

4

duben 1995
ročník 41



ODBORNÝ ČASOPIS PRO VÝROBU NÁPOJŮ A BIOCHEMICKÉ TECHNOLOGIE
Vydává VÝZKUMNÝ ÚSTAV PIVOVARSKÝ A SLADAŘSKÝ, Praha, ve spolupráci s BMC, a. s.

Z výzkumu a praxe

STANOVENÍ NIŽŠÍCH ALIFATICKÝCH HALOGENUHLOVODÍKŮ V PIVU POMOCÍ STATICKE A DYNAMICKE HEADSPACE ANALÝZY

Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc., Mgr. FRANTIŠEK FRANTÍK,
RNDr. MARIE JURKOVÁ, CSc., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Klíčová slova: pivo, alifatické uhlovodíky, vznik, metody stanovení, headspace analýza

ÚVOD

Při výrobě nápojů hraje mikrobiologická a chemická čistota použité vody jednu z rozhodujících rolí. Získat kvalitní varní vodu pro pivovar je základním předpokladem budoucí úspěšné výroby. S rostoucím zatížením životního prostředí se tato otázka stává čím dál tím obtížněji řešitelnou. Mnohé zásahy mající za cíl dosažení mikrobiologické čistoty varní vody mohou ve svých důsledcích způsobit zhoršení její čistoty chemické. Typickou ukázkou je nebezpečí vzniku halogenuhlovodíků ve varní vodě při její úpravě.

Je mylnou představou, že se halogenuhlovodíky mohou dostat do varní vody výhradně v důsledku kontaminace spodních, případně povrchových vod v přírodě, i když jde o velmi rozšířený jev. Neméně nebezpečná je i možnost kontaminace vody halogenuhlovodíky v procesu chemické úpravy v pivovaru [1].

Způsoby, kterými dochází ke kontaminaci pitné vody při jejím chemickém zpracování, se podstatně liší. Při regeneraci iontoměničů je hlavním zdrojem halogenuhlovodíků kontaminace použité kyseliny chlorovodíkové témito látkami. Naproti tomu při chloraci vody plynným chlorem dochází k reakci aktivního chloru s organickými látkami přítomnými ve vodě. Takovými látkami jsou například methylketony, sekundární alkoholy, případně látky obsahující acetylouvu skupinu. Vý-

sledkem poměrně složitých reakcí je vznik karboxylové kyseliny a příslušného halogenuhlovodíku [2, 3]. Naopak podstatného snížení rizika vzniku halogenuhlovodíků ve varní vodě bylo docíleno při použití progresivní metody pracující s oxidem chloričitým. Tato sloučenina se na rozdíl od chlorařu neúčastní elektrofilní substituce, ale výhradně reakcí oxidačních [4]. V případě přítomnosti bromidového, resp. jodidového iontu mohou vedle trichlormethanu (chloroformu) vznikat i bromoform, dibromchlormethan, bromdichlormethan aj. Tyto látky jsou obecně nazývány trihalomethany (haloformy) a kromě běžných halogenuhlovodíků, se kterými se setkáváme v pitné vodě, tj. dichlormethanem, tetrachlormethanem, 1,1,2-trichlorothenem a 1,1,2,2-tetrachlorethenem, tvoří hlavní podíl přítomných halogenuhlovodíků. S ohledem na specifičnost vzniku je zpravidla skupina trihalomethanů vyhodnocována odděleně od ostatních zástupců skupiny halogenuhlovodíků [4]. Při ozonizaci se tvoří halogenuhlovodíky v důsledku oxidačního štěpení sloučenin, způsobeného přítomností vysoko reaktivních molekul ozonu.

