

ZKUŠENOSTI S VYUŽITÍM NOVÝCH TECHNIK PLYNOVÉ A KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE PŘI ANALÝZE SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

II. Stanovení karbonylových sloučenin pomocí derivatizace a detekce GC-ECD nebo GC-MS. Využití HPLC při stanovení 2-furfuralu a 5-hydroxymethyl-2-furfuralu

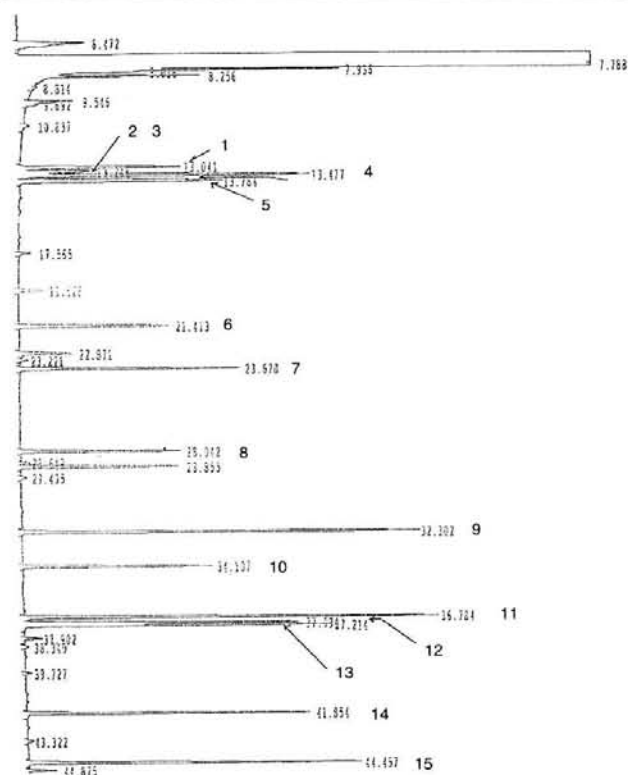
Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., RNDr. MARIE JURKOVÁ, CSc., Mgr. TOMÁŠ HORÁK, Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc.
Pivovarský ústav Praha, VÚPS, a. s.

Klíčová slova: *karbonylové sloučeniny, analýza, pivo, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie*

V prvním dílu článku věnovaném otázkám stanovení karbonylových sloučenin v pivu jsme naši pozornost zaměřili zejména na oblast jejich stanovení pomocí předkoncent-

race metodami dynamické headspace analýzy s využitím speciálních injektorů PTI (Purge and trap injector) a TCT (Thermal desorption cold trap injector)[1].

V této části bude věnována pozornost několika okruhům problémů. Prvým souvisí s výběrem vhodné kolony umožňující lepší separaci C₅-karbonylů. Dále zde bude zmí-



Obr. 1 Chromatogram směsi karbonylů na 60 m koloně DB-5. (přímý nástřik 1,5 μ l vzorku na kolonu, detektor FID, koncentrace standardu 67 mg.l⁻¹)

něn způsob stanovení PFBOA-derivátů (PFBOA = o-2,3,4,5,6-(pentafluorobenzyl)-hydroxylamin) karbonylových sloučenin pomocí plynové chromatografie s detektorem elektronového záhytu (ECD) respektive hmotnostním detektorem (MS). Na závěr bude stručně pojednán způsob stanovení 2-furfuralu pomocí HPLC.

1. VYUŽITÍ NÍZKOPOLÁRNÍCH KOLON S VYSOKOU TLOUŠTKOU FILMU STACIONÁRNÍ FÁZE PŘI ANALÝZE KARBONYLOVÝCH SLOUČENIN V PIVU

Nebývalý rozvoj výroby křemenných kapilárních kolon s sebou přinesl možnost nánášení poměrně značných vrstev fáze na vnitřní povrch kolony. Tloušťka filmu vázaných fází může dosáhnout až 5 μ m. V praxi to znamená podstatné zvýšení kapacitního faktoru kolony a jejího dělicího poměru. Vý-

sledkem je dokonalejší separace piků při možnosti vyššího zatížení kolony. Zatímco jsou kapilární kolony smocené vysokopolární fází (např. Carbowax) citlivé na přítomnost vody v extraktu nastříkaném na kolonu, u nízkopolárních, popř. nepolárních kolon toto nebezpečí nehrozí. Výše uvedené skutečnosti byly důvodem, proč byla zvolena k testování 60 m nízkopolární kolona DB-5 s vyšší tloušťkou filmu vázané fáze. Pro stanovení vybraných karbonylových sloučenin (aldehydů) byl použit TCT injektor. Detailní popis funkce TCT byl uveden v předešlém článku, a proto jej zde již neuvádíme.

