample pH is properly adjusted, weak acids and bases can be converted to their neutral forms, in which they can be extracted by the PDMS phase.

Due to increasing of the extraction temperature the distribution constant of the compound dissolved in the sample between the PDMS phase and the extraction matrix decreases. On the other hand the increasing of the temperature leads to the lower viscosity of the sample and the diffusion may also increase which resulted to the shorter equilibrium extraction time. Consequently, during the SBSE optimization proper extraction temperature must be selected, where satisfactory sensitivity is achieved in an acceptable time period [9].

For efficient extraction of very hydrophobic compounds, e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons or polychlorinated biphenyls, about 10 vol% of an organic is added to minimize wall adsorption [10].

To improve the recoveries of polar analytes with their low $K_{o/w}$ values can be reached by derivatization. Derivatization reactions that can be applied in aqueous matrixes include acylation of phenols using acetic anhydride, esterification of acids, acylation of amines using ethyl chloroformate and oximation of aldehydes and ketones by *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride. [7,11–14]

4 ANALYTE DESORPTION

Desorption of extracted analytes from PDMS phase can be provided either by a thermal desorption or by back extraction with a small volume of a liquid solvent. When gas chromatographic determination is used then thermal desorption is the preferred way. Liquid desorption can be combined not only with gas chromatographic analysis but also with liquid chromatography. In this case, the stir bar is placed in a small vial, usually in insert of vial, and the desorption can be performed by adding usually about 100–200 μ l of a proper solvent for gas chromatographic determination or the mobile phase in the event of liquid chromatographic analysis. [15,16]

5 NEW PHASES – ANOTHER DEVELOPMENTS OF SBSE

The main disadvantage of above described method is the apolar character of PDMS phase. For this reason SBSE method has been applied mainly to extract non-polar or weakly polar compounds. The extraction of very polar analytes ($\log K_{o/w} < 3$) is difficult unless they have been previously suitable derivatised but this is not always possible.

From this reason the development is focused to introduce Twister with two or more phases combined extraction possibilities of different types of phases. Bicchi et al. developed dual phase Twister using except PDMS phase also different carbon-based adsorbents [17]. The recovery of volatile polar compounds was significantly enhanced. Liu et al. described the use of a compact and thermally stable porous hydroxyl-terminated phase for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, n-alkanes and pesticides from water samples [18].

For direct sampling in biological matrices Lambert et al. prepared SBSE phase based on an alkyl-diol-silica [19]. As new polymeric phases for SBSE Neng et al. proposed polyurethane foams. These foams seem to be a convenient alternative to PDMS phase for the extraction of polar analytes in the trace level. The extraction of triazin herbicides in water is also enhanced [20–22].

Another phase containing poly(methacrylic acid stearyl ester-ethylene dimethacrylate) is suitable for simultaneous determination of six steroid sex hormones in urine [23]. Another one phase is based on poly(vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) was effective for target extraction of phenol and *p*-nitrophenol [24]. Copolymer of vinylpyrrolidone and divinylbenzene was successfully for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines and phenols. The results showed that this new phase could enrich also some heavy metal ions as Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} a Cd^{2+} [25].



Navštivte nás na Brau Beviále v hale 5, stánek 127

RUČÍME ZA TO, ŽE VAŠE ZAŘÍZENÍ BUDE V PROVOZU.
Dlouhá životnost, jistota, efektivita: originální náhradní díly od KHS.

Competence in Solutions.

KHS

Další informace jsou uvedeny na www.khs.com/service

6 VYUŽITÍ SBSE PŘI ANALÝZE NÁPOJŮ

Široké použití našla technika SBSE při analýze nápojů. Např. stanovení kyseliny benzoové v nealkoholických nápojích je popsáno v práci Tredoux a kol., kde vzorek byl extrahován po dobu 40 min. Po vyextrahování byla tyčinka podrobena termální desorpci, analyty byly stanoveny GC metodou s hmotnostním detektorem [26]. Analýzou konzervačních látek ve vínu, octu, omáčkách a polevách se zabýval tým japonských vědců [27]. Stanovením senzoričky aktivních látek ve vínu, saké, whisky, džusech, kávě se věnuje řada publikací [28–47].

