

STANOVENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ V PIVU

RNDr. MARIE JURKOVÁ, CSc., Ing. DAGMAR ČADKOVÁ, Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc.,
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Klíčová slova: polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), extrakce na pevné fázi (SPE), pivo, kontaminace poživatin, HPLC

1. ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky se řadí mezi látky znečišťující životní prostředí a významující se vysokou odolností vůči odbourávání [1,2,3]. Neustálé narušování přirozené rovnováhy zejména průmyslovými exhalacemi vede ke kumulaci těchto látek v biosféře a jejich pronikání do potravního řetězce.

Bylo prokázáno, že na celkovém denním příjmu polycyklických aromatických uhlovodíků do lidského organismu (2–18 µg) se největší mírou podílí potrava (1,6–16 µg), zatímco ovzduší pouze 0,2 µg a pitná voda 0,03 µg. Karcinogenní frakce, jejímiž složkami jsou zejména chrysen, benzo(a)pyren a isomery benzofluoranthenu, představuje potom 20–30 % této sumy [4,5,6].

Ve složkách potravy je třeba věnovat pozornost zejména poživatinám konzumovaným ve větším rozsahu. Pivo se svou průměrnou roční spotřebou 160 l na osobu do této kategorie bezesporu patří.

Legislativa České republiky počítá s výskytem polycyklických aromatických uhlovodíků v potravním řetězci jen u pitné vody [7]. Pro ostatní poživatiny je rozpracován návrh „Směrnice o přídatných látkách a kontaminantech v poživatinách“ [8]. Pro jednotlivé skupiny potravin je navrhována nejvyšší přípustná hodnota pro benzo(a)pyren, pro celkové množství všech polycyklických aromatických uhlovodíků je potom přípustná hodnota 10x vyšší [8]. V praxi to znamená podle druhu potravin nejvyšší přípustnou hodnotu pro benzo(a)pyren v intervalu 1–10 µg/kg a pro celkovou sumu uhlovodíků potom 10–100 µg/kg. Pivo není zatím v návrhu jako samostatná kategorie uvažováno.

Naše laboratoř vypracovala postup pro izolaci polycyklických aromatických uhlovodíků z piva extrakcí na pevné fázi (SPE) s využitím extrakčních disků a následným stanovením analytů metodou kapalinové chromatografie.

Extrakční disky ve srovnání s extrakčními kolonkami dovoluují zpracování větších objemů vzorků v relativně krátkém čase. Větší vnitřní povrch extrakčních disků zaručuje velkou kapacitu, větší hustota náplně a jednotnost částic eliminují tzv. kanálování typické pro extrakční kolonky. Spotřeba rozpouštědel je ve srovnání s extrakcemi kapalina – kapalina velmi nízká [9].

Pro počáteční orientaci byly analyzovány polycyklické aromatické uhlovodíky sledované v ČR a zařazené mezi ukazatele znečištění zemin a podzemních vod [10]: anthracen, benzo(a)anthracen, benzo(a)pyren, fenanthren, fluoranthren, chrysen a naftalen.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál a metody

Standards polycyklických aromatických uhlovodíků:

– anthracen, benzo(a)anthracen, benzo(a)pyren, fenanthren, fluoranthren, chrysen a naftalen (Supelco, USA)
– methanol (Merck, SRN) – použit pro přípravu základních roztoků: naftalen 10 270 µg/ml, fenanthren 256 µg/ml, anthracen 352 µg/ml, fluoranthren 320 µg/ml, benzo(a)anthracen 254 µg/ml, chrysen 104 µg/ml, benzo(a)pyren 356 µg/ml a jejich další ředění pro kalibrační účely.

