

Z výzkumu a praxe

STANOVENÍ HALOGENOCTOVÝCH KYSELIN V PIVĚ POMOCÍ KAPILÁRNÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., RNDr. MARIE JURKOVÁ, CSc., Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha

Klíčová slova: halogenoctové kyseliny, plynová chromatografie, pivo

1. ÚVOD

Chloroctová, bromoctová a jodoctová kyselina jsou toxické látky, vyznačující se antimikrobiální aktivitou [1]. Často jsou používány v pivovarských a vinařských provozech ve formě vodného roztoku při sanitaci technologického zařízení.

Zmínka o přítomnosti reziduí halogenoctových kyselin v nápojích, způsobená nedostatečným proplachem technologického zařízení po provedené sanitaci, byla publikována Gilsbachem [2].

Na rozdíl od bromoctové a jodoctové kyseliny, které podléhají hydrolýze, vykazuje chloroctová kyselina v delším časovém úseku (90 dní) poměrně značnou stabilitu [3].

Vzhledem k tomu, že je přítomnost těchto látek v nápojích v zemích Evropského společenství zakázána [4,5], bylo nutné vybrat, odzkoušet a případně modifikovat metodu vhodnou pro jejich stanovení ve výrobcích pivovarského průmyslu.

Většina publikovaných metod je založena na různých způsobech extrakce a derivatizace halogenoctových kyselin a jejich následné detekce pomocí plynové chromatografie [3, 5, 6, 7]. Detekce je nejčastěji prováděna pomocí detektoru elektronového zachytu ECD [3, 5, 7, 8], respektive hmotnostním spektrometrem [6].

Kromě běžných extrakčních metod v systému kapalina-kapalina, založených na vyextrahování halogenoctových kyselin z vodného roztoku do nepolární fáze [3, 5, 6, 7], byly publikovány i postupy využívající k izolaci halogenoctových kyselin extrakci na pevné fázi (SPE). Zatímco Rotenbuecher et al. [9] a Willets et al. [10] použili pro extrakci sloupec silikagelu (Extrelut), Sendra a Todo [11] pracovali se sloupem modifikovaného silikagelu C₁₈.

Ve většině případů jsou po izolaci z vodného roztoku halogenoctové kyseliny stanoveny v derivatizované formě. Nejčastěji je prováděna jejich methylace pomocí BF₃/CH₃OH [9,10] a ethylace pomocí C₂H₅OH/H₂SO₄ [3,6,8]. Jinou možností je využití butylace [7] nebo tvorby pentafluorobenzoyl derivátů [3,7].

K separaci derivátů halogenoctových kyselin jsou používány jak nepolární kolony silikonové [3, 6, 7, 8, 9], tak kolony polární, smočené fází Carbowax 20M [3,6,8].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Za nejsilnější z halogenoctových kyselin

lze považovat kyselinu chloroctovou, jejíž disociační konstanta pK_a je rovna 2,6. Z běžné analytické praxe je známo, že předpokladem úspěšné extrakce látky, přítomné v iontové formě ve vodném roztoku, do roztoku nepolárního, je její převedení do neiontové formy. V tomto případě musí pH vodného roztoku poklesnout minimálně o 2 jednotky oproti pK_a nejsilnější kyseliny, čehož lze docílit například okyselením pomocí HCl. Při extrakci na pevné fázi je však limitujícím faktorem odolnost náplně sorbentu při takto nízké hodnotě pH. S ohledem na rozdílné výsledky publikované jednotlivými autory byla proto výběru vhodného sorbentu věnována zvýšená pozornost.

V první fázi byla vybrána vhodná kolona pro stanovení methylesterů halogenoctových kyselin.

V následující fázi bylo odzkoušeno několik variant extrakce halogenoctových kyselin z modelového roztoku 4 % ethanolu. Navržený finální postup byl ověřen metodou standardních přídatků na reálných vzorcích pív. Za interní standard byla zvolena kyselina dichloroctová.

