

# STANOVENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ A POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ V PIVĚ

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

**Klíčová slova:** pivo, PAH, PCB, extrakce kapalina-kapalina

## 1. ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a polychlorované bifenyly (PCB) patří mezi kontaminanty ohrožující životní prostředí a tudíž i zdravotní nezávadnost potravin. Povolný obsah těchto látek je vzhledem k jejich charakteru určen vyhláškou MZd ČR č. 298/1997 Sb. k zákonu č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích platnou od 1.1.1998.

Vzhledem k požadovaným limitům je třeba jednotlivé analyty před vlastním stanovením izolovat a zakonzentrovat v poměru 1:100 až 1:1000.

K izolaci analytů z kapalných vzorků se používá extrakce v systému kapalina-kapalina [1] nebo extrakce na pevné fázi (SPE) [2]. Při zpracování piva extrakcí kapalina-kapalina je problémem vznik velmi stabilní emulze a vzhledem k složitosti matrice i čistota extraktu [3]. Omezení tvorby emulzí se docíluje různými způsoby vysolení [4]. Rozrušení již vzniklé emulze je možné ultrazvukem nebo centrifugací [5]. Metodu SPE při použití extrakčních kolonek komplikuje obtížné prosátí většího množství vzorku (přibližně 1 l) přes vrstvu adsorpčního prostředku v důsledku přítomnosti koloidních částic v pivu. Pro stanovení PCB je použití extrakčních kolonek s fází C18 vzhledem k neuspokojivé výtěžnosti naprosto nevhodné [6]. Z důvodů snadnějšího prosátí větších objemů vzorku se jeví perspektivnější SPE na extrakčních discích [7].

Pro konečné stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí a pro

polychlorované bifenyly plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (ECD) [2].

Účelem této práce bylo vypracovat dle požadavků legislativy spolehlivou metodu stanovení PAH a PCB v pivu s využitím extrakce kapalina-kapalina, která by umožňovala společné zakonzentrování těchto látek v jednom extrakčním kroku a získání dostatečně čistého extraktu pro analýzu plynovou chromatografií s využitím detektoru elektronového záchytu.

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1. Použité chemikálie, standardy

n-Hexan SupraSolv, diethylether p.a., acetonitril pro gradientovou analýzu, Extrelut – vše Merck, SRN

aceton p.a. – Lachema, ČR

Florisil PR 60-100 mesh, bezvodý síran sodný – Fluka, Švýcarsko  
ultračistá voda – Milli-RO 5plus – Millipore, USA

Dusík v kvalitě 4,6 a dusík v kvalitě ECD – MGO, ČR

PCB – Mix 3 obsahující tyto kongenery:

28 (2,4,4'-trichlorbifenyly),  
52 (2,2',5,5'-tetrachlorbifenyly),  
101 (2,2',4,5,5'-pentachlorbifenyly),  
118 (2,3',4,4',5-pentachlorbifenyly),  
138 (2,2',3,4,4',5'-hexachlorbifenyly),  
153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorbifenyly),  
180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorbifenyly).

Směs byla jak v isooktanovém, tak v acetonitrilovém roztoku, každý kongener o koncentraci 10 ng/μl – Dr.Ehrenstorfer, SRN.

PAH: benzo(a)anthracen, benzo(b)fluoranthen, chrysen, dibenzo(a,h)anthracen, benzo(a)pyren, benzo(k)fluoranthen, indeno(1,2,3-

cd)pyren v acetonitrilovém roztoku o koncentraci 50 ng/μl – Slovenský metrologický ústav, Slovensko;

dibenzo(a,i)pyren, dibenzo(a,h)pyren v acetonitrilovém roztoku o koncentraci 10 ng/μl – Dr.Ehrenstorfer, SRN.

