

Nižší alkylaminy v pivu a sladu a jejich stanovení metodou plynové adsorpční chromatografie

663.42

Ing. JIŘÍ ČULÍK, Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc. Ing. BOHUMIL ŠPINAR, CSc., FRANTIŠEK FRANTÍK, prom. chemik, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Klíčová slova: pivo, slad, analýza, aminy, metody stanovení, plynová adsorpční chromatografie.

ÚVOD

Procesy látkové přeměny, na kterých se podílejí bílkoviny, resp. aminokyseliny, jsou často provázeny tvorbou aminů. Ty jsou, jak známo, častou součástí rozmanitých potravin. Při metabolismu jsou tvořeny nejčastěji během odbourávání dusíkatých látek a při dekarboxylaci aminokyselin.

Aminy patří mezi senzory aktivní látky. V běžných koncentracích nebyl pozorován negativní vliv na senzory vlastnosti piva, avšak přídavek zhruba desetinásobku přirozených obsahů vedl k nahořklé, nepříjemné přetrvávající chuti [1, 2]. Aminy jsou rovněž prekurzory řady látek, které vykazují nežádoucí senzory efekty [3].

Aminy přítomné ve sladu mohou podléhat mnoha chemickým reakcím, např. reakcím neenzymového hnědnutí [4]. Další důležitou skupinou reakcí, na kterých se mohou aminy podílet, jsou reakce nitrosací [5], vedoucí ke vzniku N-nitrosodimethylaminu (NDMA) ve sladu [6, 7].

Analytické metody, kterých lze ke stanovení nižších necyklických aminů použít, většinou nevyhovují z hlediska potřeby provádění sériových analýz. Mnohé vyžadují složité aparatury [8], jiné mohou způsobovat degradaci matrice a tím vznik artefaktů [9]. Proto bylo naší snahou vypracovat metodu poměrně rychlou, přesnou a dostatečně citlivou, která by umožnila stanovení nižších necyklických aminů v přírodní matrici a současně omezila možnost vzniku artefaktů.

Metoda izolace aminů pomocí modifikované vakuové destilace používané při izolaci N-nitrosaminů [10] a následné stanovení nižších necyklických aminů plynovou adsorpční chromatografií (GSC) byla úspěšně využita při studiu mechanismu vzniku NDMA ve sladu z jeho předpokládaného prekurzoru dimethylaminu (DMA). Tomuto problému budou věnovány práce navazující na tuto publikaci.

PŘEHLED DOSUD UŽÍVANÝCH ANALYTICKÝCH POSTUPŮ KE STANOVENÍ ALKYLAMINŮ

Ke stanovení nižších alkylaminů se nejčastěji používá plynová chromatografie.

Přímé stanovení alkylaminů bez předchozí derivatizace metodami plynové rozdělovací chromatografie (GLC) činí často potíže, neboť běžně užívané náplně kolon vykazují absorpční schopnosti u polárních aminů, vedoucí ke chvostování píků, a tím ke snížení citlivosti. Snížení chvostování lze dosáhnout buď alkalizací náplně [11] nebo použitím porézních polymerů smočených vhodnou fází, např. Chromosorbu 103 [12] a Porapaku [13] nebo Grapponu smočeného tetramethylenpentaminem (TEP) [14] s alkalizací hydroxidem draselným [15].

Vzhledem k nižším teplotám na koloně (90 až 150 °C) není dělení nízkovroucích aminů v mnohých případech uspokojivé.

Při izolaci těkavých aminů se využívá jejich schopnosti tvořit soli, nejčastěji hydrochloridy. Při vlastním stanovení jsou aminy z hydrochloridů po alkalizaci uvolněny do organické fáze (např. diethylether) a nastříknuty na kolonu [16] nebo je nutno použít kryogenické nástavce, z nichž jsou po vymrazení aminy uvolněny teplem a vedeny přímo na kolonu [17]. Při kvantitativní analýze tedy dochází k prodloužení doby stanovení.

Vývoj vhodných polymerů [18], zejména Chromosorbu 103 [19], umožnil využít tuto látku přímo jako náplň kolony bez nutnosti dalších úprav.

Při použití Chromosorbu 103 bez následného smočení lze nastříkovat vodnou fází obsahující aminy přímo na kolonu, aniž by docházelo k degradaci náplně. Jde tedy o čisté využití plynové adsorpční chromatografie, na rozdíl od uvedených metod využívajících materiály pro GSC v kombinaci s kapalnou fází (GLSC).

