

## HPLC – NOVÁ CESTA PRO STANOVENÍ KARBONYLŮ V PIVU

### HPLC – NEW WAY OF DETERMINING CARBONYLS IN BEER

MARCEL KARABÍN, PAVEL DOSTÁLEK, JANA ŠINDELÁŘOVÁ

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, FPBT VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice

**Karabín, M. – Dostálek, P. – Šindelářová, J.: HPLC – nová cesta pro stanovení karbonylů v pivu.** Kvasny Prum. 53, 2007, č. 2, s. 35–37.

Karbonylové sloučeniny, a to zejména aldehydy, i ve velmi nízkých koncentracích významně ovlivňují chuť piva, protože u většiny z nich je nízká i prahová koncentrace vnímání. Proto patří v pivovarství mezi nejintenzivněji sledované látky.

Autoři příspěvku se při stanovení karbonylových sloučenin zaměřili na využití kapalinové chromatografie, a to zejména v kombinaci s extrakcí na pevné fázi (SPE) za současné derivatizace 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH). Analyzované látky byly ze vzorku vytěšňovány dusíkem a zachycovány na SPE kolonce, ze které byly eluovány acetonitrem a analyzovány pomocí HPLC s PAD detektorem. Stanovovány byly následující sloučeniny: acetaldehyd, diacetyl, furfural, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylpropanal, pentanal, hexanal a (E)-2-nonenal. Byla změřena spektra jednotlivých hydrazonů, a stanoveny obsahy karbonylových sloučenin ve vybraných běžně komerčně dostupných pivech. Byly zjištěny obsahy jednotlivých látek, které jsou v souladu s dříve publikovanými koncentracemi, stanovenými pomocí jiných analytických metod.

**Karabín, M. – Dostálek, P. – Šindelářová, J.: HPLC – New way of determining carbonyls in beer.** Kvasny Prum. 53, 2007, č. 2, s. 35–37.

Carbonyl compounds, especially aldehydes, notably affect the taste of beer. Although the concentration of these substances in beer is very low, for most of these, the threshold concentration of the taste reception is also very low. That's why in brewing they belong amongst the most intensively monitored substances.

The authors of this report focused on possibilities of using liquid chromatography particularly in a combination with Solid Phase Extraction with current derivation 2,4 – dinitrophenylhydrazine (DNPH). Analytes were displaced from the sample by nitrogen and captured on a SPE column, from which they were eluted by acetonitrile and analyzed using HPLC with a PAD detector. The following were being determined: acetaldehyde, diacetyl, furfural, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylpropanal, pentanal, hexanal and (E)-2-nonenal. The spectra of the individual hydrazones were measured, and the content of carbonyl compounds was determined in ordinarily commercially available selected beers. The contents of individual substances were found and they are consistent with previously published concentrations determined using other analytical methods.

**Karabín, M. – Dostálek, P. – Šindelářová, J.: HPLC – Der neue Weg zur Bestimmung von Karbonylverbindungen im Bier.** Kvasny Prum. 53, 2007, Nr. 2, S. 35–37.

Die Karbonylverbindungen, und zwar insbesondere Aldehyds, auch in einer sehr niedrigen Konzentration, bedeutend beeinflussen den Geschmack des Bieres, weil der Geschmacksschwellenwert von diesen Verbindungen häufig sehr niedrig liegt. Aus diesem Grund gehören diese Verbindungen zu den Stoffen, die in den Brauereien sehr intensiv verfolgt werden.

Die Verfasser dieses Artikels für die Bestimmung von Karbonylverbindungen richteten ihre Aufmerksamkeit auf die Ausnützung der Flüssigkeitschromatographie (HPLC) insbesondere in einer Kombination mit einer Extraktion auf der festen Phase (SPE) unter gleichzeitigen Derivatisation mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Die analysierte Stoffe werden mittels Stickstoff aus der Probe verdrängt und auf einer SPE Kolonne aufgefangt. Aus dieser Kolonne werden diese Stoffe mittels Azetonitril eluiert und durch eine HPLC mit PAD Detektor analysiert. ES wurden folgende Verbindungen festgestellt: Azetaldehyd, Diazetyl, Furfural, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, 2-Methylpropanal, Pentanal, Hexanal und (E)-2-Nonenal. Es wurde auch Spektrum der einzelnen Hydrazone und Karbonylverbindungsgehalt im in den aus dem Geschäft gekauften üblichen Bier festgestellt. Die erworbene Ergebnisse waren im Einklang mit den in der Fachliteratur angegebenen Werten, die durch andere analytische Verfahren analysiert wurden.