Použité chemikálie a přístroje

Veškeré používané sklo je nutné před vlastní analýzou dokonale umýt, vypláchnout methanolem a vysušit.

Voda byla používána výhradně redestilovaná ve skle, přechovávána byla ve skleněných nádobách opatřených zabroušenou skleněnou zátkou. Použitá rozpouštědla byla výhradně čistoty p.a., standardy halogenoctových kyselin pocházely od firmy Merck.

Extrakční kolony:

náplň pro SPE kolony Extrelut, balení po 11 g (Merck)

kolony Separon SGX CN, 60 µm (Tessek) kolony Bond Elut SAX, 500 mg, objem 3 ml (Analytichem Int., GB)

kolony Separcol Si C₁₈, 500 mg, pórovitost lože 40 až 100 µm, objem 3 ml (Anapron, SR)

Extrakční zařízení pro SPE extrakci firmy Supelco

Výběr vhodné kolony

K testování byly vybrány dvě třicetimetřové kapilární kolony, a to nízkopolární SPB-5 (Supelco) a středně polární DB-1301 (J&W Scientific) s nízkou tloušťkou filmu vázané fáze a šedesátimetřová nízkopolární

kolona DB-5 (J&W) s vyšší tloušťkou filmu vázané fáze.

Podmínky plynové chromatografie se od sebe mírně lišily v závislosti na typu použité kolony.

* Podmínky na plynovém chromatografu pro 30 m kolonu SPB-5, vnější průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 0,25 µm.

Plynový chromatograf Fisons (Carlo Erba) HRGC 5300

Detektor ECD.

Nosný plyn dusík.

Tlak na koloně 55 kPa (1,8 ml.min⁻¹).

Teplota nástřiku 250 °C.

Teplota detektoru 320 °C.

Objem nástřiku 1,5 µl.

Dělicí poměr 1 : 20, 36 s po nástřiku splitless.

Teplotní program 60 °C (2 min) – 3 °C.min⁻¹ – 80 °C – 40 °C.min⁻¹ – 285 °C

* Podmínky na plynovém chromatografu pro 30 m kolonu DB-1301, vnější průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 0,25 µm.

Plynový chromatograf Fisons (Carlo Erba) HRGC 5300

Detektor ECD.

Nosný plyn dusík.

Tlak na koloně 55 kPa (1,8 ml.min⁻¹).

Teplota nástřiku 250 °C.

Teplota detektoru 320 °C.

Objem nástřiku 1,5 µl.

Dělicí poměr 1 : 20, 30 s po nástřiku splitless.

Teplotní program 55 °C (5 min) – 2,5 °C.min⁻¹ – 80 °C – 40 °C.min⁻¹ – 260 °C

* Podmínky na plynovém chromatografu pro 60 m kolonu DB-5, vnější průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 1,0 µm.

Plynový chromatograf Chrompack CP 9001

Detektor ECD.

Nosný plyn dusík.

Tlak na koloně 85 kPa (2,9 ml.min⁻¹).

Teplota nástřiku 250 °C.

Teplota detektoru 300 °C.

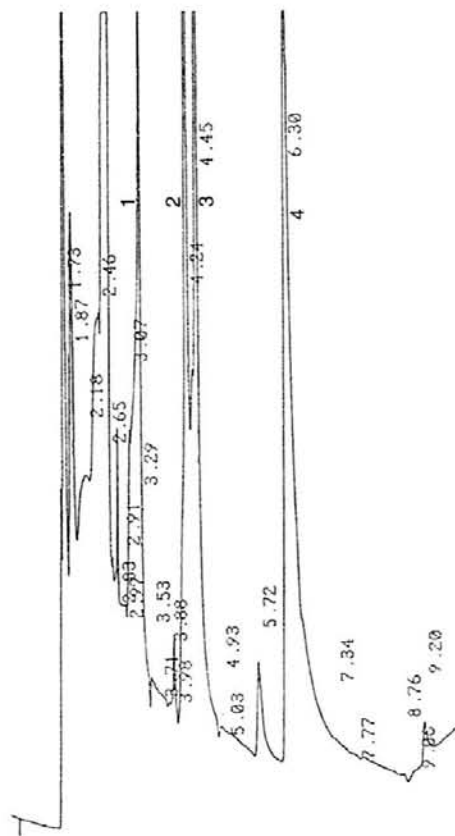
Objem nástřiku 1,5 µl.