V pivovarské analytice byla metoda SBSE použita pro stanovení letinkové neboli světlé příchutě (3-methyl-2-buten-1-thiol) a dalších sirných látek [48], karbonylových sloučenin [49] nebo chmelových terpenoidů [50]. V těchto případech byly analyty z míchací tyčinky tepelně desorbovány a analyzovány pomocí plynové chromatografie. Stejným způsobem byly stanoveny furfural, furfurylethylether, furyl hydroxymethylketon, 2,4-dodekadienal, β -damascenon a ethylester kyseliny nikotinové, jen jako koncovka byla použita GC-TOFMS instrumentace [51]. Namísto tepelné desorpce je možné také analyty uvolnit z polydimethylsiloxanové fáze míchací tyčinky pomocí zpětné extrakce do malého množství rozpouštědla. Tímto postupem se zabýval kolektiv vědců z VÚPS, a. s., Praha. Takto byly stanoveny některé estery (octan isoamylatý, kapronan ethylatý, kaprylan ethylatý, octan fenylatý, kaprinan ethylatý, octan fenylethylatý, lauran ethylatý, myristan ethylatý a palmitan ethylatý) [52, 53], nižší mastné kyseliny [54, 55] nebo vicinální diketony [56]. Analyty byly separovány pomocí kapilární plynové chromatografie a detekovány plamenionizačním detektorem (estery, mastné kyseliny), respektive detektorem elektronového záchytu (vicinální diketony). SBSE po reextrakci rozpouštědlem se dá využít i ve spojení s vysokotlakou kapalinovou chromatografií, jak dokládá práce popisující stanovení hořkých kyselin v pivu [57].

7 ZÁVĚR

Předložený článek obsahuje přehled některých hledisek extrakce na míchací tyčince včetně základní teorie, podmínek, které je nutno

6 SBSE ANALYSIS OF BEVERAGES

SBSE technique is often used in beverage analytics. The determination of benzoic acid in soft drinks described by Tredoux et al. is one example. The sample was extracted for 40 min. After extraction the stir bar was desorbed by thermal desorption unit and analytes were determined by GC with mass detector [26]. The determination of preservatives in wine, vinegar, sauces was shown by Japanese [27]. Many publications are focused on the determination of flavours in wine, sake, whisky, juice and coffee [28–47].

In brewing analytics SBSE methods have been applied for the determination of sunstruck flavour (3-methyl-2-butene-1-thiol) and other sulphur compounds [48], stale-flavor carbonyl compounds [49] or hop-derived terpenoids in beer [50]. In all these procedures the analytes were thermally desorbed from the stir bar and were analyzed by gas chromatography. By the same way furfural, furfuryl ethyl ether, furyl hydroxymethyl ketone, 2,4-dodecadienal, β -damascenone and nicotinic acid ethyl ester were extracted only GC-TOFMS instrumentation was used for final determination [51]. Instead of the thermal desorption of compounds can also be eluted from polydimethylsiloxane phase by solvent back extraction. The research team from RIBM, Ltd. Prague has tested this procedure. Some esters in beer (isoamyl acetate, ethyl caproate, ethyl caprylate, phenyl acetate, ethyl caprate, phenylethyl acetate, ethyl laurate, ethyl myristate) [52, 53], free medium-chain fatty acids [54, 55] or vicinal diketones [56] were determined by this way. Capillary gas chromatography was used for separation of these compounds followed by flame ionization detection (esters, fatty acids) and by electron capture detection (vicinal diketones), respectively. After solvent back extraction SBSE can also be applied in conjugation with high pressure liquid chromatography as described in the determination of bitter acids in beer [57].

7 CONCLUSIONS

In this paper review of some aspects of stir bar sorptive extraction as basic theory, experimental parameters optimization, applications and limitations are given. The main advantage of SBSE is, except

optimalizovat, aplikací a omezení tohoto postupu. Bezespory hlavní výhodou SBSE je kromě jednoduchosti podstatně větší množství fáze použité k extrakci, čímž výrazně stoupá extrakční účinnost ve srovnání s SPME postupem, který je založen na stejném principu. Hlavní nevýhoda spočívá v komerční dostupnosti pouze jediné fáze – nepolární PDMS. Z tohoto důvodu je možné techniku použít pouze pro extrakci nepolárních nebo slabě polárních látek. Proto další rozšíření této mikrotechniky spočívá v úspěšném použití nových fází schopných dobře extrahovat i polární látky.