### 2.2. Podmínky stanovení jednotlivých typů látek

#### a) Stanovení PAH

Kapalinový chromatograf: Hewlett Packard HP 1090 s programovatelným fluorescenčním detektorem HP 1046A

Kolona: LiChrospher PAH 250x4 mm (Merck, SRN)

Mobilní fáze: acetonitril-voda

Gradient: 0–20 min (80–100 % acetonitrilu)

20–40 min (100 % acetonitrilu)

40–42 min (100–80 % acetonitrilu)

Detekce: fluorescenční s následujícím programem excitačních (ex.) a emisních (em.) vlnových délek:

0–10,4 min ex. 264 nm, em. 384 nm

10,4–16 min ex. 280 nm, em. 430 nm

16,0–42 min ex. 290 nm, em. 484 nm

Nástřik: 20 μl

#### b) Stanovení PCB

Plynový chromatograf: Chrompack CP 9001

Kolona: DB-5, délka 30 m, průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 0,25 μm

Průtok nosného plynu (dusík): 1,8 ml/min

Detektor: ECD

Teplota detektoru: 310 °C

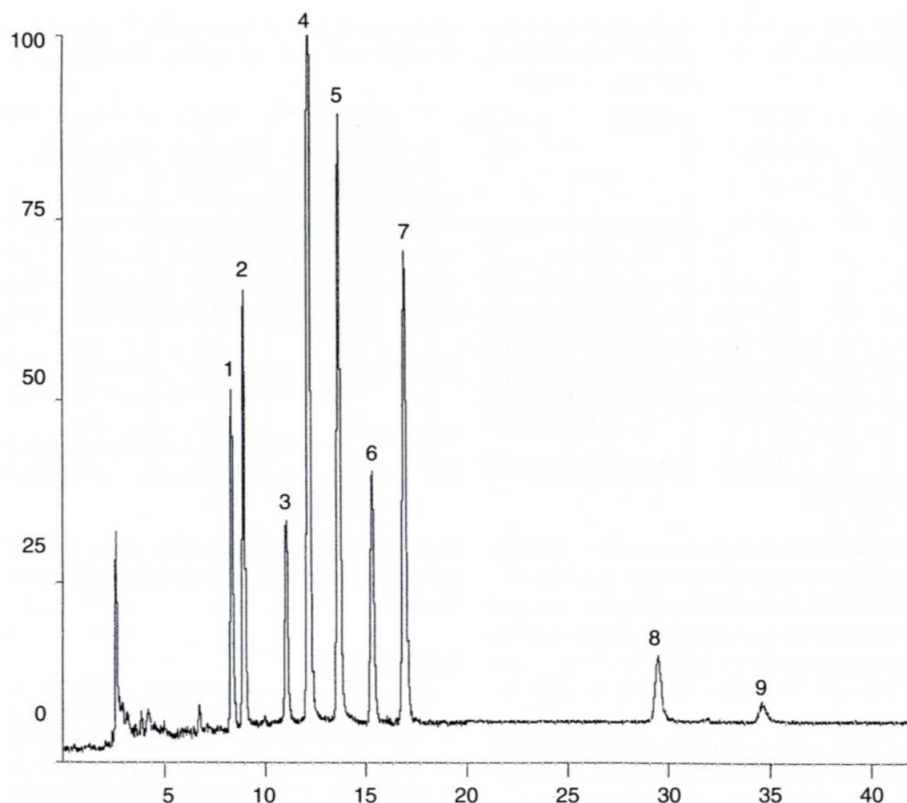
Teplota injektoru: 260 °C

Nástřik: splitless po dobu 36 s, pak dělicí poměr 1:20

Teplotní program: 70 °C (prodleva 2 min),

25 °C/min do 200 °C (prodleva 0 min),

2 °C/min do 250 °C (prodleva 0 min),



Obr. 1 Chromatogram reálného vzorku 12% piva obohaceného směsí polycyklických aromatických uhlovodíků v množství 200 ng/l: 1 – benzo(a)anthracen, 2 – chrysen, 3 – benzo(b)fluoranthén, 4 – benzo(k)fluoranthén, 5 – benzo(a)pyren, 6 – dibenzo(a,h)anthracen, 7 – indeno(1,2,3-cd)pyren, 8 – dibenzo(a,i)pyren, 9 – dibenzo(a,h)pyren

50 °C/min do 290 °C (prodléva 10 min)  
Objem nástřiku: 1 µl

### 2.3. Pracovní postup

Vzorek piva o objemu asi 1 l se důkladně odpění v ultrazvukové lázni. Pak se přidá 20 ml hexanu a extrakční láhev se umístí na třepačku LT-2, kde se třepe po dobu 15 min při velikosti kyvu 40 mm a frekvenci 70 – 85 kyvů/min. Za účelem důkladného oddělení fází se vzorek v extrakční láhvi nechá stát v klidu po dobu minimálně 20 min od konce třepání. V dalších krocích se provede separace a čištění extraktu.