Dělicí poměr 1 : 20, 36 s po nástřiku splitless.

Teplotní program 60 °C (3 min) – 4 °C.min⁻¹ – 100 °C (4 min) – 40 °C.min⁻¹ – 280 °C (7 min)

Docílené dělení stanovených látek na 30 m koloně SPB-5 nelze z důvodu nedokonalé separace pík kyseliny bromoctové a dichlor-

octové považovat za plně uspokojivé (obr. 1). Jednotné označení analytů na chromatogramech je následující: 1 – kyselina chloroc-



Obr. 1. Chromatogram methylesterů halogenoacetic kyselin na 30 m kapilární koloně SPB-5, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu vázané fáze 0,25 μm (směs standardů).

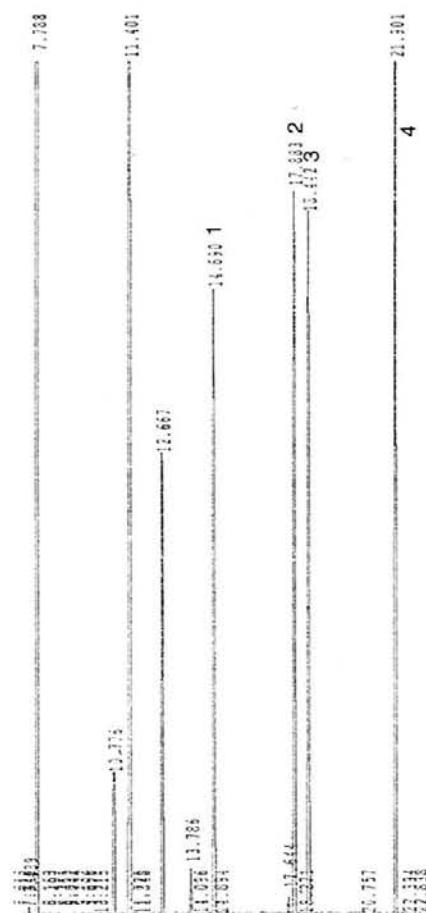
tová, 2 – kyselina bromoctová, 3 – kyselina dichloroctová (vnitřní standard), 4 – kyselina jodoctová.

Poněkud lepší výsledky byly dosaženy na středněpolární koloně DB-1301. Separace píků kyseliny bromoctové a dichloroctové zde byla dokonalá, nicméně je z chromatogramu (obr. 2) patrna interference koelující látky u píku náležejícího kyselině chloroctové. Naproti tomu chromatogram směsi halogenoacetic kyselin na 60 m koloně DB 5 lze považovat za plně vyhovující (obr. 3).