ROZBOR PROBLEMATIKY STANOVENÍ HALOGENUHLOVODÍKŮ V KAPALNÝCH VZORCÍCH

Vzhledem k chemickým a fyzikálním vlastnostem nižších těkavých halogenuhlovodíků a poměr-

ně rozsáhlé kontaminaci životního prostředí těmito látkami je stanovení stopových koncentrací těchto látek v matrici poměrně komplikované. Klasickým způsobem je extrakce halogenuhlovodíků do organické fáze, nejčastěji n-pentanu [6]. V případě pitné vody lze považovat tento postup za vyhovující. U složitějších matric je nutné zařadit dodatečné přečištění extraktu např. na kolonce sorbentu. Vysoké nároky jsou zde především kladený na čistotu použitého extrakčního činidla. Vývoj kapilárních kolon s vázanou fází a nových injekčních systémů plynových chromatografů s sebou přinesl možnost přímého nástřiku vzorku na kolonu. Podmínkou je zde vzhledem k nízkému obsahu stanovených látek v nastrikovaném množství (max. 2,0 µl) použití vysoce citlivého a specifického detektoru elektronového záchytu (ECD) [7].

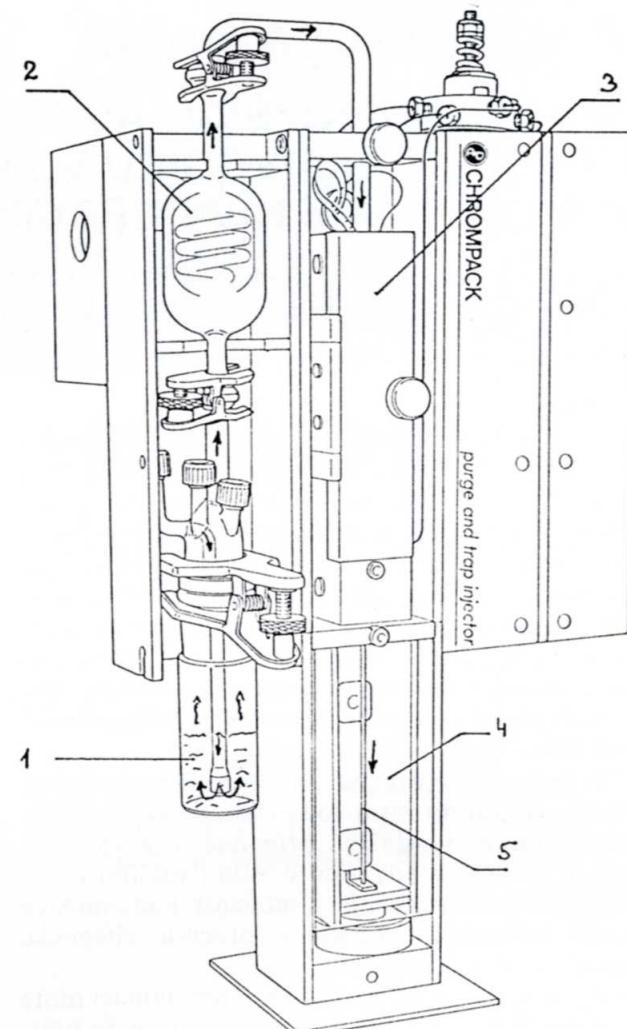
Tuto techniku však nelze použít pro nástřik složitých matric, jakými je například pivo. Východiskem umožňujícím stanovení halogenuhlovodíků v komplexních matricích je použití headspace technik v různém provedení. V případě statické headspace techniky je na kolonu nastrikována plynná fáze odebraná plynотěsnou stříkačkou z uzavřené nádobky po dosažení fázové rovnováhy. U dynamické headspace techniky je analyt vypláchnut (vystripován) proudem inertního plynu z matrice a zachycen na vhodném sorbantu (Tenax, Chromosorb apod.). Citlivostí, rychlostí a jednoduchostí se metody klasické statické headspace analýzy vyrovnaní metodám přímého nástřiku extraktu, jejich nevýhodou je poněkud horší přesnost. Naopak při přípravě vzorku se uplatní přednosti statické headspace analýzy zejména u složitých matric, spočívající v minimálních časových a pracovních náročích na přípravu vzorku [8]. Zvýšení rychlosti a přesnosti headspace analýz lze docílit i použitím automatizovaných systémů u plynových chromatografů [9] nebo zařazením automatických headspace dávkovačů [10]. V zahraniční literatuře je považováno za vysoce efektivní spojení dynamického stripovacího zařízení a plynového chromatografu vybaveného hmotnostním detektorem (GC-MS) [11]. Výhodou je dosažená vysoká citlivost a selektivita, nevýhodou vysoké finanční nároky. Značný pokrok přineslo do této oblasti zařazení kryofokusačního nástavce za dynamický headspace dávkovač, neboť tím byla umožněna předkoncentrace analytu po tepelné desorpci před jeho vstupem na kolonu. Analyt vstupuje v tomto případě na kolonu v úzkém pásu a s větší koncentrací, než jak je to možné dosáhnout při prosté tepelné desorpci. Výsledkem je pak možnost použít kromě citlivých specifických detektörů, např. detektoru elektronového záchytu (ECD) i běžných méně citlivých a nespecifických detektörů, např. plamenoionizačního detektoru

