

STANOVENÍ CHLOROVANÝCH ALIFATICKÝCH UHLOVODÍKŮ V PIVU

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

Klíčová slova: pivo, chlorované alifatické uhlovodíky, headspace analýza, plynová chromatografie

1. ÚVOD

Chlorované alifatické uhlovodíky tvoří významnou skupinu cizorodých látek, jejichž přítomnost může zásadním způsobem ovlivňovat zdravotní nezávadnost potravin. I když se postup výroby piva vyznačuje vylučovacími a separačními procesy, ve kterých dochází k odstraňování řady potenciálních kontaminantů, takže hotové pivo obsahuje méně škodlivých látek než použité suroviny [1, 2], mohou se chlorované uhlovodíky v pivu přesto objevit. Způsoby, jak se do piva dostanou, jsou v zásadě dva. První je důsledkem kontaminace spodních a povrchových vod v přírodě. Druhým způsobem je vznik těchto látek při technologickém zpracování pitné vody, které má za cíl dosažení mikrobiologické čistoty [3].

K zamezení možných dopadů těchto látek na lidské zdraví stanovuje vyhláška MZd ČR č. 298/1997 Sb. k zákonu č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích platná od 1. 1. 1998 pro nápoje a tedy i pro pivo limitní hodnotu. Ta je definována jako přípustné množství součtu osmi respektive jedenácti chlorovaných alifatických uhlovodíků (včetně polohových izomerů) a představuje hodnotu

70 µg/l. Přehled jednotlivých látek včetně jejich izomerů je uveden v *tab. 1*.

Těkavé chlorované uhlovodíky lze stanovit na plynovém chromatografu s kapilární kolonou a s detektorem elektronového záchytu nebo hmotnostně selektivním detektorem pro jednoznačnou identifikaci složek. Předtím je však nutné látky oddělit od matrice. K tomu se používá několik technik: přímá extrakce kapalina-kapalina; otevřená dynamická headspace (záchyt na sorbentu a uvolnění tepelnou desorpcí); uzavřená dynamická headspace (záchyt na aktivní uhlí a uvolnění kapalinovou extrakcí) a statická headspace technika [4].

Extrakce do organické fáze, nejčastěji n-pentanu [5], je velmi neselektivní a u matrice, jakou je pivo, je nutné provést ještě přečištění extraktu, při kterém však dochází ke značným ztrátám nejtěkavějších sloučenin. U dynamických headspace metod je největším problémem pění piva. Statická headspace se vyznačuje na rozdíl od dynamických metod menší citlivostí, ale i přesto umožňuje stanovit koncentrace plně vyhovující legislativním požadavkům. Její výrazná přednost spočívá v minimálních časových a pracovních náro-

cích na přípravu vzorku a možnosti snadné automatizace [6]. Proto nalezla široké uplatnění při stanovení tohoto typu látek [7, 8, 9].

Princip statické headspace metody je založen na ustavení mezifázové rovnováhy kapalina-pára v septem uzavřené vialce. Distribuce látek mezi těmito dvěma fázemi je závislá na teplotě, parciálním tlaku každé látky, vlivu matrice a poměru objemu plynné a kapalné fáze. Vzhledem k tomu, že do plynné fáze přednostně přecházejí těkavé látky, dochází tak k určité formě čištění vzorku. Další výhodou tohoto postupu je skutečnost, že se na kolonu plynového chromatografu nastříkuje vzorek odebraný z plynné fáze, a tak se snižuje kontaminace kolony a detektoru a minimalizují se chromatografické interference [10].