* Pro extrakci na pevné fázi:
– standardní vakuová filtrační aparatura
– extrakční disky: membránové (PTFE) 3M Empore C18 (USA)
– ultračistá voda (Millipore, USA)
– methanol, ethanol (Merck, SRN)
– dichlormethan (Fluka, Švýcarsko)
– filtrační skleněné kuličky Empore filter AID 400 (USA)
– membránový filtr pro filtraci extrahovaného vzorku 0,2 µm (Whatman, USA)
– bezvodý síran sodný (Lachema, Brno)
– tlakový dusík na odfoukání rozpouštědla

* Pro HPLC analýzu:
– kapalinový chromatograf Hewlett-Packard HP 1090
– fluorescenční detektor HP 1046 A s programovatelnou excitační a emisní vlnovou délkou
– kolona: kovová 250 x 4 mm, náplň Nucleosil 5 C18 – PAH (Macherey Nagel, SRN)
– redestilovaná voda pro HPLC (VÚPS)
– acetonitril (Merck, SRN)

2.2 Příprava vzorku

0,5 l piva bylo extrahováno na extrakčním disku Empore C18 v běžné vakuové filtrační aparatuře. Ochranu disku před zanesením suspendovanými částicemi zajišťovala vrstva inertních skleněných filtračních kuliček vysoká 1 cm.

1. Kondicionace extrakčního disku: systém byl promyt 10 ml methanolem a propláchnut 10 ml ultračisté vody. Disk byl vždy 3 minuty napouštěn, a teprve potom byla kapalina odsávána. Disk nesměl v této fázi vyschnout.

2. Na kondicionovaný disk bylo aplikováno 0,5 l odpěněného piva.

3. Po extrakci byl disk prosátím vzduchu vysušen.

4. Disk byl vymyt 3x5 ml dichlormethanu a extrakt vysušen na sloupci bezvodého síranu sodného.

5. Dichlormethan byl odpařen jemným proudem dusíku.

6. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml methanolu a po přefiltrování přes membránový filtr ihned analyzován.

2.3 HPLC analýza

K HPLC analýze byl použit kapalinový

chromatograf Hewlett - Packard HP 1090 s fluorescenčním detektorem HP 1046 s programovatelnou excitační a emisní vlnovou délkou. Separace probíhala na kovové analytické koloně 250 x 4 mm s náplní Nucleosil 5 C18 – PAH (Macherey – Nagel, SRN) s mobilní fází acetonitril – voda s gradientovou elucí. Teplota kolony byla 35 °C, průtok 0,9 ml/min.

Časový profil gradientu podává tabulka 1.

Tab. 1 Časový profil gradientu pro rozdělení polycyklických aromatických uhlovodíků na koloně C18 – PAH

čas (min)	% acetonitrilu	% vody
1	60	40
5	60	40
20	80	20
30	90	10
35	100	0
40	100	0
45	60	40

Doba kondicionace kolony před nástřikem každého dalšího vzorku byla vždy 10 minut.

Na kolonu bylo dávkováno 10 µl vzorku. Excitační a emisní vlnové délky pro fluorescenční detekci byly optimalizovány scanningem spekter. Zvolené vlnové délky pro měření jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2 Excitační a emisní vlnové délky pro měření polycyklických aromatických uhlovodíků.

uhlovodík	excitační vlnová délka nm	emisní vlnová délka nm
naftalen	280	370
fenanthren	248	374
anthracen	248	374
fluoranthren	232	447
benzo(a)anthracen	264	384
chrysen	264	384
benzo(a)pyren	248	410

Tab. 3 Detekční meze a minimální stanovitelné koncentrace v pivu při nástřiku 10 µl 500x zakoncentrovaného vzorku.

uhlovodík	detekční meze (ng)	minimální koncentrace stanovitelná v pivu (ng/l)
naftalen	0,273	54,6
fenanthren	0,056	11,2
anthracen	0,029	5,8
fluoranthren	0,055	11,0
benzo(a)anthracen	0,037	7,4
chrysen	0,041	8,2

Změřené detekční meze (odpovídající trojnásobné hodnotě šumu) a od nich odvozené minimální teoreticky stanovitelné koncentrace jednotlivých uhlovodíků v pivu po pětisetnásobném zakoncentrování za předpokladu 100% výtěžnosti jsou shrnuty v tabulce 3.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Výtěžnost metody

Výtěžnost metody R byla zjištěna jako poměr mezi skutečně nalezeným zvýšením koncentrace ($c_2 - c_1$) standardním přídavkem a známým přídavkem vztaženým na 1 l vzorku (c_p):

$$R\% = \frac{c_2 - c_1}{c_p} \times 100$$

Byla změřena původní koncentrace c_1 jednotlivých uhlovodíků, standardní přídavek byl volen tak, aby se výsledná koncentrace c_2 jednotlivých uhlovodíků zvýšila 2× až 3×, tj. k 0,5 l odpěněného piva bylo přidáno 700 μ l 5000× methanolem zředěného zásobního roztoku.