**Карабин, М. – Досталек, П. – Шинделаржова, Я.: HPLC – новая путь определения карбониллов в пиве.** Kvasny Prum. 53, 2007, No. 2, стр. 35–37.

Карбонильные соединения, особенно альдегиды, значительно повлияют на вкус пива и в очень низких концентрациях. Поэтому они относятся к интенсивно наблюдаемым веществам в пивоварении.

Авторы при определении карбонильных соединений нацелились к использованию HPLC, особенно в комбинации с экстрагированием на твердой фазе (SPE) одновременно с дериватизацией с помощью 2,4-динитрофенилгидразином (DNPH). Анализируемые вещества были из прод вытеснены азотом и захватываны на SPE колонку, из которой были элюированы ацетонитром и анализированы HPLC с PAD детектором. Определены были ацетальдегид, диацетил, фурфурол, 2-метилбутаналь, 3-метилбутаналь, 2-метилпропаналь, пентаналь, гексаналь и (E)-2-ноненаль. Были измерены спектра отдельных гидразонов и определены содержания карбонильных соединений в некоторых обыкновенно доступных пивах. Были определены содержания отдельных веществ, которые увязываются с содержаниями определенными с помощью других аналитических методов.

**Klíčová slova:** karbonyly, pivo, chuť, HPLC, extrakce na pevné fázi

**Keywords:** carbonyls, beer, taste, HPLC, solid phase extraction

#### 1 ÚVOD

Karbonylové sloučeniny, zejména aldehydy, významně ovlivňují chuť piva. Tyto sloučeniny v pivu vznikají během výroby piva řadou cest: Streckerovou degradací aminokyselin, oxidací isohumulonů, oxidací vyšších alkoholů, oxidační degradací lipidů, aldolovou kondenzací aldehydů a sekundární oxidací nenasycených vyšších aldehydů. I když koncentrace těchto látek v pivu je velmi nízká, je

u většiny z nich nízká i prahová koncentrace vnímání, a vzhledem k cizím chutím a vůním, které způsobují, patří v pivovarství mezi nejintenzivněji sledované látky.

Běžně se karbonylové sloučeniny měří kombinací mikroextrakce na pevné fázi (SPME) a GC-MS. Autoři příspěvku se však zaměřili na možnosti využití kapalinové chromatografie zejména v kombinaci s extrakcí na pevné fázi (SPE) za současné derivatizace 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH), která vy-

užívá skutečnosti, že karbonylové sloučeniny selektivně reagují s DNPH za vzniku 2,4-dinitrofenylhydrazonů příslušného karbonylu.

Byly vyzkoušeny dvě metody izolace karbonylových sloučenin ze vzorků: metoda využívající stripování dusíkem a následnou izolaci se současnou derivatizací na SPE kolonce, a destilační metoda využívající derivatizaci v roztoku. Stanovovány byly následující sloučeniny: acetaldehyd, diacetyl, furfural, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylpropan-

nal, pentanal, hexanal a *trans*-2-nonenal. Byla změřena spektra jednotlivých hydrazonů a stanoveny obsahy karbonylových sloučenin ve vybraných běžně komerčně dostupných piv. Byly zjištěny obsahy jednotlivých látek, které jsou v souladu s dříve publikovanými koncentracemi, stanovenými pomocí jiných analytických metod.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Účelem práce bylo vyvinout metodu umožňující izolaci, zakonzentrování a stanovení karbonylových sloučenin ve vzorcích piv. Principem derivatizačního kroku je reakce uvedená na obr. 1.