Účelem této práce bylo optimalizovat a validovat metodu statické headspace techniky pro stanovení chlorovaných alifatických uhlovodíků v pivu dle požadavků legislativních předpisů ČR.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Použité chemikálie, standardy

aceton p.a., ethanol p.a. – Lachema, ČR; ult-

Tab. 1 Přehled chlorovaných alifatických uhlovodíků včetně polohových izomerů požadovaných vyhláškou MZd ČR č. 298/1997 Sb. k zákonu č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích

Látka	Systematický název
dichlormethan	dichlormethan
dichlorethan	1,1-dichlorethan 1,2-dichlorethan
chloroform	trichlormethan
trichlorethan	1,1,1-trichlorethan 1,1,2-trichlorethan
trichlorethylen	1,1,2-trichlorethen
tetrachlorethylen	1,1,2,2-tetrachlorethen
tetrachlormethan	tetrachlormethan
tetrachlorethan	1,1,1,2-tetrachlorethan 1,1,2,2-tetrachlorethan

račistá voda – Milli-RO 5plus – Millipore, USA; dusík v kvalitě ECD – MGO, ČR; dichlormethan, trichlormethan, tetrachlormethan, 1,1,2-trichlorethen, 1,1,2,2-tetrachlorethen – Merck, SRN; 1,1-dichlorethan – Supelco, USA; 1,2-dichlorethan, 1,1,1-trichlorethan, 1,1,2-trichlorethan, 1,1,1,2-tetrachlorethan, 1,1,2,2-tetrachlorethan – Aldrich, USA.

Zásobní roztok standardů byl připraven navážením a rozpuštěním přibližně 0,2 g každé látky do 50 ml ethanolu. Pracovní roztoky byly připraveny 400násobným respektive 4000násobným ředěním zásobního roztoku. Jednotlivé kalibrační standardy byly připravovány v den měření rozpuštěním 10 – 150 µl pracovního roztoku v 10 ml 4% ethanolu v ultracisté vodě.

2.2. Podmínky stanovení

Plynový chromatograf: Carlo Erba 5300 Mega series
Kolona: J&W DB 624, délka 60 m, průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 1,8 µm
Průtok nosného plynu (dusík): 1,8 ml/min.
Detektor: ECD
Teplota detektoru: 310 °C
Teplota injektoru: 260 °C
Nástřik: split 1:10
Teplotní program: 50 °C (prodleva 5 min), 10 °C/min do 60 °C (prodleva 0 min), 8 °C/min do 150 °C (prodleva 0 min), 30 °C/min do 250 °C (prodleva 5 min)
Headspace dávkovač: Dani HSS 3950
Doba temperace vzorku: 10 – 120 min (viz kap. 3.1)

Tab. 2 Vliv délky doby temperace na odezvu

Analyt	Relativní odezva (%) při době temperace				
	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min
dichlormethan	54	69	71	84	100
1,1-dichlorethan	46	58	65	87	100
1,2-dichlorethan	57	79	79	106	100
trichlormethan	58	74	73	98	100
1,1,1-trichlorethan	78	83	77	91	100
1,1,2-trichlorethan	113	87	95	102	100
1,1,2-trichlorethen	52	61	67	74	100
1,1,2,2-tetrachlorethen	83	90	96	92	100
tetrachlormethan	86	88	89	93	100
1,1,1,2-tetrachlorethan	57	76	86	80	100
1,1,2,2-tetrachlorethan	90	93	102	103	100
průměrná odezva	70	78	82	92	100

Teplota lázně: 50 – 80 °C (viz kap. 3.2)

Teplota propojení: 100 °C

Objem nástřiku: 1 ml

Objem vzorku: viz kap. 3.4

Podmínky dávkování vzorku: viz kap. 3.5

Objem vzorkovacích vialek: 20 ml

3. OPTIMALIZACE METODY

Všechny pokusy uskutečněné za účelem nalézt nejvhodnější podmínky stanovení byly prováděny na modelovém vzorku 4% ethanolu ve vodě, který obsahoval směs všech sledovaných látek o koncentraci přibližně 10 µg/l.

3.1. Vliv délky doby temperace vzorku

Vzorky byly ponechány v termostatu o teplotě 70 °C po dobu 10, 20, 30, 60 a 120 minut. Dle očekávání rostla se vzrůstající dobou temperace odezva detektoru (tab. 2).

Vzhledem k tomu, že doba jednoho chromatografického cyklu včetně zchlazení kolonového termostatu se pohybuje okolo 28 minut, je výhodné pro sériová stanovení doporučit dobu temperace 30 minut. Při této době se sice nedosáhne nejvyšší odezvy, ale hodnotu průměrné odezvy látek, která činí 82 % vzhledem k odezvě naměřené při době temperace 120 minut, je možné považovat za uspokojující při významné úspoře času.