Využití GSC s sebou přináší výhody dokonalého dělení nižších alkylaminů bez nebezpečí chvostování píků a současně vede ke zvýšení výtěžnosti a reprodukovatelnosti kvantitativní analytické metody [18]. Brání ztrátám odparem etherové fáze, do které jsou nejčastěji po alkalizaci destilátu aminy převedeny.

Při stanovení aminů se s výhodou používají i různé metody derivatizační, umožňující při použití GLC dosáhnout dokonalé separace píků i vyšší citlivosti [20–26]. Tyto metody se s výhodou používají při spojení plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem [25]. Za jejich nevýhodu lze považovat značnou časovou náročnost a zvýšené nároky na chemikálie.

Izolaci aminů z matrice lze provádět klasickou destilací [25], destilací s vodní párou za sníženého tlaku [8] nebo vakuovou destilací z alkalického prostředí [2].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Podle námi vypracované metodiky se alkylaminy oddělují z přírodní matrice modifikovanou metodou Eisenbranda [10], původně navrženou pro izolaci N-nitrosaminů, a stanovují se plynovou adsorpční chromatografií, využívající jako náplň kolony porézní polymer Chromosorb 103 (původně byla tato metoda používána při stanovování plynných vzorků).

Postup izolace alkylaminů z přírodní matrice

K 20 g nedrceného sladu se přidá 20 ml destilovaného

vané vody, 10 ml 40 % NaOH a případně vnitřní standard (2-butanamin). Předloha destilační aparatury obsahující 5 ml HCl o koncentraci 1 mol.l^{-1} se vychladí na přibližně -80°C . Evakuace aparatury se po zapnutí topného hnízda provádí v pravidelných intervalech. Na konci destilace nesmí teplota v baňce překročit 70 až 80°C .

Po ukončení destilace se vodný destilát obsahující hydrochloridy odpaří do sucha na rotační vakuové odparek. Teplota lázně nesmí překročit 40°C .

Odparek se rozpustí v přesném objemu destilované vody (1 až 2 ml) a přidá se $100 \mu\text{l}$ NaOH o koncentraci 1 mol.l^{-1} . Směs se důkladně promísí. Uvolněné aminy jsou stanoveny metodou GSC, tj. přímým nástřikem vodného roztoku na kolonu.

Chromatografické podmínky

Byl použit plynový chromatograf Hewlett-Packard HP 5880A, vybavený termoionizačním detektorem se solí alkalického kovu (AFID) a skleněnou kolonou o délce 2,5 m a vnitřním průměru 2 mm, plněnou Chromosorbem 103.

Pracovní podmínky

- teplota nástřiku 200°C ,
- teplota pece programovaná 1 min při 100°C a dále vzestup po $20^\circ\text{C.min}^{-1}$ na teplotu 165°C ,
- teplota detektoru 250°C
- průtok vzduchu 70 ml.min^{-1}
- průtok vodíku 4 ml.min^{-1} ,
- průtok nosného plynu (argon) 40 ml.min^{-1}

Detekční limit činí $0,05 \text{ ng}$ dimethylaminu ve $3 \mu\text{l}$ nástřiku, mez reprodukovatelnosti leží v oblasti 1-2 ng DMA ve $3 \mu\text{l}$.

OVĚŘENÍ NAVRŽENÉ METODY

Přesnost navržené metody izolace nižších alkylaminů ze sladu a piva byla ověřována formou modelových pokusů.

V první fázi byly na standardních roztocích určeny podmínky potřebné pro odpaření hydrochloridů z vodné fáze na rotační odparek, tj. zejména maximální teplota vodní lázně.

Dále byla provedena optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení alkylaminů metodou GSC. Za náplň kolony sloužil Chromosorb 103, který se osvědčil při stanovení nižších alkylaminů v přírodních matricích [12, 27].