Podmínky na plynovém chromatografu byly následující:

- plynový chromatograf Chrompack CP 9001 vybavený TCT injektorem.
- Kolona kapilární křemenná DB-5 (firma J & W), délka 60 m, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 1,0 μ m.
- Detektor FID.
- Nosný plyn dusík.
- Tlak na koloně 85 kPa (1,8 ml.min⁻¹).
- Teplota nástřiku 260 °C.
- Teplota detektoru 280 °C.
- Objem nástřiku 1,5 μ l.
- Splitflow 42 ml.min⁻¹, 36 s po nástřiku splitless.
- Teplotní program: 50 °C (3 min) – 3 °C.min⁻¹ – 89 °C – 5 °C.min⁻¹ – 240 °C (5 min) – 40 °C.min⁻¹ – 280 °C (2 min).

Z obdrženého chromatogramu (obr. 1) je zřejmé poměrně uspokojivé rozdělení piků C₅-karbonylů. S ohledem na možné interference byla provedena identifikace jednotlivých karbonylů pomocí přístrojového spojení plynový chromatograf – hmotnostní spektrometr (GC-MS). Identifikace byla

provedena na hmotnostním spektrometru firmy Fisons TRIO 1000 metodou electron impact (EI) v modu TIM (total ion mode) a SIM (selected ion mode). Použitá kolona a podmínky na plynovém chromatografu byly totožné s výše uvedenými hodnotami. Spektra byla sejmuta při ionizační energii zdroje 70 eV a napětí 300 V (obr. 2).

U všech chromatogramů jsou jednotlivé sloučeniny respektive jejich deriváty označeny následovně: 2-methylpropanal (1), 3-methylbutanal (2), t-2-butenal (3), 3-methylbutan-2-on (4), 2-methylbutanal (5), hexanal (6), 2-furfural (7), heptanal (8), benzaldehyd (9), oktanal (10), fenylacetaldehyd (11), t-2-oktenal (12), acetylpyrrol (13), t-2-nonenal (14), ethylester kyseliny nikotinové (15), 5-hydroxymethyl-2-furfural (16).

Na základě získaných poznatků jsme se pokusili docílit obdobného rozdělení na totožné koloně, avšak zvýšit citlivost zařazením TCT injektoru. Pro tento účel bylo však nutno poněkud pozměnit předešlé podmínky na plynovém chromatografu:

Podmínky na plynovém chromatografu :

- Detektor plamenionizační (FID).
- Nosný plyn dusík.
- Tlak na koloně 85 kPa (1,8 ml.min⁻¹).
- Teplota nástřiku 250 °C.
- Teplota detektoru 270 °C.
- Teplota pece programovaná: 50 °C (14 min) – 4 °C.min⁻¹ – 90 °C – 6 °C.min⁻¹ – 240 °C (5 min) – 40 °C.min⁻¹ – 280 °C (5 min).