3.2. Vliv teploty temperace

Závislost odezvy na teplotě lázně, ve které byl vzorek temperován po dobu 30 min, byla měřena při teplotách 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C a 80 °C.

Jak vyplývá z tab. 3, z počátku v souladu s očekáváním odezva stoupala s rostoucí teplotou temperace, a to až do teploty 50 °C. Při této teplotě bylo překvapivě dosaženo nejvyšší průměrné odezvy. Tuto skutečnost je možné pravděpodobně vysvětlit tím, že s dále se zvyšující teplotou vzrůstá parciální tlak vodní páry, což negativně ovlivňuje odezvu detektoru elektronového zachytu.

3.3. Vliv vysolovacího efektu

Posunutí fázové rovnováhy ve prospěch plynné fáze lze docílit přidávkou solí anorganických kyselin. Z tohoto důvodu bylo testováno vysolování vzorků chloridem amonným, síranem amonným a chloridem sodným, a to při přidávce 2,5 g, 5 g a 7,5 g soli do 10 ml modelového vzorku. Vzorky byly temperovány po dobu 30 minut při teplotě 50 °C. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.

Chlorid amonný se jeví o něco méně účinný než chlorid sodný nebo síran amonný, ale prakticky jsou účinky všech typů solí srovnatelné a zvyšují průměrnou odezvu v závislosti na přidání množství o 20 až 110 %. Odezva stoupá také s rostoucím obsahem solí ve vzorku a při použití 7,5 g síranu amonného je možné průměrnou odezvu zvýšit více než dvakrát.

Pro měření velmi nízkých koncentrací chlorovaných alifatických uhlovodíků lze doporučit vysolení vzorku pomocí 7,5 g síranu amonného. Pro běžné analýzy na základě požadavků legislativních předpisů však vzhledem k dostatečné citlivosti metody (viz kap. 6.2) není nutné vysolování používat, což přispívá k jednoduchosti přípravy vzorků.

3.4. Vliv velikosti objemu vzorku

Změna odezvy detektoru v závislosti na stoupajícím objemu vzorku (5, 10 a 15 ml) ve vialce o celkovém objemu 20 ml byla měřena po 30minutové temperaci v termostatu o teplotě 50 °C bez použití vysolování. Výsledky jsou uvedeny v tab. 5.

S rostoucím množstvím vzorku se sice zvyšuje odezva detektoru, ale již 5 ml vzorku vykazuje průměrnou relativní odezvu 65 %, což je mnohem více než jedna třetina ze 100% odezvy pro 15 ml vzorku. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že s rostoucím objemem vzorku se zmenšuje objem plynné fáze v prostoru nad vzorkem, a tak dochází k nepříznivému ovlivnění ustavení mezifázové rovnováhy kapalina-

Tab. 3 Vliv teploty temperace na odezvu

Analyt	Relativní odezva (%) při teplotě temperace					
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
dichlormethan	19	38	100	99	97	93
1,1-dichlorethan	17	47	100	108	105	101
1,2-dichlorethan	29	47	100	84	84	71
trichlormethan	39	57	100	92	88	80
1,1,1-trichlorethan	42	60	100	93	90	84
1,1,2-trichlorethan	28	82	100	109	101	81
1,1,2-trichlorethen	31	61	100	89	85	82
1,1,2,2-tetrachlorethen	36	74	100	90	103	103
tetrachlormethan	35	56	100	90	86	84
1,1,1,2-tetrachlorethan	21	52	100	90	87	85
1,1,2,2-tetrachlorethan	25	59	100	83	81	81
průměrná odezva	29	58	100	93	91	86