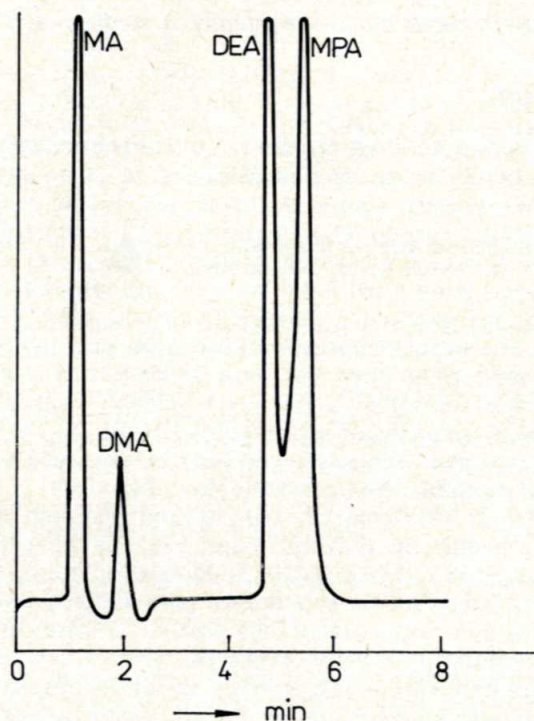
V následujících fázích byly analyzovány vzorky sladů a piv obsahující přídavky známého množství alkylaminů.

Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že výtěžnost se pohybuje pro popsanou metodu izolace v rozmezí 80 až 85 % podle druhu alkylaminu při směrodatné odchylce průměru stanovených hodnot obsahů alkylaminů 8,8 %.

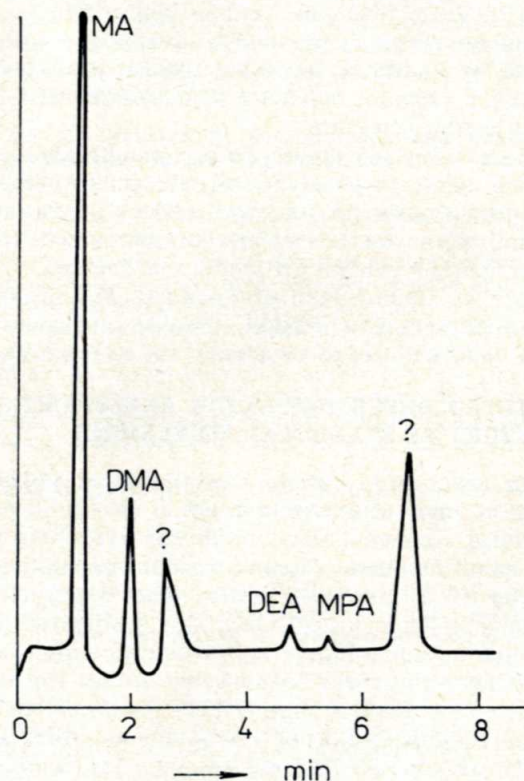
Separace pík byla uspokojivá (obr. 1). Za jedinou nevýhodu popsané metodiky lze považovat nepatrnou interferenci vody s píkem methylaminu.

Ve vzorcích sladů a piv byl vzhledem k omezené dostupnosti standardů sledován obsah methylaminu (MA), dimethylaminu (DMA), diethylaminu (DEA) a 2-methyl-propylaminu (MPA) [obr. 2].

Uvedené aminy spolu s některými dalšími (ethylamin, 3-methylbutylamin) jsou hlavními zástupci této skupiny aminů obsažených ve sladech [28]. Zvláštní pozornost byla věnována zejména DMA jako možnému prekurzoru NDMA ve sladu a pivu.



Obr. 1. Chromatogram standardní směsi nižších alkylaminů



Obr. 2. Chromatogram nižších alkylaminů obsažených ve sladu

S ohledem na skutečnost, že pro stanovení obsahu alkylaminů ve sladu a pivu neexistuje referenční metoda, bylo možno ověřit správnost naší metody pouze na základě srovnání výsledků získaných naší metodou modifikované vakuové destilace a metodou kyselé extrakce a klasické destilace z alkalického prostředí, jak je navrhuje French *et al.* [9].

Výsledky srovnávacích stanovení jsou uvedeny v tab. 1 a 2.

DISKUSE

Jak vyplývá z výsledků uvedených v tab. 1 a 2 byla zjištěna velmi dobrá shoda mezi metodikou založenou na kyselé extrakci a naší metodikou. V případě vzorků piv byly naše výsledky i v uspokojivé shodě s metodikou Frenche *et al.*, založené na klasické destilaci [9]. U vzorků sladů však tato metodika dávala podstatně vyšší hodnoty. Lze se domnívat, že nižší hodnoty získané vakuovou destilací a kyselou extrakcí odpovídají obsahu volného DMA obsaženého ve sladu, zatímco hodnoty získané klasickou destilací z alkalického prostředí odpovídají celkovému obsahu volného DMA a DMA uvolněného pravděpodobně štěpením hordeninu, graminu apod. Možnosti následného štěpení těchto terciárních aminů ostatně naznačují i výsledky pokusů Ripleye *et al.* [25].