Separace extraktu se provede následujícím způsobem: skleněná kolona (délka 18 cm, průměr 1,5 cm, zakončená fritou) se naplní 6 g sorbentu Extrelut. Lehkým poklepáním kolony se docílí setřesení sorbentu. Jeho aktivace se provede 9 ml ultračisté vody. Pomocí Hrivňákova nástavce se oddělí emulze extraktu analytů z analyzovaného piva v extrakční láhvi a přenesou se na připravenou kolonu se sorbentem Extrelut. Průtok extraktu kolonou je urychlen připojením vodní vývěvy. Získaný hexanový eluát se potom rozdělí na dvě části:

- a) 3 – 4 ml pro stanovení PAH,
- b) zbytek (okolo 10 ml) pro stanovení PCB.

#### a) Stanovení PAH

Alikvot hexanového eluátu se pod mírným proudem dusíku za laboratorní teploty odpaří do sucha a poté rozpustí v 1 ml 80% acetonitrilu ve vodě. Získaný roztok v množství 20 µl se použije k nástřiku na kolonu kapalinového chromatografu.

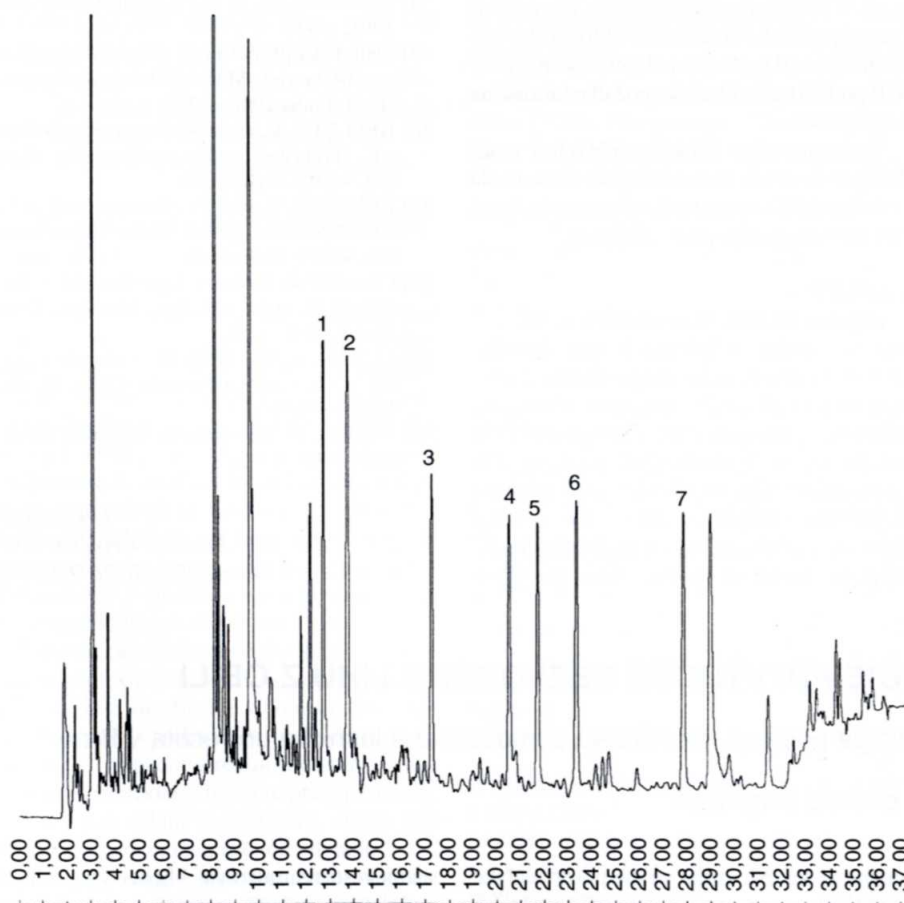
#### b) Stanovení PCB

Pro stanovení PCB se hexanový eluát musí ještě přečistit. Čištění se provádí na kolonce (délka 13 cm, průměr 0,8 cm, zakončená fritou) naplněné přibližně 3 g sorbentu Florisil převrstveného bezvodým síranem sodným (asi 0,5 g). Těsně před použitím se kolonka promyje přibližně 5 ml hexanu.