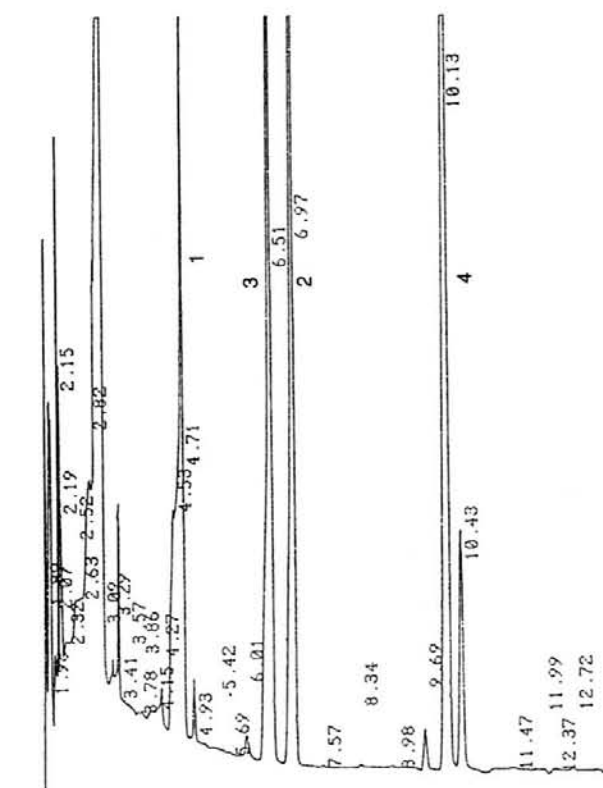
Výběr vhodné extrakční metody

Bylo odzkoušeno několik extrakčních postupů využívajících metody extrakce na pevné fázi, respektive jejich kombinaci s klasickými extrakčními postupy.

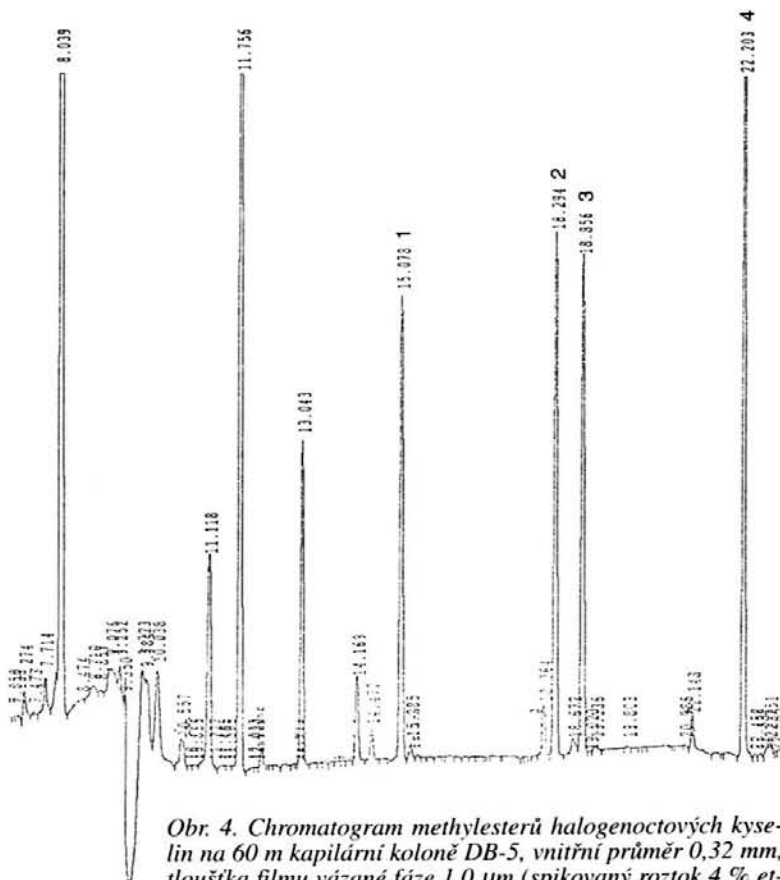
V případě extrakce na pevné fázi byl zvolen jako sorbent nemodifikovaný silikagel Extrelut a dále kolony plněné sorbentem na bázi modifikovaného silikagelu nesoucí kyanopropylovou skupinu (Separon SGX CN) a kvarterní aminoskupinu (Bond Elut SAX). Výsledky docílené po sorpci 20 ml modelového roztoku, obsahujícího směs halogenoacetic kyselin (1000, 100, 100 resp. 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$) na sloupci 20 g Extrelutu, lze označit za naprosto nevyhovující. Docílená výtěžnost po extrakci dichlormethanem činila 1 až 5 %, přičemž chromatogram vykazoval přítomnost značného počtu interferujících látek. Docílené výsledky byly tudíž v příkrmu rozporu s výsledky publikovanými Willettsem et al., avšak plně korespondovaly se závěry Sendry a Toda. Nízká výtěžnost a přítomnost interferencí je zřejmě způsobena