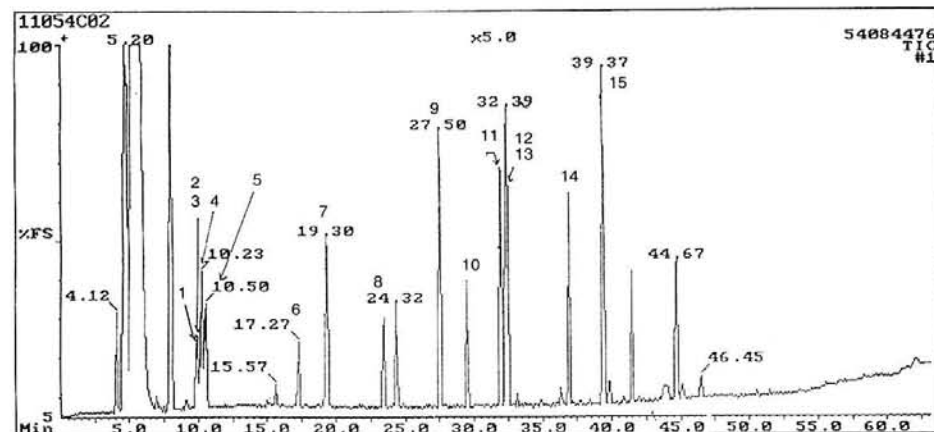
Program TCT:

- Doba předchlazení komůrky chlazené tekutým dusíkem 2 min.
- Teplota komůrky – 120 °C.
- Náplň sorpční trubice Tenax TA, 90 mg, velikost částic 0,35/0,25 mm tj. 35/60 mesh.
- Teplota desorpce ze sorpční trubičky 280 °C.
- Teplota desorpce (po vyhřátí odporové pisky) 270 °C.
- Doba stripování 10 minut.
- Doba nástřiku 2 minuty.

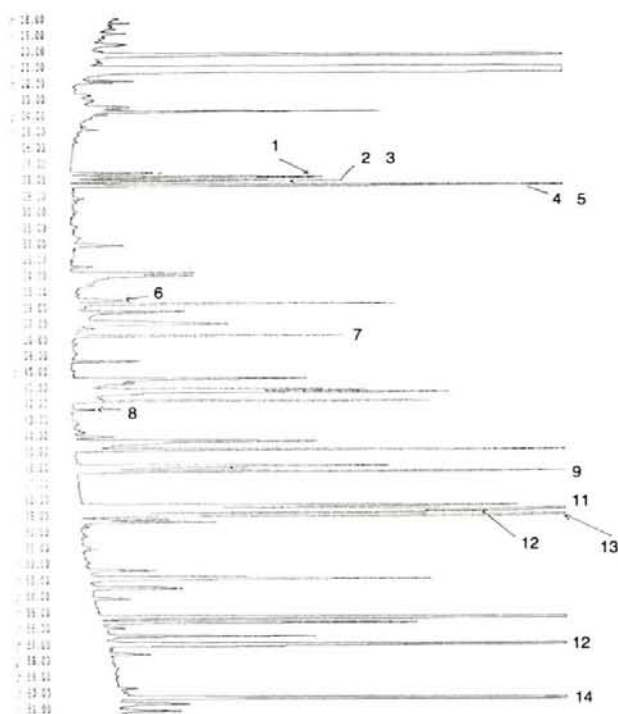
500 ml modelové směsi 4 % ethanolu obsahující směs karbonylových látek o koncentraci 134 μ g.l⁻¹ byla stripována dusíkem přes sorpční kolonku obsahující 90 mg sorbentu (Tenax) po dobu 30 minut při průtoku 40 ml.min⁻¹. Po ukončení stripování byl obsah trubičky předsušen protiproudým způsobem za shodného průtoku dusíku.

Z obdrženého chromatogramu (obr. 3) je patrné nejen poněkud zhoršené dělení C₅-karbonylů (ve srovnání s přímým nástřikem na kolonu), ale i diskriminace některých dalších látek. U t-2-oktenalu a t-2-nonenalu byl navíc pozorován výskyt koelujících složek, jejichž identifikace se zatím nepodařila.

Získané neuspokojivé výsledky byly důvodem, proč jsme v dalším upustili od pokusů využít pro naše účely metodu dynamické headspace techniky a zaměřili naši pozornost na oblast využívající ke stanovení karbonylových látek v pivě metod derivatizačních.