(FID). Náklady na pořízení tohoto zařízení jsou v porovnání se spojením GC-MS nižší. Výhody i nevýhody tohoto zařízení byly detailně diskutovány v publikaci Kesselse et al. [12].

POUŽITÉ METODY STANOVENÍ

S ohledem na uvedené údaje jsme přikročili, poté co bylo oddělení speciálních analýz vybaveno v roce 1993 Purge and Trap Injektem (PTI) firmy Chrompack, k porovnání vhodnosti využití statické headspace techniky a progresivní dynamické headspace techniky pracující s kryofokusačním nástavcem při stanovení nižších alifatických halogenuhlovodíků v pivu.

Mechanismus funkce PTI je zřejmý z obrázku (obr. 1).



Obr. 1 Schéma Purge and Trap Injektoru (PTI)

1 — Nádobka se stripovanou matricí, 2 — Kondenzor, 3 — Desorpční část, 4 — Komůrka chlazená kapalným dusíkem, 5 — Vyhřívaná odporná pícka

Analyt je vypláchnut proudem dusíku z roztoku umístěného v nádobce injektoru. Po průchodu kondenzorem, kde je stripovací plyn zbaven vlh-

kosti, postupuje dusík s analytem přes desorpční část (v této modifikaci vyřazena z činnosti) do kryofokusační části přístroje. Ta je tvořena speciální křemennou kolonou umístěnou v odporové píce. Během stripovací fáze je tato část chlazena tekutým dusíkem, přičemž dochází ke kryofokusační (předkoncentraci) analytu vymražením na stěnách křemenné kolony. Po ukončení stripování je zapojeno odporové vyhřívání pícky, které umožní během několika sekund dosáhnout požadované desorpční teploty (200 až 240 °C). Tím dojde k vypláchnutí zachyceného analytu na kolonu plynového chromatografu.

Vzhledem k tomu, že se jedná o moderní progresivní metodu, se kterou nejsou doposud v pivovarství prakticky žádné zkušenosti, bylo nutno se při vypracování metodiky vyrovnat s mnohými obtížemi. Největším problémem bylo pěnění vzorků piv. Protože jsou headspace metody převážně nasazovány v oblasti stanovení látek snadno těkavých, nepřipadá v úvahu použít pro odpěnění piva běžné metody založené na jeho vytřepání, neboť ztráty způsobené vytěkáním stanovených látek by mohly naprostě znehodnotit docílené výsledky. Z tohoto důvodu bylo odzkoušeno několik variant odpěnění vzorku s cílem nalézt optimální řešení zamezující pěnění vzorku při stripování. Hlavním požadavkem přitom bylo zamezit negativnímu ovlivnění výtěžnosti stripovaných halogenuhlovodíků. K odpěnění byly použity přídavky silikonového oleje, Ba(OH)₂, sonifikace, přídavky vláknité celulosy a jejich vzájemná kombinace. Nejlepší výsledky byly dosaženy kombinací přídavku silikonového oleje a vláknité celulosy (tab. 1).