Hexanový eluát získaný po průtoku kolonou se sorbentem Extrelut se zahustí při laboratorní teplotě odfoukáním pod dusíkem na objem okolo 1 ml a nanese se na připravenou kolonku se sorbentem Florisil. Eluce se provádí 25 ml roztoku 6 % diethyletheru v hexanu. Takto přečištěný extrakt se zakonzentruje na Kuderna-Danishově aparatuře při teplotě vodní lázně 70 – 80 °C a dále se odfouká pod jemným proudem dusíku při laboratorní teplotě do sucha. Odparek se nakonec rozpustí v 200 µl hexanu, kterými se opláchnou stěny zkumavky a 1 µl se použije pro analýzu PCB metodou GC-ECD.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Použití smočeného sorbentu Extrelut, což je obchodní název pro vysoce porézní přírodní zeminu [8], účinným způsobem rozrušuje vzniklou emulzi a poskytuje vysoký podíl (až 15 ml) z původních 20 ml extrakčního roztoku. Tento relativně vysoký výtěžek umožňuje rozdělit extrakt na dvě části a zpracovat podle typu analýzy. Tím dochází ke značné úspoře času a extrakčního rozpouštědla ve srovnání se samostatnou extrakcí pro každý typ analýzy.



Obr. 2 Chromatogram reálného vzorku 12% piva obohaceného směsí kongenerů polychlorovaných bifenyliů v množství 10 ng/l: 1 – PCB kongener 28, 2 – PCB kongener 52, 3 – PCB kongener 101, 4 – PCB kongener 118, 5 – PCB kongener 153, 6 – PCB kongener 138, 7 – PCB kongener 180



Tabulka 1 Charakteristika metody pro stanovení PAH: výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, mez detekce a mez stanovení pro jednotlivé analyty

Analyt	Výtěžnost (%)	Relativní směrodatná odchylka (%)	Mez detekce (ng/l)	Mez stanovení (ng/l)
benzo(a)anthracen	120	25	19	40
benzo(b)fluoranthén	87	10	22	43
benzo(k)fluoranthén	79	9	9	18
chrysen	120	21	7	14
dibenzo(a,h)anthracen	63	7	15	31
benzo(a)pyren	83	28	4	7
indeno(1,2,3-cd)pyren	86	10	15	20
dibenzo(a,i)pyren	54	16	9	15
dibenzo(a,h)pyren	50	14	3	4

Typické chromatogramy uměle kontaminovaného 12 % piva jsou uvedeny na obr. 1 a 2. Vyplývá z nich, že čistota extraktů je dostatečná (po přečištění na Florisilu i pro GC-ECD analýzu) a nedochází k rušivým interferencím.

Charakteristika metody je shrnuta v tabulkách 1 a 2. Výtěžnost a relativní směrodatná odchylka byla stanovena z deseti přídavek acetonitrilového roztoku standardů ke 12 % pivu (PCB na hladině 10 ng/l pro každý kongener, PAH na hladině 100 ng/l pro každý polycyklický uhlovodík). Mez detekce (LD) a mez stanovení (LS) byla určena z deseti slepých pokusů metody, a to podle vztahů

$$LD = c + 2,82s$$

$$LS = 10s,$$

kde  $c$  je průměrná koncentrace látky,  $s$  je směrodatná odchylka [9, 10].