Postup, využívající kyselou extrakci DMA z matrice do vodného prostředí, nelze v případě sladu vzhledem k časté tvorbě emulzí považovat za optimální.

Tabulka 1. Srovnání různých metod přípravy vzorků piva ke stanovení DMA

	Obsah DMA ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)			
	kyselá extrakce		destilace	modif. vakuová destilace
vz. č. 1	101	100 %	81 80 %	98 98 %
vz. č. 2	127	100 %	99 78 %	101 79 %
vz. č. 3	118	100 %	90 76 %	100 85 %
vz. č. 4	200	100 %	84 42 %	183 92 %
Průměr	136	100 %	88,5 65 %	120,5 88 %

POZN.: Srovnání jednotlivých metod je provedeno v procentech vzhledem ke kyselé extrakci

Tabulka 2. Srovnání různých metod přípravy vzorků sladu ke stanovení DMA

	Obsah DMA ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)			
	kyselá extrakce		destilace	modif. vakuová destilace
vz. č. 1	327	100 %	1381 422 %	386 118 %
vz. č. 2	600	100 %	3681 613 %	527 88 %
vz. č. 3	315	100 %	215 68 %	295 94 %
vz. č. 4	372	100 %	1981 532 %	401 108 %
Průměr	403,5	100 %	1814 450 %	402,3 99,7 %

Při vyhodnocení se s ohledem na výskyt široké škály nižších aminů v původní matrici nejčastěji používá technika externího standardu (nebo standardního přídatku), v případě sladu je možno použít techniku vnitřního standardu (2-butanamin), neboť tato látka se ve sladu nevyskytuje.

ZÁVĚR

Navržený způsob izolace alkylaminů z přírodní matrice a jejich stanovení netradiční metodou GSC umožňuje provádění většího množství analýz a snižuje pracnost oproti běžně používaným metodám GLC.

Metoda izolace nižších alkylaminů modifikovanou vakuovou destilací s využitím GSC pro stanovení se plně osvědčila při studiu podílu volného DMA na vzniku NDMA ve sladu. Vzhledem k mírným reakčním podmínkám této metody lze předpokládat nízkou pravděpodobnost štěpení termolabilních látek, a tím vzniku artefaktů během izolace alkylaminů.

S ohledem na získané výsledky lze předpokládat, že bude možno uvedenou metodu použít i pro jiné přírodní materiály.

Literatura

- [1] PALAMAND, S. R., HARDWICK, W. A., MARKL, R. S.: Volatile Amines in Beer and Their Influence on Beer Flavour. In: Proc. ASBC, 1969, s. 54.
- [2] SLAUGHTER, J. C. - UVGARD, A. R. A.: J. Inst. Brew., 77, 1971, s. 446.
- [3] TRESSL, R., RENNER, R., KOSSA, T., KÖPLER, H.: Gaschromatografischmassenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltstoffe von Hopfen, Würze und Bier und deren Genese. EBC. Proc. 16th Congr., 1977, s. 693.
- [4] JANÍČEK, F., POKORNÝ, J.: Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch., 145, 1971, s. 142.
- [5] KELLNER, V., ČULÍK, J., BASAŘOVÁ, G.: Kvas. prům., 28, 1982, s. 7.
- [6] WALKER, E. A., CASTEGNARO, M., SCRIBAN, R.: Bios, 11, 1980, s. 66.
- [7] SPIEGELHALDER, B., EISENBRAND, G., PREUSSMANN, R.: Food, Cosmet., Toxicol., 17, 1979, s. 29.
- [8] DAVÍDEK, J. *et al.*: Laboratorní příručka analýzy potravin, Praha, SNTL, 1977, s. 367 a 440.
- [9] FRENCH, B. J., RIPLEY, B. D., EDGINGTON, L. V.: MBAA Techn. Quart., 19 (2), 1982, s. 53.
- [10] EISENBRAND, G.: N-nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, GmbH, 1981, s. 29.
- [11] SMITH, E. D., RADFORD, R. D.: Anal. Chem., 33, 1961, s. 1160.
- [12] GRUGER, E. H.: J. Agric. Food Chem., 20, 1972, s. 781.
- [13] LINDAY, S., WADDINGTON, D. J.: Anal. Chem., 40, 1968, s. 522.
- [14] DUNN, S. R., SIMENHOFF, M. L., WESSON, L. G.: Anal. Chem., 52, 1976, s. 41.
- [15] KUWATA, K., YAMAZAKI, Y., UEBORI, M.: Anal. Chem., 52, 1980, s. 1980.
- [16] NEY, K. H., WIROTAMA, I. P. G.: Z. Lebens. Untersuch. u. Forsch., 149, 1971, s. 337.
- [17] GOLOVNYA, R. V., MIRONOV, G. A., ZHURAVLEVA, I. L., ABDULINA, R. M.: Moloč. Prom., 2, 1963, s. 11.
- [18] KUWATA, K., AKIYAMA, E., YAMAZAKI, Y., YAMASAKI, H., KUGE, Y.: Anal. Chem., 55, 1983, s. 2199.
- [19] CASSELMANN, A. A., BANNARD, R. A. B.: J. Chromatogr., 88, 1974, s. 33.