Obr. 2 Chromatogram karbonylů získaný pomocí GC – MS



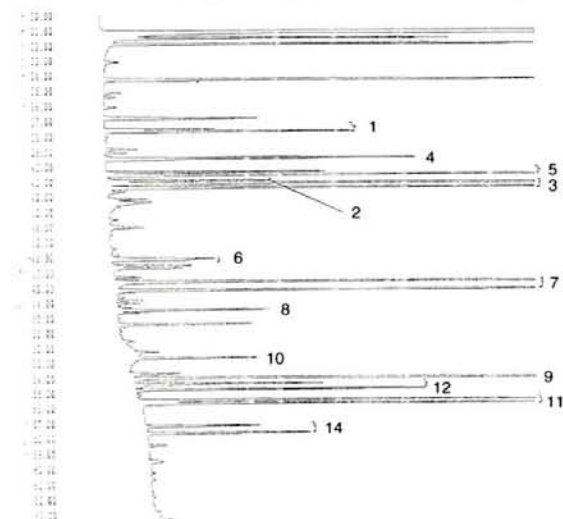
Obr. 3 Chromatogram směsi karbonylů na 60 m koloně DB-5 (TCT). (Stripování 500 ml 4 % etanolu o konc. karbonylů 134 $\mu\text{g.l}^{-1}$), detektor FID.

2. STANOVENÍ ALDEHYDŮ V PIVĚ METODOU PŘÍMÉ DERIVATIZACE POMOCÍ PENTAFLUOROBENZYL- HYDROXYLAMINU (PFBOA)

Postup založený na přímé derivatizaci aldehydů přítomných v pивě eliminuje potřebu jejich předběžné izolace. Po ukončení derivatizace jsou deriváty vytřepány do nepolárního rozpouštědla a stanoveny plynovou chromatografií pomocí detektoru elektronového záchytu (ECD). Původně byl tento způsob navržen pro stanovení karbonylových látek ve vodě [2,3]. V pivovarsství jej využil Grönquist et al. [4] při sledování změn obsahu karbonylových látek během výroby a skladování piva.

Postup derivatizace

Chemikálie : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ p.a.



Obr. 4 Chromatogram směsi PFBOA derivátů aldehydů na 60 m koloně DB-5 (odpovídá koncentraci 17,6 $\mu\text{g.l}^{-1}$, detektor ECD).

H_2SO_4 p. a.
o-2,3,4,5,6-(pentafluorobenzyl)-hydroxylamin
hydrochlorid p. a. (PFBOA) (firma Aldrich)
n-hexan p.a.
 H_2O redest.
 Na_2SO_4 bezv. p. a.

Pracovní postup:

Do 5 ml piva přidáme 50 μl roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) a dále 0,5 ml PFBOA ($c = 4 \text{ g.l}^{-1}$). Směs důkladně protřepeme a ponecháme reagovat po dobu 60 minut. Reakce se zastaví přidáním 50 μl roztoku H_2SO_4 ($c = 9 \text{ mol.l}^{-1}$). Deriváty jsou důkladně vytřepány do 1 ml n-hexanu, vodná fáze odstraněna a hexanová fáze vytřepána třikrát 5 ml H_2SO_4 ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$). Obsah jednotlivých derivátů aldehydů je stanoven, po přesušení ex-

traktu nad 0,5 g bezv. Na_2SO_4 a doplnění na objem 1 ml, plynovou chromatografií s detekcí pomocí ECD.

Podmínky na plynovém chromatografu:

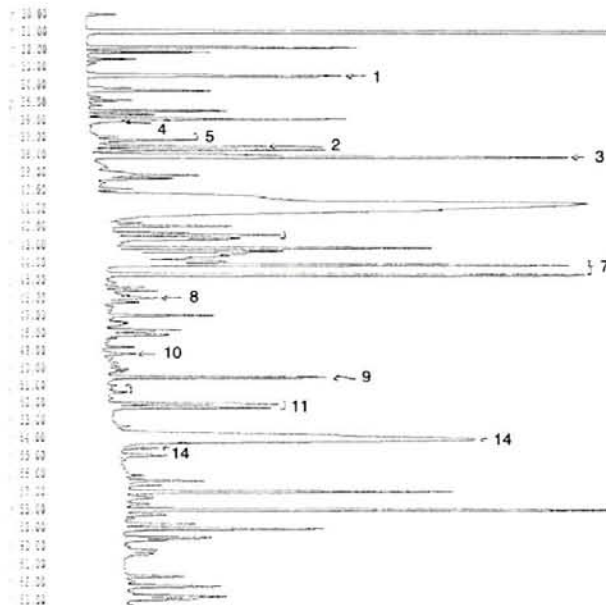
- Detektor elektronového záchytu (ECD).
- Nosný plyn dusík.
- Make up dusík.
- Tlak na koloně 85 kPa ($1,8 \text{ ml.min}^{-1}$).
- Teplota detektoru 310 $^{\circ}\text{C}$.
- Teplota nástřiku 260 $^{\circ}\text{C}$.
- Objem nástřiku 1,5 μl .
- Splitflow 42 ml.min^{-1} , 36 s po nástřiku splitless.
- Teplota pece programovaná: 60 $^{\circ}\text{C}$ (3 min) – 4 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ – 252 $^{\circ}\text{C}$ – 6 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ – 282 $^{\circ}\text{C}$ (8 min)