Byly zjištěny tyto průměrné výtěžnosti jednotlivých uhlovodíků: fenantren 20 %, anthracen 66 %, fluoranthren 60 %, benzo(a)anthracen 73 %, chrysen 102 %, benzo(a)anthracen 112%. Všechny uvedené uhlovodíky s výjimkou fenantrenu splňují požadavek, aby výtěžnost metody ležela v intervalu 60–120 % [11].

Naftalen nebyl v pivu vůbec identifikován; vzhledem k jeho těkavosti a nízkým odezvám nebyla jeho výtěžnost zjišťována.

3.2 HPLC analýza reálných vzorků

HPLC metodou byly analyzovány tři vzorky piva různého původu, získané z obchodní sítě. Zjištěné hodnoty vzhledem k dosaženým výtěžnostem lze s výjimkou fenantrenu považovat za spolehlivé, naftalen nebyl v pivu za uvedených analytických podmínek prokázán. Tabulka 4 udává zjištěné koncentrace ostatních sledovaných uhlovodíků v pivu. Obrázek 1 představuje chromatogram polycyklických aromatických uhlovodíků v pivu a jeho porovnání se standardem.

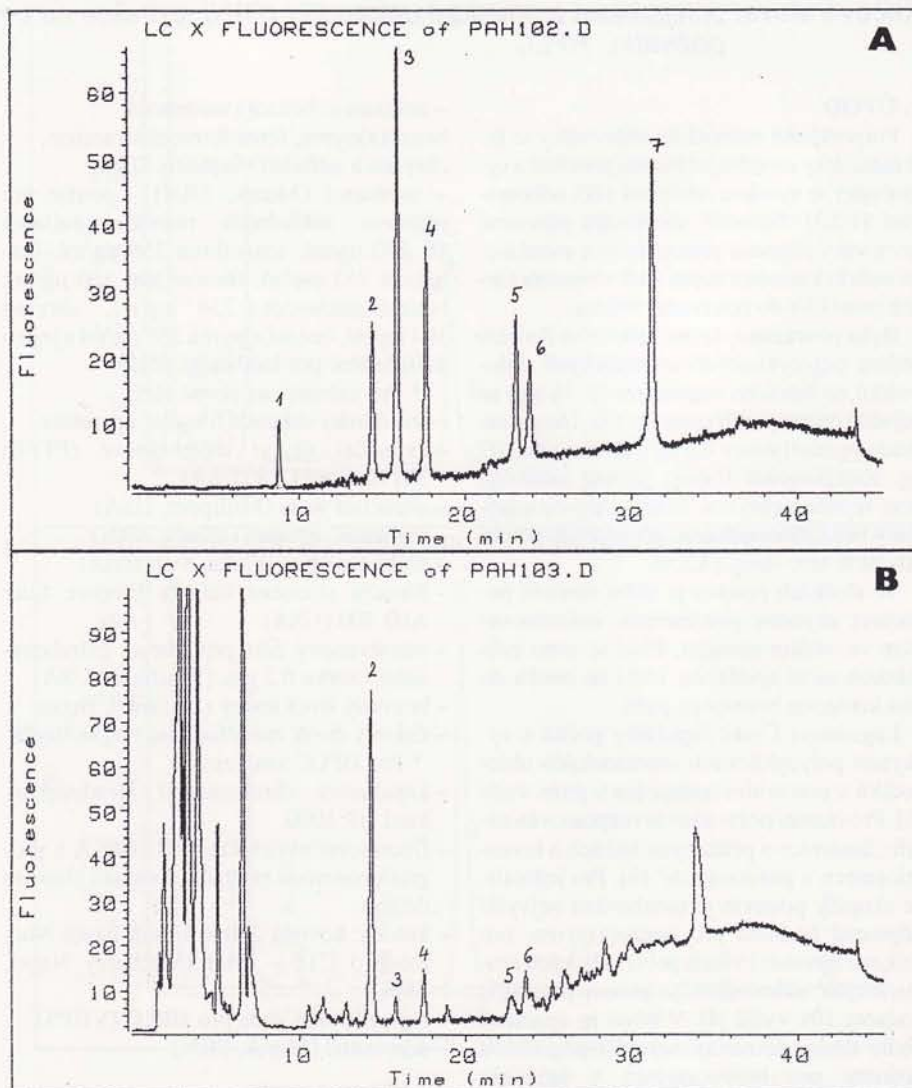
Tab. 4 Stanovení některých polycyklických aromatických uhlovodíků v pivu.