### 2.1 Izolace na SPE kolonce

Metoda s využitím SPE kolonek a derivatizací 2,4-dinitrofenylhydrazinem byla zatím použita pouze pro stanovení karbonylových sloučenin ve vzduchu nebo jiných plynných směsích. SPE kolonka se skládá z inertního nosiče silikagelu, který je potažen vrstvou derivatizačního činidla 2,4-dinitrofenylhydrazinu. Pro průběh derivatizace je dále nezbytné kyselé prostředí kyseliny fosforečné, která snižuje pH na kolonce až na hodnotu 1. Karbonylové sloučeniny byly vytěšňovány z 250 ml piva dusíkem po dobu 3 hodin, přičemž plyn následně procházel kolonkou, na níž se karbonyly derivatizovaly a po proběhnutí stripovacího kroku byly eluovány 30 ml acetonitrilu. Získaný roztok byl analyzován pomocí HPLC.

### 2.2 Izolace destilací s vodní párou

Vodní párou bylo přeháněno 500 ml vzorku. Odebíráno bylo 60 ml destilátu, ke kterému bylo přidáno 0,25 g 2,4-dinitrofenylhydrazinu a 1 ml kyseliny fosforečné pro úpravu pH. Derivatizace probíhala po dobu 30 minut, pak byl destilát přefiltrován. Sraženina byla rozpuštěna v acetonitrilu a analyzována HPLC.

### 2.3 Chromatografický systém

Chromatograf: WATERS Alliance  
Detektor: PAD detektor WATERS 2226  
Kolona: WATERS Novapak C18  
150x3,9 mm  
Mobilní fáze: gradient voda:ACN (5–84% ACN)  
Teplota: 35 °C  
Délka analýzy: 65 min

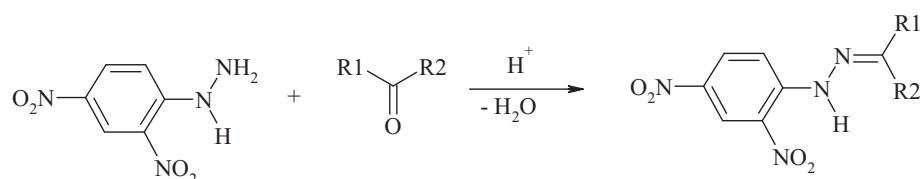
## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Při vývoji metody byla optimalizována řada parametrů (doba destilace, pH a doba derivatizace) za účelem maximalizace výtěžků hydrazonů. Bohužel bylo zjištěno, že metoda izolace pomocí SPE je pro naše vzorky nevhodná, takže jsme se soustředili pouze na metodu založenou na destilaci s vodní párou a derivatizaci v roztoku. Standardní roztoky stanovených karbonylů byly připravovány pipetováním 10 µl každé čisté standardní látky do příslušného množství 0,2% roztoku derivatizačního činidla DNPH v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1 mol/l. Vzniklá sraženina byla z roztoku odfiltrována, promyta vodou a rozpuštěna ve 100 ml acetonitrilu.

### 3.1 Doba destilace

Pro přípravu roztoků na zjištění výtěžnosti za různých podmínek bylo připraveno 500 ml