Tab. 4 Vliv vysolovacího efektu na odezvu

Analyt	Relativní odezva (%) podle druhu a množství přidané soli									
	bez soli	chlorid amonný			síran amonný			chlorid sodný		
		2,5 g	5,0 g	7,5 g	2,5 g	5,0 g	7,5 g	2,5 g	5,0 g	7,5 g
dichlormethan	100	84	82	89	107	120	172	92	119	127
1,1-dichlorethan	100	128	142	133	164	272	305	143	192	211
1,2-dichlorethan	100	133	131	151	198	232	311	168	190	226
trichlormethan	100	148	155	157	181	143	248	150	173	228
1,1,1-trichlorethan	100	121	133	144	130	117	187	123	132	151
1,1,2-trichlorethan	100	82	104	120	102	116	126	110	99	131
1,1,2-trichlorethen	100	123	137	144	144	124	219	140	147	180
1,1,2,2-tetrachlorethen	100	104	108	114	116	123	145	103	107	125
tetrachlormethan	100	114	123	132	119	113	156	113	120	133
1,1,1,2-tetrachlorethan	100	98	110	106	122	163	227	146	139	178
1,1,2,2-tetrachlorethan	100	179	146	173	246	240	236	276	250	265
průměrná odezva	100	119	125	133	148	160	212	142	152	178

Tab. 5 Vliv velikosti objemu vzorku na odezvu

Analyt	Relativní odezva (%) při objemu vzorku		
	5 ml	10 ml	15 ml
dichlormethan	66	80	100
1,1-dichlorethan	40	68	100
1,2-dichlorethan	77	95	100
trichlormethan	54	75	100
1,1,1-trichlorethan	55	80	100
1,1,2-trichlorethan	101	107	100
1,1,2-trichloethen	51	71	100
1,1,2,2-tetrachloethen	56	72	100
tetrachlormethan	60	82	100
1,1,1,2-tetrachloethan	83	75	100
1,1,2,2-tetrachloethan	77	78	100
průměrná odezva	65	80	100

-pára. Tento jev se zřejmě nejvíce uplatňuje u nejméně těkavých látek.

Vzhledem k tomu, že při dávkování vzorku do vialky může docházet k pěnění piva, za doporučené množství vzorku pro běžné analýzy byl zvolen objem 10 ml.

3.5. Vliv různých podmínek dávkování vzorku

Headspace dávkovač Dani umožňoval měnit tyto parametry dávkování vzorku na kolonu plynového chromatografu: dobu tlakování vialky nosným plynem (press); dobu, během které se plnila dávkovací smyčka (vent) a dobu, po kterou byl objem smyčky vyplachován na chromatografickou kolonu (valve). Tyto parametry byly měněny v rozsahu 5 až 20 sekund. Vzorky o objemu 10 ml byly měřeny po 30 minutové teplotě v termostatu o teplotě 50 °C bez použití vysolování. Výsledky měření jsou shrnuty v tab. 6.

Nejvyšší průměrné relativní odezvy bylo dosaženo při nejkratší době 5 sekund. Zvětšení časového intervalu vede k poklesu průměrných relativních odezev, který se však s dalším časovým prodloužováním již prakticky nemění. Pokles průměrných relativních odezev je pravděpodobně způsoben jednak zvýšením celkového tlaku ve vialce, který nepříznivě ovlivňuje parciální tlaky jednotlivých látek, a jednak s rostoucím přetlakováním dochází k následnému úniku plynné fáze dělicím ventilem

Tab. 6 Vliv různých podmínek dávkování vzorku dávkovačem Dani na odezvu (press – doba tlakování, vent – doba plnění smyčky, valve – doba vyplachování smyčky na kolonu)

Analyt	Relativní odezva (%) při době otevření				
	press 5 s vent 5 s valve 5 s	press 10 s vent 16 s valve 16 s	press 10 s vent 10 s valve 10 s	press 15 s vent 15 s valve 15 s	press 20 s vent 20 s valve 20 s
dichlormethan	100	70	74	63	69
1,1-dichlorethan	100	24	29	27	24
1,2-dichlorethan	100	106	104	92	94
trichlormethan	100	65	77	65	66
1,1,1-trichlorethan	100	80	89	83	84
1,1,2-trichlorethan	100	132	87	72	76
1,1,2-trichloethen	100	68	78	74	73
1,1,2,2-tetrachloethen	100	79	89	86	84
tetrachlormethan	100	85	93	86	87
1,1,1,2-tetrachloethan	100	82	71	60	70
1,1,2,2-tetrachloethan	100	71	50	60	55
průměrná odezva	100	78	76	70	71

z dávkovací smyčky ještě před vstupem na kolonu. Zastavení poklesu průměrné relativní odezvy se zvětšováním časového intervalu lze vysvětlit tím, že asi po 10 sekundách tlakování se zřejmě tlak ve vialce vyrovná tlaku pomocného plynu použitého k tlakování, a tak nedochází k dalšímu zvětšování přetlaku.