Kalibrační křivku pro daný koncentrační rozsah sestavíme obdobným způsobem s tím rozdílem, že 5 ml piva nahradíme 5 ml vody s přidáním směsného roztoku aldehydů o koncentraci 1,765 mg.l^{-1} v 96 % ethanolu. Kalibrační křivka byla konstruována pro koncentrační rozsah 10 až 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ použitím metody nelineární regrese.

Jak je zřejmé z chromatogramu směsi derivátů aldehydů (obr. 4), odpovídají jednotlivým aldehydům jeden až dva píky (podle

stavby molekuly a dělicí schopnosti kolony). Výtěžnost u jednotlivých aldehydů kolísala v rozmezí 10 % (3-methylbutan-2-on, t-2-nonenal) až 100 % (3-methylbutanal). Chromatogram reálného vzorku piva je znázorněn na obr. 5. Dosažená citlivost se pohybovala v rozmezí 0,05–2 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Identifikace jednotlivých píků byla provedena na hmotnostním spektrometru TRIO 1000 pracujícím v EI módu. I když byla citlivost MS pracujícího v SIM (selected ion mode) na rozdíl od TIC (total ion mode) vyšší (obr. 6), a navíc jsme se pokusili o zvýšení citlivosti snížením ionizační energie ze 70 na 30 eV, nepodařilo se spolehlivě identifikovat všechny přítomné karbonyly. Z tohoto důvodu byla provedena identifikace jednotlivých píků pouze na základě porovnání retenčních časů standardu a stanovené látky. Z chromatogramu na obr. 5 vyplývá, že nelze považovat takto provedenou identifikaci píků jednotlivých sloučenin za spolehlivou. Proto byly při kvantifikaci jednotlivých aldehydů využívány pouze ty píky, u kterých nebyly pozorovány časté interference.

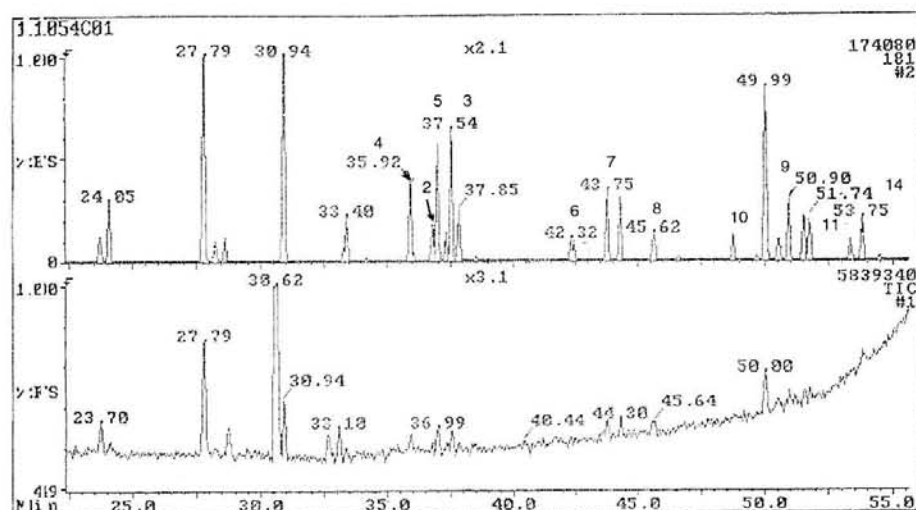


Obr. 5 Chromatogram PFBOA derivátů aldehydů na 60 m koloně DB-5 (reálný vzorek piva, detektor ECD)