Obr. 1 Schéma reakce karbonylové sloučeniny s 2,4-dinitrofenylhydrazinem

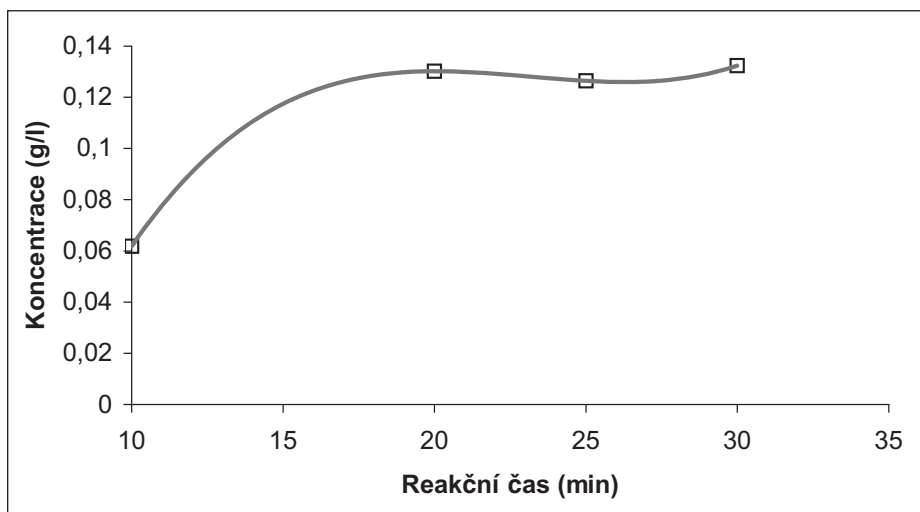


Tab. 1 Obsah karbonylových sloučenin získaných různě dlouhými destilacemi

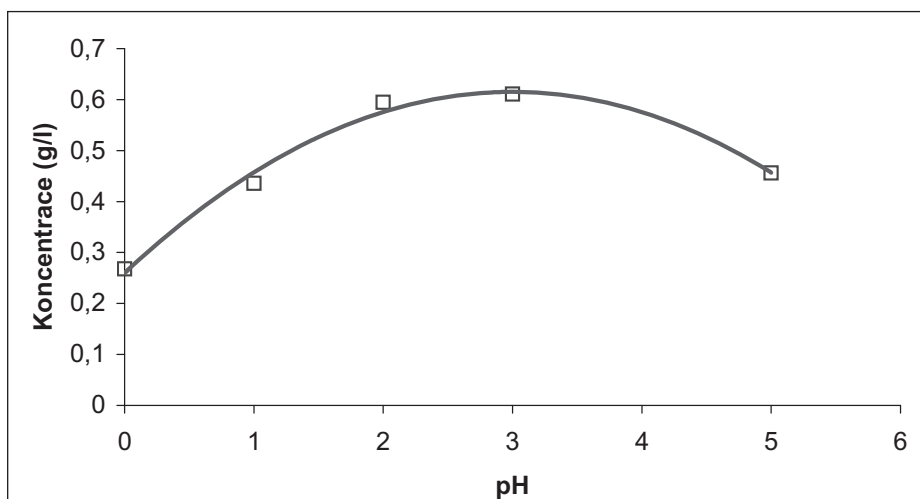
	Nalezená koncentrace (g/l) podle objemu destilátu			
	15 ml	30 ml	60 ml	90 ml
<i>2-methylpropanal</i>	1,02.10 <sup>-4</sup>	2,88.10 <sup>-4</sup>	5,05.10 <sup>-4</sup>	4,77.10 <sup>-4</sup>
<i>trans</i> -2-nonenal	2,08.10 <sup>-4</sup>	2,10.10 <sup>-3</sup>	4,62.10 <sup>-3</sup>	4,19.10 <sup>-4</sup>
hexanal	1,37.10 <sup>-4</sup>	1,37.10 <sup>-3</sup>	3,18.10 <sup>-3</sup>	9,14.10 <sup>-4</sup>
acetaldehyd	8,12.10 <sup>-4</sup>	9,78.10 <sup>-3</sup>	1,02.10 <sup>-2</sup>	7,35.10 <sup>-3</sup>
diacetyl	1,44.10 <sup>-4</sup>	4,42.10 <sup>-4</sup>	3,1.10 <sup>-4</sup>	6,3.10 <sup>-4</sup>
2-furaldehyd	5,44.10 <sup>-5</sup>	3,68.10 <sup>-4</sup>	1,43.10 <sup>-3</sup>	9,19.10 <sup>-4</sup>

5% roztoku ethanolu a do něj bylo napipetováno 10 µl každého standardu. Tento roztok byl pak přeháněn s vodní párou. Byla zjišťována výtěžnost pro tyto objemy odebraného destilátu: 15 ml, 30 ml, 60 ml, 90 ml. K odebranému destilátu bylo přidáno potřebné množství DNPH a kyselinou fosforečnou

upraveno pH na 3. Směs se nechala reagovat po dobu 30 minut za neustálého míchání. Dále byl odfiltrovaný pevný podíl rozpuštěn v 40 ml acetonitrilu a analyzován. Z výsledků v tab. 1 je jasné patrné, že pro dostatečnou izolaci postačuje doba destilace odpovídající odběru 60 ml destilátu.