Tabulka 1 Různé způsoby odpěnění piva a docílené výsledky

	Bez přídavku	Silik. olej	Ba(OH) ₂	Silik. + Ba(OH) ₂	Celulosa	Silik. + celul.
Čerstvé pivo	-	+	+	+ (+)	+	++
Sonifik. pivo	-	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)

- = nevyhovující
 + = vyhovující (mírné potíže s pěněním)
 + (+) = vyhovující, ale ztráty analytu v některých případech
 ++ = plně vyhovující
 Doba sonifikace 1 min., výkon lázně 75 W

Dalším krokem byla potřeba vyřešit dokonalý záchyt a následnou separaci i velmi těkavých alifatických halogenuhlovodíků (fluorované uhlovodíky, dichlormethan apod.), které zatím nejsou předmětem našeho zájmu, ale u nichž je předpoklad, že bude jejich obsah též sledován. Kromě toho je schopnost stanovit tuto halogenuhlovodíkovou frakci nutným předpokladem k získání správných a reprodukovatelných výsledků. Z tohoto

důvodu byla kryofokusační kapilára o vnitřním průměru 0,53 mm naplněna v délce 1,5 cm polymerními sorbenty (Tenax a Chromosorb 101). Porovnáním docílených výsledků nebyl zjištěn významný rozdíl mezi oběma použitými sorbenty. V porovnání s výsledky s neplněnou kryofokusační kapilárou však oba sorbenty vykazovaly zlepšené schopnosti záchytu velmi těkavé halogenuhlovodíkové frakce. S ohledem na lepší teplotní stabilitu Tenaxu (max. dosažitelná teplota 375 °C) oproti Chromosorbu 101 (max. dosažitelná teplota 325 °C) byl pro další pokusy vybrán sorbent Tenax.

Statická headspace technika byla prováděna na kapilárním chromatografu firmy Fisons (Carlo Erba Mega 5300) spojeného se statickým headspace dávkovačem firmy Dani HSS 3950. Dynamická headspace analýza s následnou kryofokusační byla prováděna na kapilárním plynovém chromatografu firmy Chrompack CP 9001 vybaveném PTI. V obou případech byla použita totožná křemenná kapilára DB-5 (firma J&W), o délce 30 m, vnějším průměru 0,32 mm a tloušťce filmu 0,25 μm.

Podmínky statické headspace metody

Vzorky byly temperovány po dobu 60 min při teplotě 50 °C.

Plynотsná injekční stříkačka byla temperována na 60 °C.

Objem headspace nádobky činil 20 ml.

Detektor elektronového záchytu (ECD)

Teplota nástřiku 200 °C

Teplota detektoru 300 °C

Teplota pece izotermní 35 °C

Nosný plyn dusík, průtok 1,5 ml/min (tj. lineární rychlosť 30 cm/s)

Způsob nástřiku split 1 : 20

Objem nastřikované plynné fáze 1 ml (manuální způsob).

Podmínky dynamické headspace metody

Detektor elektronového záchytu (ECD)

Teplota nástřiku 220 °C

Teplota detektoru 300 °C

Teplota pece 40 °C (izotermní)

Nosný plyn dusík, průtok 1,5 ml/min (tj. lineární rychlosť 30 cm/s)

Program PTI

Doba předchlazení cryotrapu 2 min.

Teplota cryotrapu — 120 °C

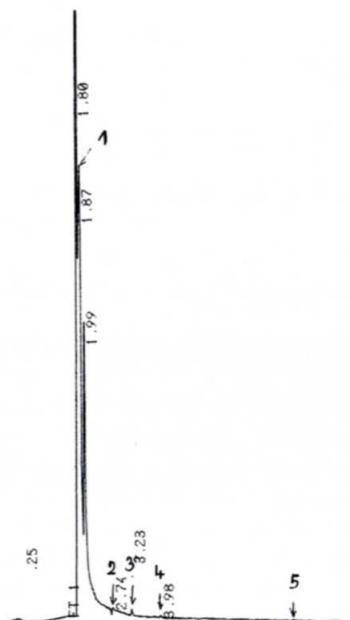
Doba stripování 10 min

ZÍSKANÉ POZNATKY A JEJICH VYUŽITÍ V PRAXI

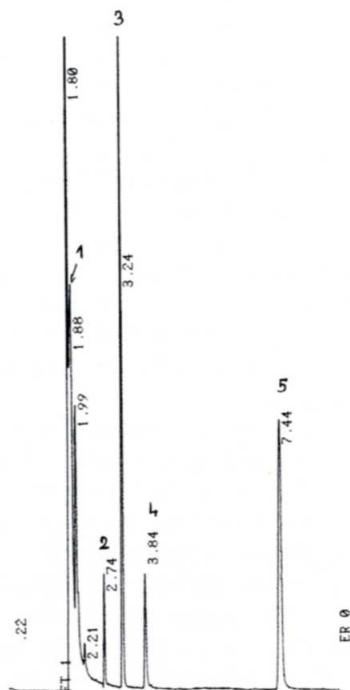
S ohledem na přehlednou identifikaci jednotlivých sloučenin byl u následujících chromatogramů zvolen jejich jednotný popis. Dichlormethan (1), trichlormethan (2), tetrachlormethan (3), 1,1,2-trichlorethen (4), 1,1,2,2-tetrachlorethen (5).