3. STANOVENÍ 2-FURFURALU POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

V běžné pivovarské praxi není možné používat nesmírně nákladné analytické přístroje a případně jejich sestavy. Stejně tak není vždy účelné stanovit celé spektrum karbonylových sloučenin a pro orientaci mnohdy postačí stanovení 2-furfuralu respektive 5-hydroxymethyl-2-furfuralu, tj. látek, u kterých byly pozorovány změny během stárnutí piva [5].

V pivovarské literatuře bylo popsáno stanovení 5-hydroxymethyl-2-furfuralu (dále HMF) a 2-furfuralu metodou kapalinové chromatografie [5–7]. I když HMF není exaktně řazen k indikátorům stárnutí piva, jeho relativně vysoké obsahy v pивě jej pře-



Obr. 6 Identifikační chromatogram PFOA derivátů aldehydů na 60 m koloně DB-5 získaný pomocí GC – MS (SIM a TIC)

durčují k praktickému využití [5]. Proto jsme se pokusili tyto metody aplikovat i v rámci našich výzkumných prací, týkajících se senzorické stability piva.

Komplikovanost matrice, jakou pivo bezesporu je, znemožňuje přímý nástřik vzorku na kolonu, a proto byla nezbytná jeho předúprava. Při použití klasické techniky extrakce v systému kapalina-kapalina bývá obvykle jako extrakční činidlo používán ethylacetát [6]. V případě jeho úplného odpaření však může dojít k nekontrolovatelným ztrátám analytu. Vzhledem k dobré rozpustnosti obou sledovaných látek ve vodě je nutno zařadit extrakci vícenásobnou, což klade velké nároky na čas a množství rozpouštědel.

Přímý nástřik vzorku piva na kolonu byl použit pouze pro stanovení HMF s využitím techniky gelové filtrace na koloně s iontoměničím Aminex HPX (firmy Bio Rad). Po účinném oddělení vyšemolekulární frakce bylo možné mezi ostatními komponentami identifikovat a stanovit HMF [6].

Pro izolaci a stanovení HMF a 2-furfuralu v pivě byla námi nakonec zvolena technika extrakce na pevné fázi (SPE) [7], vyznačující se menší časovou náročností a vyžadující minimální množství rozpouštědel.

Příprava vzorku

3 ml piva byly přesáty přes kondicionovanou extrakční kolonku Separcol SIX C 18 (kondicionace kolony: promytí 2 ml methanolu a následně 2 ml destilované vody, kolonka před aplikací nesmí vyschnout). Vzhledem k malému objemu nebylo nutné pivo předem filtrovat. Po průtoku piva byla kolonka vysušena ve vakuu a poté vymyta 2 ml extrakčního roztoku.

Následně byly porovnány dosažené výtěžnosti dvou různých rozpouštědel:

- I. 40 % methanol v 0,01 M KH_2PO_4 o pH = 2,0
- II. 20 % acetonitril ve vodě, před vymytím tímto roztokem byla kolonka vypláchnuta ještě 0,5 ml hexanu

Výtěžnost byla zjišťována pro vodné roztoky HMF a 2-furfuralu o známé koncentraci 1000 $\mu\text{g/l}$. Lze předpokládat, že v pivu bude vlivem přítomného ethylalkoholu tato výtěžnost snížena.

Zjištěné výtěžnosti byly následující:

- I. 2-furfural 104 %, HMF 78 %
- II. 2-furfural 117 %, HMF 104 %

Pro extrakci HMF a 2-furfuralu z reálných vzorků piva byl tudíž za extrakční činidlo zvolen 20 % acetonitril ve vodě. Získaný extrakt byl následně analyzován metodou HPLC.