Obr. 2 Závislost výtěžku *trans*-2-nonenalu na době derivatizace



Obr. 3 Závislost výtěžku derivatizace na pH roztoku

### 3.2 Délka derivatizace

Nezbytná doba derivatizačního kroku byla stanovena pomocí standardních roztoků jednotlivých aldehydů, přičemž byly analyzovány vzorky po proběhlých 10, 20, 25 a 30 minutách derivatizace. Bylo zjištěno, že zatímco některé aldehydy (např. 2-methylbutanal) reagují prakticky okamžitě a se 100% výtěžkem, jiné (*trans*-2-nonenal) potřebují pro úplné zreagování i několik desítek minut. Na obr. 2 je patrná výrazná časová závislost výtěžku *trans*-2-nonenalu.

### 3.3 Závislost výtěžku na pH derivatizační reakce

Protože reakce karbonylových sloučenin s DNPH je silně závislá na pH prostředí, bylo třeba zjistit nejvhodnější pH pro maximalizaci výtěžku. Roztoky standardů byly upraveny kyselinou fosforečnou na pH 1, 2, 3 a 5 a podrobeny reakci s DNPH. Bylo zjištěno (obr. 3), že optimální pH leží v rozmezí 2,5-3,5. V tomto rozmezí pak byly prováděny všechny analýzy reálných vzorků.

### 3.4 Stabilita získaných hydrazonů

Získané hydrazony byly skladovány po dobu 4 dní v lednici respektive při pokojové teplotě. Z hodnot uvedených na obr. 4 a 5 je patrné, že hydrazony jsou za těchto podmínek zcela stálé.

### 3.5 Stanovení obsahu karbonylů ve vzorcích pív

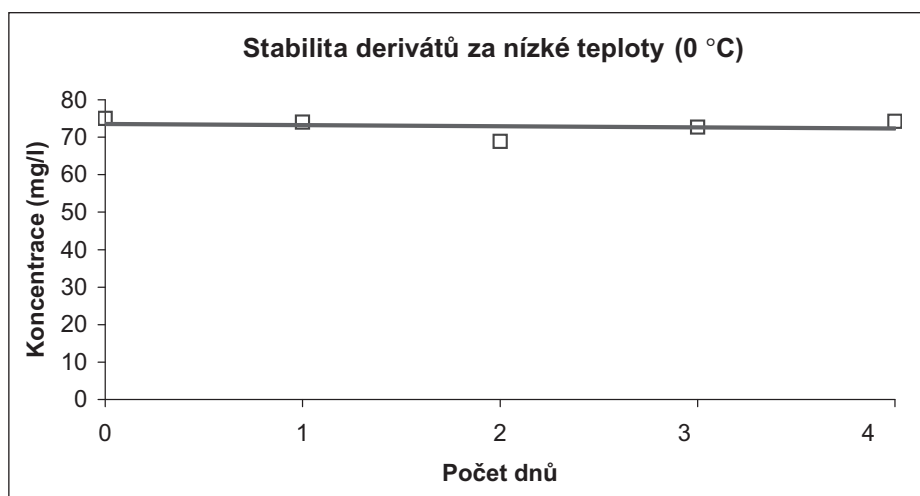
Byly analyzovány vzorky běžně komerčně dostupných výčepních pív. Karbonyly byly z pív izolovány destilací podle metody uvedené výše. Výsledky jsou shrnuty v tab. 2 a je z nich patrné, že obsahy karbonylů jsou u jednotlivých pív v některých případech odlišné, což je vzhledem k rozmanitosti použitých výrobních technologií pochopitelné. Důležitým závěrem pak je, že se hodnoty obsahů rámcově shodují s obsahy změřenými pomocí jiných metod.