uhlovodík	pivo I (ng/l)	pivo II (ng/l)	pivo III (ng/l)
anthracen	12,6	12,7	11,5
fluoranthren	43,2	33,4	22,9
benzo(a)anthracen	39,8	20,8	22,1
chrysen	37,8	17,2	13,2
benzo(a)pyren	stopy	stopy	stopy

4. ZÁVĚR

Získané výsledky potvrzují přítomnost polycyklických aromatických uhlovodíků v pivu. Jestliže by se koncentrace ostatních polycyklických aromatických uhlovodíků pohybovaly ve stejných relacích, lze předpokládat, že všech 16 uhlovodíků, které sle-

Obr. 1 HPLC chromatogram polycyklických aromatických uhlovodíků s fluorescenční detekcí. A standardní roztok, 1 – naftalen (1027 ng/ml), 2 – fenantren (25,6 ng/ml), 3 – anthracen (35,2 ng/ml), 4 – fluoranthren (32,0 ng/ml), 5 – benzo(a)anthracen (25,4 ng/ml), 6 – chrysen (20,8 ng/ml), 7 – benzo(a)pyren (35,6 ng/ml). B extrakt z piva. Nástřik 10 μ l.



duje organizace EPA [12], by mohlo v celkovém množství přítomném v pivu vykazovat koncentrace na úrovních nižších než 1 μ g/l. Toto tvrzení si však vyžádá rozsáhlejší studii zahrnující analýzu podstatně širšího souboru vzorků. Stejně tak je pravděpodobné, že při vyšších konzumacích piva některými jednotlivci, by se i polycyklické aromatické uhlovodíky v tomto nápoji obsažené mohly projevit jako rizikové zatížení lidského organismu.

5. LITERATURA

- [1] NEIDHARD, F., HERRMANN, M.: in Dioxin, VDI Verlag, Düsseldorf, 1987, s. 303.
- [2] HAMMEL, K. E., et al.: Appl. Environ. Microbiol., **8**, 1992, s. 1832.
- [3] POTHULURI, J. V., et al.: Appl. Environ. Microbiol., **58**, 1992, s. 937.
- [4] DE VOS, R. H., VAN DOKKUM, W., SCHOUTEN, A.: Food Chem. Toxicol., **28**, 1990, s. 263.
- [5] ZANDER, M.: Polycyclic Aromatic and Heteroaromatic Hydrocarbons, in Handbook of Environmental Chemistry

(Hutzinger, O. – Editor), Berlin – Heidelberg, 1990.

- [6] TUOMINEN, J. P., PYSALO, H., SAURI, M.: J. Agric. Food Chem., **36**, 1988, s. 118.
- [7] ČSN 75 7111/1991 – Pitná voda
- [8] Návrh prováděcí vyhlášky MZ k ZOP o chemických požadavcích na zdravotní nezávadnost potravin, 1996.
- [9] HENDRIKS, R. E., LC&GC Int., **7**, 1994, s. 190.
- [10] Názor ministerstva životního prostředí ČR na ukazatele a normativy pro asanace znečištěné zeminy a podzemních vod. Praha, 5. 5. 1992, Č.j. 696/ORĐ/e.o./92.
- [11] Metodická příručka pro stanovení ukazatelů znečištění vod, Ministerstvo životního prostředí ČR, Praha, 1993.
- [12] U.S. EPA Method T0-13, The determination of B(a)P and other PAHs in ambient air using GC and HPLC analysis.

Lektorovala RNDr. Věra Pacáková, CSc.
Do redakce došlo 3. 5. 1996