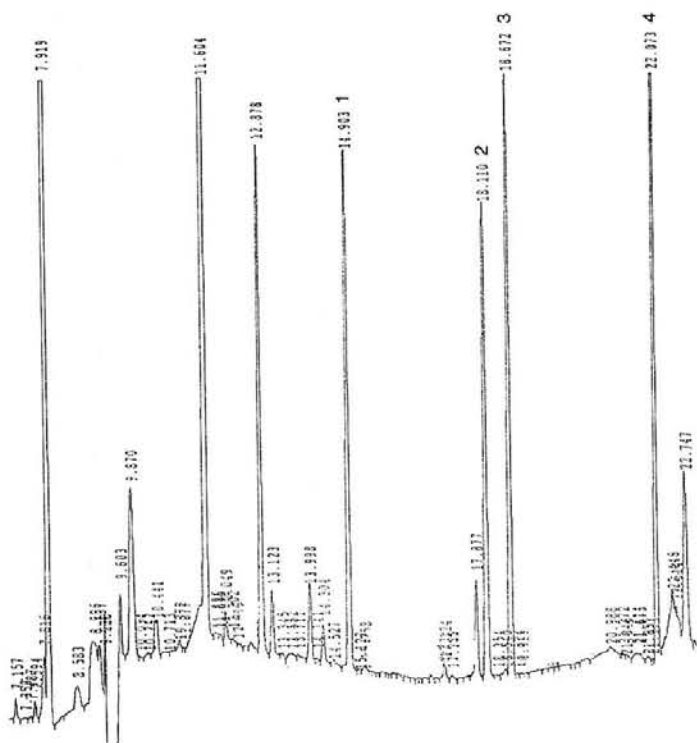
Obr. 3. Chromatogram methylesterů halogenoacetic kyselin na 60 m kapilární koloně DB-5, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu vázané fáze 1,0 μm (směs standardů).



Obr. 2. Chromatogram methylesterů halogenoacetic kyselin na 30 m kapilární koloně DB-1301, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu vázané fáze 0,25 μm (směs standardů).



Obr. 4. Chromatogram methylesterů halogenoacetic kyselin na 60 m kapilární koloně DB-5, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu vázané fáze 1,0 μm (spikovaný roztok 4 % ethanolu, bez stabilizace pufrem).



Obr. 5. Chromatogram methylesterů halogenoacetic kyselin na 60 m kapilární koloně DB-5, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu vázané fáze 1,0 μm (spikovaný roztok 4 % ethanolu, deriváty stabilizovaný pufrem).

degradaci lože sorbentu při pH rovném 0,5, neboť výrobcem udávaná mezní hodnota pH činí 1,0.

Obdobné negativní výsledky byly dosaženy i v případě použití kolonky Separon SGX CN.

Poněkud lepších výsledků bylo u této modelového roztoku docíleno na kolonkách Bond Elut SAX, zejména v případě kondicionace kolonky a stabilizace derivátů fosfátovým pufrem o pH rovném 7,2, jak vyplývá z porovnání ploch jednotlivých piků analytů (obr. 4 a 5). Nicméně i zde byla dosažena v případě chloroacetic kyseliny výtěžnost 25 %, u ostatních látek však pouze 10 %.

S ohledem na výše uvedené výsledky jsme se rozhodli pro modifikaci postupu navrženého Sendrou a Todem, spočívající v kombinaci extrakce na pevné fázi a klasické extrakční metody. V prvním kroku byly na kolonku naplněné modifikovaným sorbentem C_{18} odstraněny z analyzované matrice některé interferující nízkopolarní složky, v následujícím kroku byly z předčistěného eluátu halogenoacetic kyseliny vyextrahovány do octanu ethylátého. Po zahuštění extraktu následovala derivatizace (methylace) analytu a stanovení methylderivátů pomocí detektoru ECD.