## 4 ZÁVĚR

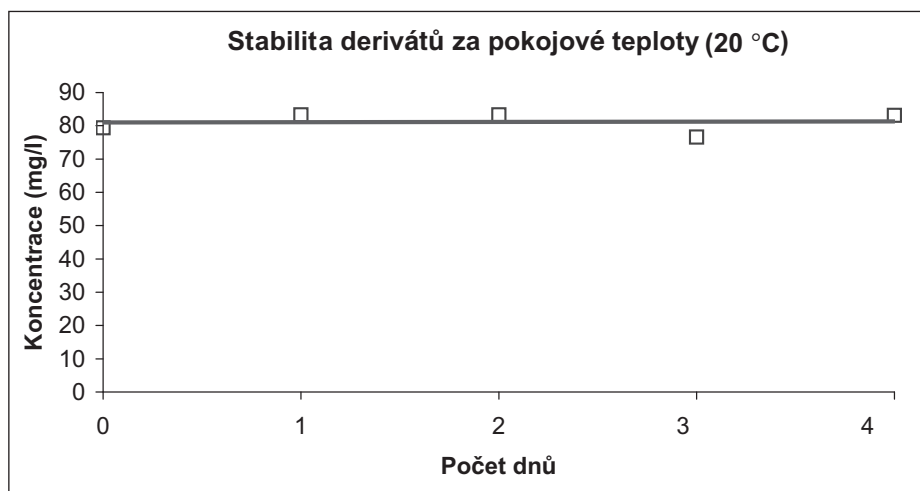
2,4-dinitrofenylhydrazony jsou vhodné pro stanovení karbonylových sloučenin díky své vysoké reakční specifitě a poměrně vysoké reakční rychlosti. Molekuly 2,4-dinitrofenylhydrazonů mají charakteristická absorpční spektra v ultrafialové oblasti a lze je podle nich snadno identifikovat. Další výhodou těchto derivátů je jejich stabilita v roztoku minimálně po dobu pěti dnů i při pokojové teplotě. Nevýhodou kapalinové chromatografie pro stanovení 2,4-dinitrofenylhydrazonů je vysoká mez detekce, která neumožňuje spolehlivé stanovení *trans*-2-nonenalu za daných podmínek separace a detekce. Dále byly zjištěny optimální parametry pro průběh derivatizační reakce: nejvyššího výtěžku bylo dosaženo při pH okolo 3, přičemž derivatizace musí trvat minimálně 30 minut. Byly stanoveny obsahy karbonylů ve vzorcích komerčních pív. Jed-

Tab. 2 Obsah karbonylových sloučenin ve vzorcích výčepních pív

Stanovovaná látka	Světlá výčepní piva			
	Číslo vzorku / nalezená koncentrace (mg/l)			
	1	2	3	4
acetaldehyd	3,582	2,416	0,739	1,966
diacetyl	0,116	0,103	0,116	0,145
2-furaldehyd	0,026	0,183	0,186	0,307
2-methylpropanal	0,029	0,018	0,565	0,561
pentanal	$3,847 \cdot 10^{-3}$	$3,831 \cdot 10^{-3}$	$3,691 \cdot 10^{-3}$	$4,645 \cdot 10^{-3}$
3-methylbutanal	$3,871 \cdot 10^{-3}$	$3,854 \cdot 10^{-3}$	$3,713 \cdot 10^{-3}$	$4,674 \cdot 10^{-3}$
hexanal	$7,43 \cdot 10^{-4}$	$8,11 \cdot 10^{-4}$	$1,63 \cdot 10^{-4}$	$9,05 \cdot 10^{-5}$
<i>trans</i> -2-nonenal	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
2-methylbutanal	$9,624 \cdot 10^{-3}$	$7,857 \cdot 10^{-3}$	$9,514 \cdot 10^{-3}$	0,014



Obr. 4 Stabilita derivátů za nízké teploty



Obr. 5 Stabilita derivátů za pokojové teploty

notlivá piva se z hlediska obsahu karbonylových sloučenin liší na základě způsobu výroby a následné stabilizace, nicméně hodnoty jsou srovnatelné s hodnotami zjištěnými pomocí GC-MS.

Zpracováno podle posteru na 33. Pivovarsko-sladařském semináři, Plzeň 18.–19. 10. 2006  
Do redakce došlo 13. 11. 2006