Poděkování

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

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

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 19. 3. 2010

Přijato k publikování / Accepted for publication: 10. 9. 2010

LITERATURA / REFERENCES

- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D.: Možnosti využití moderních metod přípravy vzorků pro plynově chromatografické analýzy při analýze nápojů a zejména piva. Část I. – Literární přehled. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, 358–366.
- Lord, H., Pawliszyn, J.: Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A* **902**, 2000, 17–63.
- Lancas, F.M., Queiroz, M.E.C., Grossi, P., Olivares, I. R. B.: Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. *J. Sep. Sci.* **32**, 2009, 813–824.
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C.: Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *J. Microcolumn Sep.* **11**, 1999, 737–747.
- David, F., Tienpont, B., Sandra, P.: Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrix. *LGC North Am.* **21**, 2003, 108–118.
- Sánchez-Rojas, F., Bosch-Ojeda, C., Cano-Pavón, J.: A review of stir bar sorptive extraction. *Chromatographia* **69**, 2009, 79–94.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H.: Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 2006, 500–508.
- Baltussen, E., Cramers, C., Sandra, P.: Sorptive sample preparation – a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 2002, 3–22.
- David, F., Sandra, P.: Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *J. Chromatogr. A* **1152**, 2007, 54–69.
- de Koning, S., Janssen, H. G., Brinkman, U. A. Th.: Modern methods of sample preparation for GC analysis. *Chromatographia*, **69**, 2009, 33–78.
- Kawaguchi, M., Ishii, Y., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Inoue, K., Saito, K., Nakazawa, H.: Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples. *J. Chromatogr. A*, **1049** 2004, 1–8.
- Kawaguchi, M., Ishii, Y., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H.: Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples. *Anal. Chim. Acta*, **533**, 2005, 57–65.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Ito, R., Sakui, N., Nakazawa, H.: Determination of 4-nonylphenol and 4-tert.-octylphenol in water samples by stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **505**, 2004, 217–222.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Sakui, N., Okanouchi, N., Saito, K., Nakazawa, H.: Dual derivatization–stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for determination of 17 β -estradiol in water sample. *J. Chromatogr.* **1105**, 2006, 140–147.
- Sandra, P., Baltussen, E., David, F. and Hoffmann, A.: A novel extraction technique for aqueous samples: Stir bar sorptive extraction, *AppNote 1/2000*, Gerstel, 2000, 1–5.
- Popp, P., Bauer, C. and Wennrich, L.: Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Anal. Chim. Acta*, 2001, **436**, 1–9.
- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Sgorbini, B., David, F., Sandra, P.: Dual-phase twisters: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr.* **1094**, 2005, 9–16.
- Liu, W., Wang, H., Guan, Y.: Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol–gel technology. *J. Chromatogr. A* **1045**, 2004, 15–22.
- Lambert, J. P., Mullett, W. M., Kwong, E., Lubda, D.: Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr. A* **1075**, 2005, 43–49.
- Neng, N. R., Pinto, M. L., Pires, J., Marcos, P. M., Nogueira, J. M. F.: Development, optimisation and application of polyurethane foams as new polymeric phases for stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A* **1171**, 2007, 8–14.
- Silva, A. R., Portugal, F. C. M., Nogueira, J. M.: Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices: Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases. *J. Chromatogr. A* **1209**, 2008, 10–16.
- Portugal, F. C. M., Pinto, M. L., Nogueira, J. M. F.: Optimization of polyurethane foams for enhanced stir bar sorptive extraction of triazinic herbicides in water matrix. *Talanta* **77**, 2008, 765–773.
- Huang, X., Yuan, D., Huang, B.: Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection. *Talanta*, **75**, 2008, 172–177.
- Huang, X., Qiu, N., Yuan, D.: Direct enrichment of phenols in lake and sea water by stir bar sorptive extraction based on poly(vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* **1194**, 2008, 134–138.
- Huang, X., Qiu, N., Yuan, D., Huang, B.: A novel stir bar sorptive extraction coating based on monolithic material for apolar, polar organic compounds and heavy metal ions. *Talanta*, **78**, 2009, 101–106.
- Tredoux, A. G. J., Lauer, H. H., Heideman, T., Sandra, P.: The Determination of Benzoic Acid in Lemon Flavored Beverages by Stir Bar Sorptive Extraction-CGC-MS. *J. High Resolution Chromatogr.* **23**, 2000, 644–646.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Takino, M., Yamashita, S., Daishima, S., Heiden, A. C., Hoffmann, A.: Simultaneous determination of preservatives in beverages, vinegar, aqueous sauces, and quasi-drug drinks by stir-bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 2002, 56–63.
- Isogai, A., Utsunomiya, H., Kanda, R., Iwata, H.: Changes in the aroma compounds of sake during aging. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2005, 4118–4123.
- Guerrero, E. D., Marin, R. N., Mejias, R. C., Barroso, C. G.: Stir bar sorptive extraction of volatile compounds in vinegar: Validation study and comparison with solid phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **1167**, 2007, 18–26.
- Demyttenaere, J. C. R., Sanchez Martinez, J. I., Verhei, R., Sandra, P., De Kimpe, N.: Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A* **985**, 2003, 221–232.
- Hayasaka, Y., MacNamara, K., Baldock, G. A., Taylor, R. L., Pollnitz, A. P.: Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **375**, 2003, 948–955.
- Caven-Quantrill, D. J., Buglass, A. J.: Determination of volatile organic compounds in English vineyard grape juices by immersion stir bar sorptive extraction-gas chromatography/mass spectrometry. *Flavor Fragrance J.* **22**, 2007, 206–213.