Pro parametry dávkování vzorků dávkovačem Dani byl zvolen časový interval 5 sekund.

4. ZVOLENÉ PODMÍNKY HEADSPACE TECHNIKY

Na základě výše popsaných experimentů byly pro stanovení chlorovaných alifatických uhlovodíků v pivu na headspace dávkovači Dani zvoleny tyto podmínky měření: doba teploty vzorku: 30 min
teplota lázně: 50 °C
bez vysolování
objem vzorku: 10 ml
podmínky dávkování vzorku: press 5 s, vent 5 s, valve 5 s

5. ROBUSTNOST METODY

5.1. Vliv ethanolu

Vzhledem k tomu, že obsah alkoholu v pivu se může pohybovat od 0 do 8 % obj., byl zjišťován vliv množství ethanolu na velikost odezvy ECD detektoru. Pokusy byly měřeny s různě koncentrovanými roztoky ethanolu ve vodě. Výsledky jsou uvedeny v tab. 7.

Vyplyvá z nich, že relativní směrodatná odchylka všech látek s výjimkou dichlormethanu je menší než relativní směrodatná odchylka metody naměřená na reálných vzorcích piv (viz. kap. 6.2). Průměrná relativní odezva se s různým obsahem ethanolu prakticky nemění.

Obsah ethanolu do 10 % obj. tedy neovlivňuje stanovení chlorovaných alifatických uhlovodíků v pivu.

5.2. Vliv operátora

Některé chlorované alifatické uhlovodíky – např. dichlormethan, 1,1-dichlorethan, chloroform – se vyznačují velkou těkavostí [11], což klade zvýšené nároky na jejich správné stanovení. Vzhledem k tomu, že vlastní headspace technika je automatizována a přesnost je dána použitou instrumentací, kritickými kroky, které může ovlivnit operátor, jsou příprava standardu a manipulace se vzorkem před umístěním do headspace dávkovače. Pro ověření vlivu lidského faktoru byla testována závislost odezvy detektoru na přípravě kalibračního standardu osmi různými operátory. Všichni účastníci testu měli zkušenosti s laboratorní činností,

Tab. 7 Vliv ethanolu na odezvu detektoru (RSD – relativní směrodatná odchylka)

Analyt	Relativní odezva (%) při obsahu ethanolu					RSD %
	0 % obj.	2 % obj.	4 % obj.	6 % obj.	10 % obj.	
dichlormethan	100	94	100	114	126	12
1,1-dichlorethan	100	106	99	101	91	5,3
1,2-dichlorethan	100	100	102	101	95	2,9
trichlormethan	100	97	97	100	94	2,7
1,1,1-trichlorethan	100	99	100	101	94	2,6
1,1,2-trichlorethan	100	107	114	103	108	5,9
1,1,2-trichloethen	100	100	102	101	94	3,4
1,1,2,2-tetrachloethen	100	104	105	105	96	3,8
tetrachlormethan	100	98	95	100	87	5,7
1,1,1,2-tetrachloethan	100	116	111	136	107	6,4
1,1,2,2-tetrachloethan	100	89	82	104	107	9,6
průměrná odezva	100	101	101	106	100	

z toho pět z nich tuto nebo obdobnou činnost provádělo rutinně. Výsledky jsou shrnuty v tab. 8.

Pro skupinu všech osmi operátorů dosahuje průměr relativní směrodatné odchylky vysoké hodnoty 37 %, přičemž pro tři látky přesahuje relativní směrodatná odchylka hodnotu 40 % a pro jednu látku dokonce 50 %. Podstatně příznivějších výsledků bylo dosaženo u těch pracovníků, kteří tuto nebo podobnou činnost provádějí rutinně. U této skupiny je relativní směrodatná odchylka pouze u dvou látek větší než 20 %, ale vždy menší než 30 %, průměr této veličiny činí 17 %. K dosažení co nejlepších výsledků je tedy nutné, aby přípravu standardů a vzorků prováděli pouze zaškolení a zkušení operátoři.