Pracovní postup

Vlastní pracovní postup se skládá z následujících kroků:

a) Přechistění matrice na sloupci sorbentu C_{18} . Byla použita kolonka Separon Si C_{18} . Kolonka byla kondicionována přidávkou 3 ml methanolu a 3 ml redestilované vody. Ihned následoval přidávek 20 ml vzorku a po ukončení filtrace byla kolonka promyta 1 ml redestilované vody. Ke spojeným extraktům v kádince byly přidány 2 g NaCl a 10 μl interního standardu kyseliny dichloroacetic o koncentraci 0,2 g.l^{-1} . Pomocí přidávku koncentrované HCl bylo upraveno pH vzorku na hodnotu 0,5 a vzorek byl sonifikován 1 minutu. Dále byl vzorek rozdělen do 4 skleněných květ o objemu 10 ml a každá květa byla extrahována za intenzivního třepání 2,5 ml octanu ethylátého. Vzniklá emulze byla rozbita odstředěním při 3900 min^{-1} po dobu 4 minut. Čistý extrakt (horní vrstva) byl přenesen pomocí Pasteurovy pipety do kádinky obsahující 2 g bezvodého

Na_2SO_4 . Tento postup byl opakován čtyřikrát. Spojené a předsušené extrakty byly následně převedeny do srdcové baňky a zbylý Na_2SO_4 v kádince propláchnut 5 ml octanu ethylátého. Extrakt byl zahuštěn na rotačním vakuovém odpařovači při teplotě max. 35 $^{\circ}\text{C}$ téměř do sucha a odparek rozpuštěn v methanolu a doplněn na objem 2 ml.

b) Derivatizace halogenoacetic kyselin

Do derivatizační nádoby s kónickým dnem o objemu 4 ml bylo napipetováno 1,5 ml n-hexanu, 200 μl extraktu a 300 μl 20 % roztoku BF_3 v methanolu. Nádoba byla uzavřena a po intenzivním protřepání byla ponechána 1 hodinu při 85 $^{\circ}\text{C}$. Po ukončení derivatizace byl obsah nádoby ochlazen ledovou vodou a horní hexanová fáze odebrána. Lze ji přechovávat před vlastní analýzou v uzavřených ampulích v mrazáku při -18 $^{\circ}\text{C}$ i po dobu několika dní.

c) Stanovení halogenoacetic kyselin pomocí kapilární plynové chromatografie

Obsah halogenoacetic kyselin byl stanoven pomocí kapilární plynové chromatografie na 60 m koloně DB 5 (viz výše uvedené podmínky).

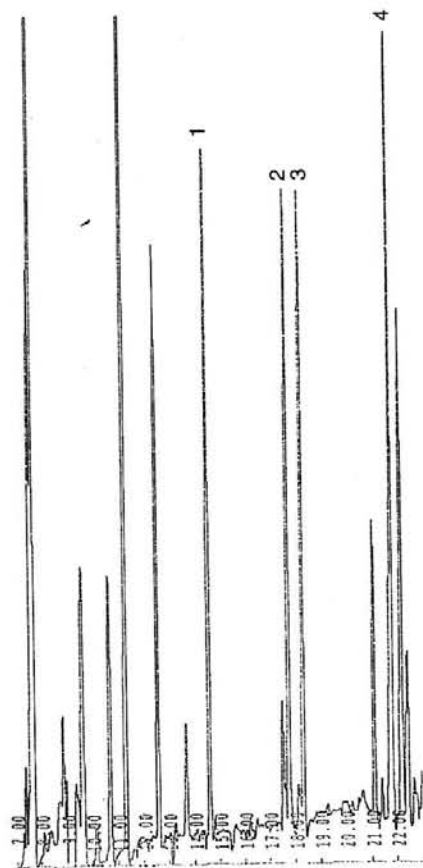
Kalibrace byla provedena následujícím způsobem.