- [20] MOFFAT, A. C., HORNING, E. C., MATIN, S. B., ROWLAND, M.: J. Chromatogr., **66**, 1972, s. 255.
- [21] SINGER, G. M., LIJINSKY, W.: J. Agric. Food Chem., **24**, 1976, s. 550 a 553.
- [22] SPINELLI, A. M., LAKRITZ, L., WASSERMANN, A. E.: J. Agric. Food Chem., **22**, 1974, s. 1026.
- [23] COHEN, I. H., WHEALS, B. B.: J. Chromatogr., **43**, 1969, s. 233.
- [24] NEURATH, G. B., SCHREIBER, O.: IARC Sci. Publ. No. 9, 1975, s. 211.
- [25] RIPLEY, B. D., FRENCH, B. J., EDGINGTON, L. V.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **65**, 1982, s. 1066.
- [26] BRADWAY, D. E., SHAFIK, T.: J. Chromatogr. Sci., **15**, 1977, s. 322.
- [27] ANDRE, C. E., MOSIER, A. R.: Anal. Chem., **45**, 1973, s. 1971.
- [28] WACKERBAUER, K., TOUISSAINT, H. J.: Mschr. Brauwiss., **8**, 1984, s. 364.

Čulík, J. - Kellner, V. Špinar, B. - Frantík, F.: Nižší alkylaminy v pivu a sladu a jejich stanovení metodou plynové adsorpční chromatografie. Kvas. prům., **33**, 1987, č. 8—9, s. 283—286.

Článek pojednává o roli nižších alkylaminů v pivu a sladu a o dosud užívaných metodách jejich stanovení. Je popsána nově navržená metodika izolace alkylaminů z přírodní matrice a jejich stanovení metodou plynové adsorpční chromatografie. Nově navržená metoda byla úspěšně odzkoušena při stanovení nižších alkylaminů v pivu a sladu.

Чулик, И. - Келлер, В. - Шпинар, Б. - Франтик, Ф.: Низшие алкиламины в пиве и солоде и их определение

методом газовой адсорбционной хроматографии. Квас. прум. **33**, 1987, № 8—9, стр. 283—286

Статья рассматривает роль низших алкиламинов в пиве и солоде и до сих пор применяемые методы их определения. Описана новая предложенная методика изоляции алкиламинов из природной матрицы и их определение методом газовой адсорбционной хроматографии. Метод был успешно испытан при определении низших алкиламинов в пиве и солоде.

Čulík, J. - Kellner, V. - Špinar, B. - Frantík, F.: Lower Alkylamines in Beer and Malt and Their Determination by Gas Adsorption Chromatography. Kvas. prům. **33**, 1987, No. 8—9, pp. 283—286.

The role of lower alkylamines in beer and malt and the methods of their determination are discussed. A new isolation method of alkylamines from a natural matrix and their determination by the method of gas adsorption chromatography is described. The new method was successfully tested in the determination of lower alkylamines in beer and malt.

Čulík, J. - Kellner, V. - Špinar, B. - Frantík, F.: Niedrigere Alkylamine im Bier und ihre Bestimmung mittels Gas-Adsorptionschromatographie. Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 8—9, S. 285—286.

Der Artikel erörtert die Rolle der niedrigeren Alkylamine in Bier und Malz sowie auch die bisher benützten Methoden ihrer Bestimmung. Beschrieben wird eine neu vorgeschlagene Methodik der Isolation der Alkylamine aus der Naturmatrize und ihre Bestimmung durch die Methode der Gas-Adsorptions-Chromatographie. Die empfohlene Methode wurde mit positiven Ergebnissen bei der Bestimmung der niedrigeren Alkylamine in Malz und Bier überprüft.