Poznatky, které jsme získali, lze shrnout do následujících bodů:

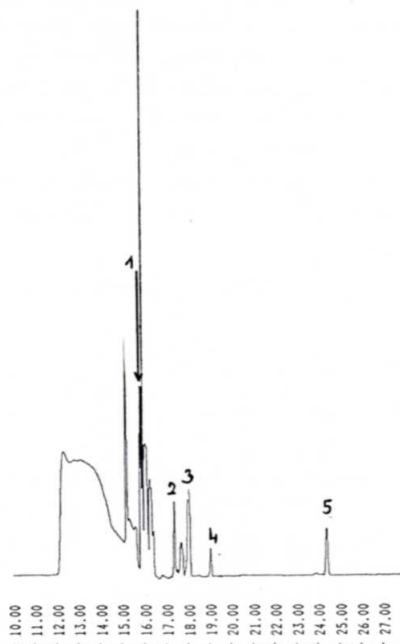
- Při statické analýze odpadají problémy spojené s pěněním vzorku. V případě dynamické headspace naopak představuje pěnění největší problém, který lze, i když s potížemi, řešit.
- Získané chromatogramy jsou při srovnatelné úrovni signálu (attenuaci) u obou metod přehledné a prosté interferencí (Obr. 2, 3, 4, 5).
- Při testování metody na pivu byl pozorován matriční efekt, projevující se vyvázáním malé části (cca 30 %) prvého standardního přídavku sledovaných halogenuhlovodíků vzorkem. Při vyhodnocování výsledků je třeba vzít tuto skutečnost v úvahu. U dalších přídavků již nebyl vliv matrice prokázán. S ohledem na získané výsledky lze předpokládat, že se s nejvyšší pravděpodobností jedná o chemické vyvázání přidaných látek.
- Mez stanovitelnosti metody dynamické headspace s PTI se pohybuje u reálných vzorků v oblasti ng/l, přičemž relativní směrodatná odchylka u vzorků piva s obsahem cca 0,5 µg/l jednotlivých halogenuhlovodíků (po přídavku standardu) kolísala u jednotlivých látek v rozmezí 9 až 20 %.
- Vysoká citlivost této metody klade ve srovnání se statickou headspace značné požadavky na čistotu použitých rozpouštědel.



Obr. 2 Chromatogram kvalitního 12% světlého piva získaný metodou statické headspace analýzy.

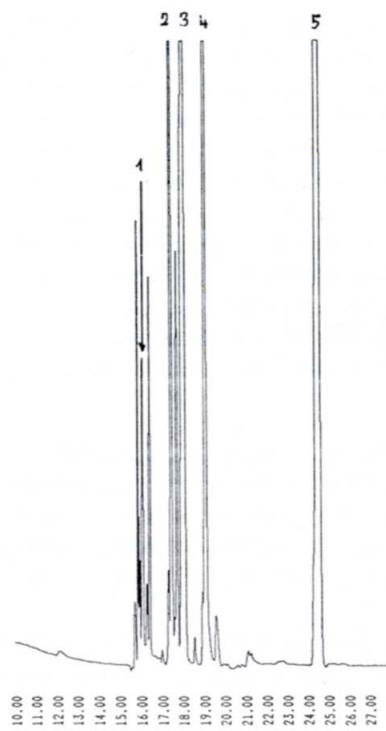


Obr. 3 Chromatogram vzorku z obr. 2 po přidavku směsi standardů odpovídající výsledné koncentraci 50 µg/l dichlormethanu a 10 µg/l ostatních halogenuhlovodíků.