Do derivatizační nádoby s kónickým dnem o objemu 4 ml bylo napipetováno 1,5 ml n-hexanu, 180 μl methanolu a 20 μl směšného standardu o koncentraci kyseliny chloroacetic (100 mg.l^{-1}), dichloroacetic (10 mg.l^{-1} , IS), bromoacetic (10 mg.l^{-1}) a jodoacetic (5 mg.l^{-1}) v methanolu. Dále bylo přidáno 300 μl 20 % roztoku BF_3 v methanolu. Další postup byl shodný s výše uvedeným postupem pro derivatizaci a stanovení halogenoacetic kyselin ve vzorcích.

Chromatogram reálného vzorku 12 % světlého piva s přidávkou směšného standardu halogenoacetic kyselin (odpovídá koncentraci jednotlivých kyselin 1000, 100, 100 a 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ piva) je uveden na obr. 6.

Výtěžnost halogenoacetic kyselin činila v průměru u kyseliny chloroacetic 98 %, u kyseliny dichloroacetic a bromoacetic 96 % a u kyseliny jodoacetic 93 %. Detekční limit byl u kyseliny chloroacetic nižší než 0,1 mg.l^{-1} , u kyseliny dichloroacetic a bromoacetic nižší než 0,05 mg.l^{-1} a u kyseliny jodoacetic se pohyboval pod hranicí 0,01 mg.l^{-1} . V rámci ověřování metody byly porovnány u 8 vzorků piv z obchodní sítě způsoby vyhodnocení metodou externí (absolutní) kalibrace a metodou interního standardu, přičemž nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Relativní směrodatné odchylky se u jednotlivých látek pohybovaly v rozmezí 3 až 7 %. V běžné praxi se jeví jako účelnější využít metodu interního standardu, a to proto, že byl v případě některých speciálních piv pozorován enormní vznik stabilních emulzí při extrakci. To může negativně ovlivnit výtěžnost metody.

Ani u jednoho z osmi analyzovaných vzorků piv nebyla zjištěna přítomnost reziduí halogenoacetic kyselin.



3. ZÁVĚR

Navržená metoda stanovení obsahu halo-genocetových kyselin v pивě umožňuje jejich stanovení s dostatečnou přesností a citlivostí. V porovnání s metodou publikovanou Sendrou a Todem se podařilo docílit zjednodušení extrakčního i derivatizačního postupu. V některých případech lze vypustit prvý, předčistovací stupeň na kolonce Separcol C₁₈, v běžné praxi je však výhodné této možnosti využít. Derivatizace pomocí BF₃/CH₃OH a analytická koncovka využívající 60 m kapilární kolonu DB-5 s vyšší tloušťkou filmu a detektor ECD poskytuje chromatogramy, u nichž jsou píky stanovených látek prosty případných interferencí. Výše uvedenou metodu lze proto doporučit

pro rutinní kontrolu v rámci pivovarského průmyslu.

LITERATURA

- [1] DICKENS, F.: Biochem. J. **27**, 1933, s. 1141.
- [2] GILSBACH, W.: Deutsche Lebensm. Rsch. **82**, 1986, s. 107.
- [3] GUYOT, A. M., BALATRE, P.: Annales des Falsifications Experimentale Chimique **61**, 1968, s. 346.
- [4] Council of the European Communities, 1987, Regulation No. 822/87.
- [5] NIJBOER, L.: De Ware(n)-Chemicus **15**, 1985, s. 18.
- [6] FÜRST, P., et al.: Lebensm. Unters. Forsch. **185**, 1987, s. 17.
- [7] LUCKAS, B., Z.: Lebensm. Unters. Forsch. **184**, 1987, s. 30.
- [8] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, 1989, L 36.00-10.
- [9] ROTHENBÜCHER, L., WEISHAAR, R., KÖBLER, H.: Lebensmittelchemie Gerichtliche Chemie **40**, 1986, s. 4.
- [10] WILLETTTS, P., DENNIS, M. J., MASSEY, R. C.: Food Addit. Contam. **8**, 1991, s. 119.
- [11] SENDRA, J. M., TODO, V.: J. Inst. Brew. **96**, 1990, s. 85.

*Lektoroval Ing. Pavel Dostálek, CSc.
Do redakce došlo 15. 10. 1997*