6. VALIDACE METODY

6.1. Kalibrační křivky

Pro všechny sledované látky byla proměřena 11 bodová kalibrační křivka v přibližném rozsahu koncentrací 0,1 až 150 µg/l pro každou sloučeninu. Vzhledem k omezené linearitě detektoru ECD byl celý koncentrační rozsah rozdělen na oblast nízkých (0,1–2,5 µg/l) a vysokých (2,5–150 µg/l) koncentrací. Typ regrese a korelační koeficienty jsou uvedeny v tab. 9.

Kromě trichlormethanu v oblasti nízkých koncentrací a tetrachlormethanu v oblasti vysokých koncentrací jsou hodnoty korelačních

Tab. 8 Relativní směrodatná odchylka (RSD) odezvy detektoru ECD při přípravě kalibračního standardu o koncentraci okolo 10 µg/l každé látky dvěma skupinami operátorů

Analyt	Všichni operátoři RSD (%)		Rutinní operátoři RSD (%)	
dichlormethan	37		16	
1,1-dichlorethan	45		24	
1,2-dichlorethan	27		15	
trichlormethan	42		15	
1,1,1-trichlorethan	32		15	
1,1,2-trichlorethan	42		18	
1,1,2-trichloethen	35		15	
1,1,2,2-tetrachloethen	29		15	
tetrachlormethan	28		12	
1,1,1,2-tetrachloethan	32		11	
1,1,2,2-tetrachloethan	58		27	
průměr RSD	37		17	

Tab. 9 Typ regrese a korelační koeficienty pro kalibraci chlorovaných alifatických uhlovodíků

Analyt	Oblast nízkých koncentrací (0,1–2,5 µg/l)		Oblast vysokých koncentrací (2,5–120 µg/l)	
	typ regrese	korelační koeficient	typ regrese	korelační koeficient
dichlormethan	polynom 2.ř.	0,998	polynom 2.ř.	0,997
1,1-dichlorethan	polynom 2.ř.	0,998	polynom 2.ř.	0,999
1,2-dichlorethan	polynom 2.ř.	0,998	polynom 2.ř.	0,999
trichlormethan	polynom 2.ř.	0,987	polynom 2.ř.	0,999
1,1,1-trichlorethan	lineární	0,999	polynom 2.ř.	0,995
1,1,2-trichlorethan	polynom 2.ř.	0,997	polynom 2.ř.	0,999
1,1,2-trichlorethen	polynom 2.ř.	0,993	polynom 2.ř.	0,993
1,1,2,2-tetrachlorethen	polynom 2.ř.	0,998	polynom 2.ř.	0,998
tetrachlormethan	polynom 2.ř.	0,999	polynom 2.ř.	0,985
1,1,1,2-tetrachlorethan	polynom 2.ř.	0,993	polynom 2.ř.	0,993
1,1,2,2-tetrachlorethan	polynom 2.ř.	0,994	polynom 2.ř.	0,999

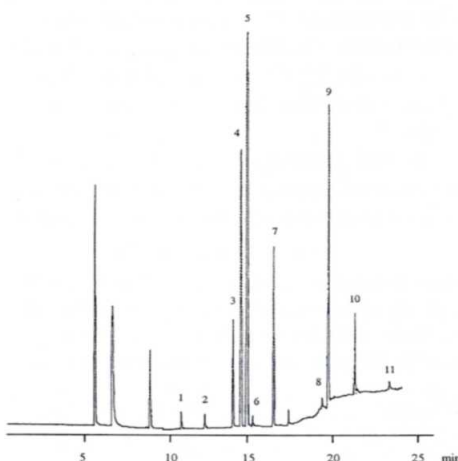
koeficientů větší než 0,990, což umožňuje sledované látky měřit v širokém rozsahu koncentrací.

6.2. Parametry metody

Charakteristika zvolené headspace metody (viz kap. 4) je shrnuta v tab. 10.