Podmínky na kapalinovém chromatografu:

- Kapalinový chromatograf: fa Hewlett-Packard 1090, detektor s diodovým polem
- Kolona: Lichrosorb RP-18, 5 μm (200 \times 4,6 mm) firmy HP
- Mobilní fáze: binární s gradientem
A: 0,01 M KH_2PO_4 o pH = 2,0
B: methanol
- Program: 0–18 min od 5 % B do 23 % B

18 – 23 min od 23 % B do 95 % B

23 – 36 min 95 % B

36 – 40 min od 95 % B do 5 % B

- Detekce: UV, měřicí vlnová délka 283 nm
- Dávkování: 10 μl
- Průtok: 0,7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Teplota kolony: laboratorní teplota (cca 22 °C)

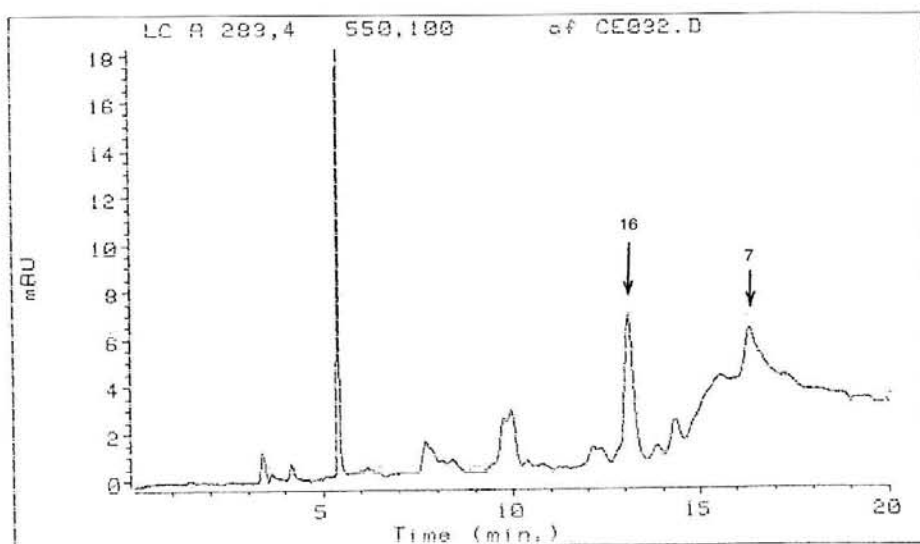
Za výše uvedených analytických podmínek byly získány chromatograficky čisté píky, odpovídající HMF a 2-furfuralu, dokonale oddělené od píků ostatních látek eluované frakce piva (obr. 7). Dosažená výtěžnost této metody byla 95 %, variační koeficient činil 0,6 %.

I když bylo tímto způsobem dosaženo velmi dobré výtěžnosti, byla metoda v této fázi přípravy vzorku materiálově i časově náročná. Hledali jsme proto postup, který by umožnil celkovou dobu analýzy zkrátit a umožnil tak analýzu většího množství vzorků.

Pro tento účel jsme využili schopnost 2-furfuralu vytvářet díky své reaktivnosti azeotropickou směs ve vodném prostředí (minimální azeotrop s bodem varu nižším než bod varu jednotlivých komponent roztoku).

Odzkoušeli jsme proto izolační postup založený na destilaci piva s vodní parou. Bylo analyzováno pivo původní a dále pivo se standardním přídatkem 2-furfuralu 918 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Destilováno bylo 100 ml piva do výsledného objemu 100 ml a dále 200 ml piva rovněž do výsledného objemu 100 ml. Při destilačním poměru 1:1 byla zjištěna výtěžnost 2-furfuralu v destilátu 82,6 %, při poměru 2:1 pouze 76 %. Výtěžnost byla stanovena pouze z hodnot koncentrací zjištěných v destilátu. Dále byla při destilačním poměru 1:1 stanovena koncentrace 2-furfuralu i v destilačních zbytcích. Bylo zjištěno, že poměr obsahu 2-furfuralu v analyzovaném destilátu a v destilačním zbytku činí přibližně 85 : 15.

Je tedy zřejmé, že i když je výtěžnost do-



Obr. 7 Chromatogram 2-furfuralu a 5-hydroxymethyl-2-furfuralu v reálném vzorku piva, získaný pomocí gradientové HPLC