33. Fang, Y., Qian, M. C.: Quantification of Selected Aroma-Active Compounds in Pinot Noir Wines from Different Grape Maturities. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2006, 8567–8573.
34. Marín, J., Zalacain, A., De Miguel, C., Alfonso, G. L., Salina, M. R.: Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *J. Chromatogr. A* **1098**, 2005, 1–6.
35. Miki, A., Isogai, A., Utsunomiya, H., Iwata, H.: Identification of 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) causing a musty/muddy off-flavor in sake and its production in rice koji and *moromi* mash. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 2005, 178–183.
36. Zalacain, A., Alfonso, G.L., Lorenzo, C., Iñiguez, M., Salina, M. R.: Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint. *J. Chromatogr. A* **1033**, 2004, 173–178.
37. Alves, R. F., Nascimento, A. M. D., Nogueira, J. M. F.: Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* **546**, 2005, 1–21.
38. Bonnländer, B., Cappuccio, R., Liverani, F.S., Winterhalter, P.: Analysis of enantiomeric linalool ratio in green and roasted coffee. *Flavour Fragrance J.* **21**, 2006, 637–641.
39. Zalacain, A., Marín, J., Alfonso, G. L., Salina, M. R.: Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*, **71**, 2007, 1610–1615.
40. Buettner, A.: Investigation of Potent Odorants and Afterodor Development in Two Chardonnay Wines Using the Buccal Odor Screening System (BOSS). *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2004, 2339–2346.
41. Buettner, A., Welle, F.: Intra-oral detection of potent odorants using a modified stir-bar sorptive extraction system in combination with HRGC-O, known as the buccal odour screening system (BOSS). *Flavour Fragrance J.* **19**, 2004, 505–514.
42. Pfannkoch, E., Whitecavage, J.: Determination of flavor and fragrance components by Twister stir bar sorptive extraction and GC/MS: Elimination of polar matrix components. *LC GC North Am.* **21**, 2003, 37–38.
43. Caven-Quantrill, D. J., Buglass, A. J.: Comparison of micro-scale simultaneous distillation–extraction and stir bar sorptive extraction for the determination of volatile organic constituents of grape juice. *J. Chromatogr. A* **1117**, 2006, 121–131.
44. Ruberto, G., Biondi, D. M., Barbagallo, C., Meli, R., Savoca, F.: Constituents of stem and flower oils of *Helichrysum litoreum* Guss. *Flavour Fragrance J.* **17**, 2002, 32–40.
45. Diez, J., Dominguez, C., Guillen, D. A., Veas, R., Barroso, C. G.: Optimization of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. *J. Chromatogr. A* **1025**, 2004, 263–267.
46. Callejon, R. M., Troncoso, A. M., Morales, M. L.: Analysis for chloroanisoles and chlorophenols in cork by stir bar sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* **71**, 2007, 2092–2097.
47. Luan, F., Mosandl, A., Gubesch, M., Wüst, M.: Enantioselective analysis of monoterpenes in different grape varieties during berry ripening using stir bar sorptive extraction- and solid phase extraction-enantioselective-multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1112**, 2006, 369–374.
48. David, F., Sandra P., Hoffmann, A., Harms, D., Nietzsche F.: Elucidation of the hoppy aroma in beers by stir bar and head-space sorptive extraction followed by thermal desorption-CGC-MS/PFPD, AppNote 4/2001, Gerstel, 2001, 1–7.
49. Ochiai, N., Sasamoto, K., Daishima, S., Heiden, A., C., Hoffmann, A.: Determination of stale-flavor carbonyl compounds in beer by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **986**, 2003, 101–110.
50. Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kagami, N., Kawatsura, K.: Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2005, 4701–4707.
51. Marsili, R. T., Laskonis, L. C., Kenaan, C.: Evaluation of PDMS-based extraction techniques and GC-TOFMS for the analysis of off-flavor chemicals in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **65**, 2007, 129–137.
52. Horák, T., Kellner, V., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P.: Determination of some beer flavours by stir bar sorptive extraction and solvent back extraction. *J. Inst. Brew.* **113**, 2007, 154–158.
53. Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V.: Extrakce na míchací tyčince – nová možnost při analýze některých senzoryckých aktivních látek v pivu. *Kvasny Prum.* **54**, 2008, 102–107.
54. 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.
55. Horák, T., Čulík, J., Čejka, P., Jurková M., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D.: Analysis of Free Fatty Acids in Beer: Comparison of Solid-Phase Extraction, Solid-Phase Microextraction, and Stir Bar Sorptive Extraction. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2009, 11081–11085.
56. 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, 66–72.
57. 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.