Výtěžnost a relativní směrodatná odchylka stanovení byly určeny z deseti přesných přídavek ethanolového roztoku standardů do reálného vzorku piva na dvou koncentračních hladinách – přibližně 1 µg/l a 10 µg/l pro každý analyt. Pro zjištění maticího vlivu bylo provedeno deset měření jednak na jednom vzorku výčepního světlého piva a jednak na deseti vzorcích různých piv (3 světlá výčepní piva, 1 tmavé výčepní pivo, 4 světlé ležáky, 1 ovocné pivo, 1 speciální 16 % světlé pivo). Výsledky po odečtení slepého pokusu pro každé pivo jsou uvedeny v tab. 10.

Na koncentrační hladině okolo 1 µg/l vykazuje výtěžnost pro všechny látky v průměru hodnotu 97 % pro jeden vzorek a 102 % pro



Obr. 1 Chromatogram reálného vzorku světlého výčepního piva obohaceného chlorovanými alifatickými uhlovodíky o koncentraci přibližně 10 µg/l každého analytu získaný na koloně DB 624 o délce 60 m, průměru 0,32 mm, tloušťce filmu 1,8 µm a s detektorem ECD: 1 – dichlormethan; 2 – 1,1-dichlorethan; 3 – chlormethan; 4 – 1,1,1-trichlorethan; 5 – tetrachlormethan; 6 – 1,2-dichlorethan; 7 – 1,1,2-trichlorethen; 8 – 1,1,2-trichlorethan; 9 – tetrachlorethen; 10 – 1,1,1,2-tetrachlorethan; 11 – 1,1,2,2-tetrachlorethan

Tab. 10 Charakteristiky metody pro stanovení chlorovaných alifatických uhlovodíků v pivu získané z měření jednoho piva a z deseti různých piv

Analyt	Hladina 1 µg/l				Hladina 10 µg/l				Mez detekce (µg/l)	Mez stanovení (µg/l)
	výtěžnost* (%)	výtěžnost** (%)	RSD* (%)	RSD** (%)	výtěžnost* (%)	výtěžnost** (%)	RSD* (%)	RSD** (%)		
dichlormethan	129	120	13	11	83	86	9,5	11	1,4	1,6
1,1-dichlorethan	101	125	27	15	98	83	7,1	8,3	0,3	0,6
1,2-dichlorethan	96	154	5,5	11	101	78	3,7	5,9	0,1	0,3
trichlormethan	83	97	5,4	10	72	63	5,5	9,9	0,3	0,5
1,1,1-trichlorethan	112	86	8,3	11	99	78	3,9	6,0	0,1	0,3
1,1,2-trichlorethan	59	74	20	35	42	56	12	19	0,8	1,3
1,1,2-trichlorethen	80	64	15	9,8	89	64	9,1	9,7	0,2	0,5
1,1,2,2-tetrachlorethen	145	139	18	29	98	86	2,4	14	0,4	0,9
tetrachlormethan	87	113	27	22	69	68	9,9	8,4	0,4	0,9
1,1,1,2-tetrachlorethan	82	92	26	34	88	67	13	18	0,2	0,5
1,1,2,2-tetrachlorethan	97	63	22	23	84	59	17	25	1,7	2,8

*) jeden stejný vzorek světlého výčepního piva; **) deset vzorků různých piv

deset různých vzorků. Při koncentraci přibližně 10 µg/l se výtěžnost pohybuje v průměru okolo hodnoty 84 % pro jeden druh vzorku a 72 % pro deset různých vzorků. Se vzrůstajícím obsahem látek ve vzorku dochází k poklesu výtěžnosti, ale přesto je možné dosažené hodnoty považovat za dostačující.

V souladu s očekáváním relativní směrodatná odchylka nabývá vyšších hodnot na koncentrační hladině okolo 1 µg/l, protože tato koncentrace se pohybuje u meze stanovení analytů (viz tab. 10). Důležitým poznatkem je skutečnost, že vliv matrice nezvyšuje výrazným způsobem hodnotu relativní směrodatné odchylky. Výsledky vykazují téměř pro všechny měřené látky hodnoty směrodatné odchylky menší než 30 %. Průměrná hodnota pro hladinu 1 µg/l činí 17 % pro jeden vzorek a 19 % pro deset různých vzorků. Pro hladinu 10 µg/l jsou tyto průměry 8,5 % a 12 %. Vzhledem k tomu, že jde o stopovou analýzu, získané hodnoty relativní směrodatné odchylky představují uspokojivý výsledek.