Obr. 4 Chromatogram vzorku z obr. 2 získaný metodou dynamické headspace metody.

V porovnání s metodou statické headspace se vyznačuje metoda dynamické headspace na PTI citlivostí o jeden až dva rády vyšší. Dosažené relativní odchylky u reálných vzorků však byly překvapivě srovnatelné a pohybovaly se v rozmezí 7,3 až 19 %. Uvážíme-li čas potřebný k vystripování vzorku a skutečnost, že je nutné tento čas připočít k prováděné analýze, je tato metoda časově



Obr. 5 Chromatogram vzorku z obr. 2 po přídavku směsi standardů odpovídající výsledné koncentraci 50 µg/l dichlormethanu a 10 µg/l ostatních halogenuhlovodíků.

podstatně náročnější, zejména v porovnání s automatizovanou statickou headspace metodou. Otázka zůstává, zda je uvedená nevýhoda kompenzována vysokou citlivostí této metody. V případě stanovení pouze základních těkavých alifatických halogenuhlovodíků v pivě se zdá být ekonomičtěžší použití statické headspace metody. Naopak při rozšíření spektra stanovovaných látek o všechny trihalomethany a další kontaminanty (residua organických rozpouštědel a chlorovaných homologů — např. chlorbenzeny) je velmi vhodné použít metodu s PTI. Použití moderních verzí PTI vybavených automatickým stripovacím a dávkovacím zařízením zvyšuje produktivitu práce obsluhy i přesnost stanovení. Nespornou výhodou PTI je možnost přímého stripování vzorku. Nevýhodou naopak zůstává omezený objem stripovaného vzorku, což může hrát negativní roli zejména při stripování středně a vysokopolárních látek z polárního roztoku a látek s výším bodem varu, s ohledem na jejich nízkou těkavost. V případě velmi těkavých halogenuhlovodíků však toto nebezpečí nehrozí.

Metoda statické headspace byla v letech 1993—94 úspěšně vyzkoušena při průběžné kontrole kvality exportních piv a piv navržených na udělení značky Czech made, kde je docílení přísného limitu pro obsah těchto látek jedním z rozhodujících kritérií. Všechny zkoušené výrobky vychovely na ně kladený požadavkům. Obsah chlo-

roformu kolísal v rozmezí 0,1 až 1,0 µg/l, tetrachlormethanu v rozmezí 0,05 až 0,6 µg/l, trichlorethenu 0,1 až 0,5 µg/l a obsah tetrachlorethenu se u všech vzorků pohyboval pod mezí stanovitelnosti, která činí 0,05 µg/l.

ZÁVĚR

Nasazení metod statické i dynamické headspace při sledování obsahu nižších alifatických halogenuhlovodíků ve varních vodách a pivu představuje další kvalitativní posun v oblasti analytiky cizorodých látek na VÚPS. Zvládnutí těchto metod umožňuje plně uspokojit náročné požadavky našich zahraničních partnerů, kladené na úroveň naší certifikační činnosti, i požadavky výrobních podniků týkající se kontroly technologického procesu výroby piva.

Literatura

- [1] DONHAUSER, S., GEIGER, E., GLAS, K.: Brauwelt Int., **2**, 1990, s. 98.
- [2] WEIL, L.: Korrespondenz Abwasser, **31**, 1984, s. 488.
- [3] GRANDET, M., WEIL, L., QUENTIN, K. E.: Z. Wasser Abwasser Forschung, **19**, 1986, s. 66.
- [4] ČSN 75 7111, Pitná voda, Praha, 1989.
- [5] AIETA, E. M., BERG, J. D.: J. AWWA, **78**, 1986, s. 62.
- [6] REUNANEN, M., KRONELD, R.: J. Chromatogr. Sci.: **20**, 1982, s. 449.
- [7] LINDEMANN, B.: Brauwelt, **24/25**, 1986, s. 994.
- [8] CASTELLO, G., GERBINO, T. C.: J. Chromatogr., **351**, 1986, s. 165.
- [9] FREEMAN, R. R., PRATT, J. W.: Hewlett Packard Application Note AN 228—19, 1981.
- [10] BRODZINSKY, R., VEDDER, R. L., WYLIE, P. L.: Hewlett Packard Application Note AN 228—66, 1986.
- [11] EICHELBERGER, J. W., a kol.: J. Chrom. Sci., **28**, 1990, s. 460.
- [12] KESSELS, H., HOOGERWERF, W., LIPS, J.: J. Chrom. Sci., **30**, 1992, s. 247.