Jaroslav Čepička – 1940–2010

Pouhých deset dní chybělo doc. Ing. Jaroslavu Čepičkovi, CSc., k dovršení sedmého decenia, když 1. září prohrál nerovný boj s těžkou nemocí. Byla to smutná zpráva pro všechny z nás, kteří jsme ho znali jako všestranně aktivního a sportovně založeného člověka.

Jaroslav Čepička se narodil 10. září 1940 v Praze. Střední školu navštěvoval v Nymburce, ale maturoval v roce 1957 opět v Praze. Zde také vystudoval kvasnou chemii na tehdejší Fakultě potravinářské biochemie VŠCHT a své alma mater zůstal víceméně věrný celý život. Po promoci v roce 1962 zde zůstal nejprve jako aspirant, později jako odborný asistent (v rámci vedlejšího pracovního poměru si vyzkoušel i práci vaříče v pivovaru Staropramen). Jeho kandidátská práce z roku 1971 byla zaměřena na tematiku hořkých chmelových látek, konkrétně na význam a uplatnění měkkých pryskyřic v pivovarském výrobním procesu. A byla to právě tematika chmele, která se stala jeho dominantním údělem, takže brzy tvořil „stýčného důstojníka“ mezi pěstiteli chmele a pivovarskými technologi. V roce 1988 byl jmenován na Katedře kvasné chemie docentem pro obor Kvasná a fermentační chemie na FPBT-VŠCHT, habilitován však byl až po změně politických poměrů v roce 1994. V té době již čtyři roky pracoval

jako proděkan fakulty pro pedagogiku a v roce 1997 se jako nástupce profesorky Ing. Gabriely Basařové, DrSc., stal vedoucím Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství, jak byla v té době fakulta přejmenována. V této funkci setrval až do roku 2002, kdy – po dovršení důchodového věku – přijal nabídku stát se výkonným ředitelem Českého svazu pivovarů a sladoven, což byl jeho poslední plný úvazek.

Vedle svých řídicích funkcí se Jaroslav Čepička intenzivně věnoval pedagogické a osvětové práci. Na VŠCHT postupně vedl laboratoře a technologické praxe, přednášel sedm předmětů v denním studiu a vybrané technologie v rámci univerzity 3. věku na VŠCHT v Praze a na MŠMT ČR. Podílel se na organizaci a výuce kurzů mimořádného studia absolventů působících v pivovarsko-sladařském a nápojovém průmyslu. Vedl řadu diplomových prací a byl školitelem doktorandů. V letech 1996–2009 působil též jako tajemníkem Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského. Byl členem a od roku 1998 předsedou zkušební komise státních závěrečných zkoušek oboru kvasné chemie a bioinženýrství. Od roku 1999 působil též jako člen Štátního ústavu pro obor biotechnologie a biotechnologie na Katedře biochemické technologie STU v Bratislavě. Byl členem řady institucí – Rady vysokých škol

České republiky, Akademického sněmu AVČR, vědeckých rad FPBT VŠCHT, Agronomické fakulty ČZU, VÚPS, a. s., a Chmelářského institutu v Žatci. Byl rovněž členem redakční rady časopisů *Kvasny průmysl* a *Chmelářství*, Pracovní skupiny pro chmel (obor evropské integrace při MZe ČR) a členem Československé společnosti chemické. V rámci Brewing Science Group při EBC reprezentoval české pivovarství jako vedoucí odborné skupiny *Kvasná chemie a biotechnologie*. Kromě toho všeho samozřejmě publikoval v odborných časopisech a přednášel na vědeckých konferencích u nás i v zahraničí. Díky své činnosti a všestrannosti se nakonec stal jednou z nejvýznamnějších osobností pivovarské současnosti.

Jaroslav Čepička přes nesčetné odborné aktivity rozhodně nebyl člověkem, který žil jen vědou a školou. Měl mnoho zájmů – hudbu, tanec (několik let se věnoval tomuto oboru závodně), sport, knihy, a kdo se s ním setkal například na některé vědecké konferenci, poznal ho i jako výborného společníka a baviče.

Pro pracovníky Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského byla zpráva o jeho odchodu o to smutnější, že byl s námi v pravidelném a čilém kontaktu až do letošního roku.

RNDr. Karel Kosař, CSc.