Meze detekce (LD) a meze stanovení (LS) byly určeny z měření deseti různých piv o minimálním obsahu sledovaných látek, a to podle vztahů

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

$$LS = 10 \times s,$$

kde c je průměrná koncentrace látky, s je směrodatná odchylka [12,13].

Meze detekce a stanovení se pohybují v desetinách mikrogramů na litr piva s výjimkou dichlormethanu, 1,1,2-trichlorethanu a 1,1,2,2-tetrachlorethanu, kde představují jednotky mikrogramů. Pro požadavky legislativních předpisů jsou tyto výsledky zcela dostatečné.

Chromatografický záznam světlého výčepního piva obohaceného chlorovanými alifatickými uhlovodíky o koncentraci přibližně 10 µg/l je uveden na obr. 1. Je z něj patrná dobrá separace všech analytů nerušená interferujícími látkami.

7. ZÁVĚR

Na základě provedených experimentů byly navrženy tyto parametry headspace techniky: doba temperace vzorku, teplota lázně, způsob vysolování, objem vzorku a způsob dávkování. Při dodržení zvolených hodnot těchto parametrů je možné stanovit všechny sledované látky v množstvích okolo desetin respektive

jednotek µg/l piva při průměrné hodnotě relativní směrodatné odchylky menší než 30 %, což umožňuje s rezervou vyhovět legislativním předpisům.

Cenným poznatkem je skutečnost, že přesnost výsledků není ovlivněna různým obsahem alkoholu v pivu. Vzorky různých piv s rozdílným množstvím alkoholu je možné vyhodnocovat na jeden společný kalibrační standard. Na druhé straně výsledky mohou být značně ovlivněny způsobem manipulace se vzorkem a přípravou standardů, proto by tyto úkony měli provádět jen zaškolení a zruční operátoři.

Vzhledem k rychlé a jednoduché přípravě vzorku k měření lze uvedenou headspace metodu ve spojení s plynovou chromatografií doporučit pro potřeby běžné kontroly v pivovarnictví.

LITERATURA

- [1] KELLNER, V.: Kvasny Prum. 40, 1994, s. 42
- [2] BASAŘOVÁ, G., HLAVÁČEK, I.: České pivo, Nuga, Pacov, 1998, s. 124
- [3] ČULÍK, J., et al.: Kvasny Prum. 41, 1995, s. 105.
- [4] Metodická příručka pro stanovení ukazatelů znečištění vod, Ministerstvo životního prostředí, Praha, 1993, s. 75
- [5] REUNANEN, M., KRONELD, R.: J. Chromatogr. Sci. 20, 1982, s. 449
- [6] KELLNER, V. et al.: Výzkum cizorodých látek, (Průběžná zpráva výzkumného úkolu 07). VÚPS, Praha 1992
- [7] Methods for Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater – Purgeable Halocarbons, Code of Federal Regulations EPA, EPA method 601 Revision 0, 1991
- [8] German standard methods for determination of water, waste water and sludge. Determination of easily volatile halogenated hydrocarbons by headspace chromatography, DIN 38407-5, 1991
- [9] Water quality – Determination of highly volatile halogenated hydrocarbons by – Gas chromatography methods, DIN EN 30301, 1994
- [10] DIETZ, E., SINGLEY, K.F.: Anal. Chem. 51, 1979, s. 1809
- [11] The Merck Index, Ninth Edition, Merck & Co., Inc., 1976, s. 272, 501, 791
- [12] LUŇÁK, J., BAUDYŠ, P.: Statistické výpočty v analytické laboratoři, ČZPI, Hradec Králové, 1995, s. 3,4
- [13] ANDĚL, J.: Matematická statistika, SNTL, Praha, 1985, s. 326

Lektoroval doc. Ing. Jaroslav Čepička, CSc.
Do redakce došlo 1. 7. 1999