Lektoroval ing. P. Dostálek, CSc.

Čulík, J.—Kellner, V.—Frantík, F.—Jurková, M.:
Stanovení nižších alifatických halogenuhlovodíků v pivu pomocí statické a dynamické headspace analýzy Kvas. prům., **41**, 1995, č. 4. s. 105—110.

Obsah nižších alifatických halogenuhlovodíků ve varní vodě může být, kromě kontaminace spodních vod organickými látkami, ovlivněn i volbou použitého dezinfekčního činidla při její úpravě v pivovaře. V článku jsou popsány a vzájemně porovnány progresivní analytické metody pracující na principu statické a dynamické headspace analýzy. Výsledky získané při běžné kontrole kvality exportních piv a piv navržených na udělení jakosti Czech made potvrzují skutečnost, že obsah nižších alifatických halogenuhlovodíků v těchto vý-

robcích nepřekročil hranici udávanou ČSN 75 7111 pro pitnou vodu.

Čulík, J.—Kellner, V.—Frantík, F.—Jurková, M.: Determination of Lower Aliphatic Halogen Hydrocarbons in Beer by Using a Statical and Dynamical Headspace Analysis Kvas. prům., 41, 1995, No. 4. pp. 105—110.

The contents of lower aliphatic halogen hydrocarbons in brewing liquor can be, apart from contamination of ground water by organic substances, influenced even by selection of the used disinfectant in the course of water treatment in the brewery. The article gives description and mutual comparison of progressive analytical methods using a principle of the statical and dynamical headspace analysis. The results obtained during routine control of export beers' quality and beers nominated for granting Czech made quality mark confirm a reality that the contents of lower aliphatic halogen hydrocarbons in these products did not exceed a limit given by the ČSN standard 75 7111 for drinking water.

Čulík, J.—Kellner, V.—Frantík, F.—Jurková, M.: Festlegung von niedrigeren aliphatischen Halogenkohlenwasserstoffen im Bier unter Anwendung der statischen und dynamischen Headspace Analyse Kvas. prům., 41, 1995, Nr. 4. S. 105—110.

Der Gehalt von aliphatischen Halogenkohlenwasserstoffen im Brauwasser kann, außer der Kontamination von Grundwässern durch organische Stoffe, gleichfalls durch die Wahl des angewendeten Desinfektionswirkstoffes bei dessen

Aufbereitung im Brauhaus beeinflußt werden. Der Aufsatz beschreibt und gegenüberstellt progressive analytische Methoden, die aus dem Prinzip der statischen und dynamischen headspace Analyse hervorgehen. Die gewonnenen Resultate bei geläufiger Kontrolle der Qualität von Exportbieren und diejeniger zur Erteilung der Qualitätsmarke Czech made vorgeschlagenen Bieren bestätigen die Wirklichkeit, daß der Gehalt von aliphatischen Halogenkohlenwasserstoffen in diesen Produkten lag in den Grenzen, die durch die Norm ČSN 75 7111 für Trinkwasser angegeben werden.

Чулик, Ю.—Келлер, В.—Франтик, Ф.—Юркова, М.: Определение низших алифатических галогенуглеводородов в пиве с применением статического и динамического headspace анализов Квас. прум., 41, 1995, № 4. стр. 105—110.

На содержание низших алифатических галогенуглеводородов в воде для варки может, помимо контаминации подземных вод органическими веществами, оказать влияние даже и выбор используемых дезинфекционных средств в ходе очистки на пивозаводе. Даётся описание и взаимное сравнение прогрессивных аналитических методов, действующих на принципах статического и динамического хедспейс-анализов. Из результатов приобретенных при обычновенном контроле качества экспортных пив и пив предложенных на присуждение качества Czech made вытекает, что содержание низших алифатических галогенуглеводородов в наименованных продуктах не выходит за пределы, установленные стандартом ЧСН 75 7111 для питьевой воды.