Výtěžnosti některých látek na relativně nízké hladině 10 ng/l resp. 100 ng/l sice postačují pro potřeby kontrolních analýz, ale přesto nejsou zcela uspokojivé. S extraktem se provádí, zejména při stanovení PCB, mnoho operací, při kterých by mohly vznikat ztráty. Proto byla s hexanovým roztokem standardů ověřena výtěžnost jednotlivých dílčích kroků – odfoukávání pod dusíkem, průtok přes sorbenty Extrelut a Florisil. Dosažené výsledky se u všech sledovaných látek pohybovaly od 88 % do 119 %. Podstatně nižší výtěžnost u reálného vzorku piva dosahující hodnot 50 až 120 %, v průměru 79 %, pro všechny zkoumané látky (průměrná výtěžnost u PAH byla 82 %, zatímco u PCB byla nižší a činila 74 %) je tedy zřejmě způsobena

Tabulka 2 Charakteristika metody pro stanovení PCB: výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, mez detekce a mez stanovení pro jednotlivé analyty

Analyt	Výtěžnost (%)	Relativní směrodatná odchylka (%)	Mez detekce (ng/l)	Mez stanovení (ng/l)
PCB 28	75	15	0,5	1,1
52	120	12	0,8	2,1
101	63	18	0,6	1,4
118	68	15	0,2	0,3
138	76	29	0,7	1,9
153	64	20	0,5	1,1
180	51	18	0,9	2,0

vlastní extrakcí do hexanu, při níž se pravděpodobně výrazně uplatní matriční efekt.

Relativní směrodatná odchylka vykazuje pro všechny měřené analyty hodnoty < 30 %, průměrná hodnota pro PAH činí 15,5 %, pro PCB 18,1 %. Vzhledem k tomu, že jde o stopovou analýzu v nanogramových množstvích, tedy o řád či spíše o dva řády níže než při běžných analýzách v pivovarství, získané hodnoty relativní směrodatné odchylky představují uspokojivé výsledky.

Meze detekce a stanovení se pro PAH pohybují v desítkách nanogramů, pro PCB dokonce v jednotkách nanogramů na litr piva a jsou pro požadavky legislativy zcela dostačující. V běžné praxi jsou hodnoty pro jednotlivé polycyklické aromatické uhlovodíky stanovené pod 50 ng/l a pro jednotlivé kongenery PCB pod 10 ng/l z hlediska požadavků zákona nevýznamné.

Spektrum takto extrahovatelných a v následných krocích stanovitelných látek se dá rozšířit o další významné kontaminanty, které však nebyly do této práce zahrnuty.

#### 4. ZÁVĚR

Popsaná metoda řeší problém velmi stabilních emulzí vznikajících při extrakci vzorků do nepolárního rozpouštědla a problém čištění získaného extraktu. Umožňuje stanovení vybraných PAH a kongenerů PCB požadovaných legislativními předpisy ČR v nanogramových množstvích a při relativní směrodatné odchylce < 30 %. Jde o velmi efektivní metodu, neboť v rámci jednoho extrakčního kroku je možné stanovení všech

výše uvedených kontaminantů, a tak dochází ke značné úspoře času a extrakčního rozpouštědla.

#### LITERATURA

- [1] Determinations of pesticides and PCBs in water and soil sediment by GC-MS. Method 680; Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, 1985
- [2] LENÍČEK, J., et al.: Chem. Listy **87**, 1993, s. 852
- [3] KELLNER, V., et al.: Výzkum cizorodých látek, (Průběžná zpráva výzkumného úkolu 07). VÚPS, Praha 1992
- [4] JANSSEN, B., et al.: J. Anal. Chem. **340**, 1991, s. 439
- [5] Metodická příručka pro stanovení ukazatelů znečištění vod, Ministerstvo životního prostředí, Praha 1993, s. 182
- [6] KELLNER, V., et al.: Výzkum cizorodých látek, (Průběžná zpráva výzkumného úkolu 07). VÚPS, Praha 1993
- [7] KELLNER, V., et al.: Výzkum cizorodých látek, (Průběžná zpráva výzkumného úkolu 07). VÚPS, Praha 1994
- [8] ChromBook, Extrelut: Liquid-liquid extraction at its most effective, literatura firmy Merck, 1996, s. 21
- [9] LUŇÁK, J., BAUDYŠ, P.: Statistické výpočty v analytické laboratoři, ČZPI, Hradec Králové 1995, s. 3.
- [10] ANDĚL, J.: Matematická statistika, STNL, Praha 1985, s. 326

Lektoroval:  
doc. ing. Jaroslav Čepička, CSc.  
Do redakce došlo 9.4.1999