

VÝZNAM OXIDU SIŘIČITÉHO V PIVU

Část 2.: Metody stanovení oxidu siřičitého v pivu

SIGNIFICANCE OF SO₂ IN BEER

Part 2: Methods for determination SO₂ in beer

JOSEF DVOŘÁK, PAVEL DOSTÁLEK, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6-Dejvice / *Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague*; dvorak@beerresearch.cz
PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER, JIŘÍ ČULÍK, TOMÁŠ HORÁK, MARIE JURKOVÁ, VÚPS, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lipová 15, 120 44 Praha 2 / *RIBM, Plc., Brewing Institute, Lipová 15, 120 44 Prague*; kellner@beerresearch.cz

Dvořák, J. – Dostálek, P. – Čejka, P. – Kellner, V. – Čulík, J. – Horák, T. – Jurková, M.: Význam oxidu siřičitého v pivu. Část 2.: Metody stanovení oxidu siřičitého v pivu. *Kvasny Prum.* 53, 2007, č. 11–12, s. 338–343.

Článek poskytuje stručný přehled metod stanovení oxidu siřičitého v pivu, s důrazem na elektrochemické metody. Je zde popsána nová elektrochemická metoda umožňující stanovit volný i vázaný oxid siřičitý – průtoková chronopotenciometrie. Nová metoda byla optimalizována, porovnána se standardními metodami EBC a zavedena do praxe.

Dvořák, J. – Dostálek, P. – Čejka, P. – Kellner, V. – Čulík, J. – Horák, T. – Jurková, M.: Significance of SO₂ in beer. Part 2: Methods for determination of SO₂ in beer. *Kvasny Prum.* 53, 2007, No. 11–12, p. 338–343.

The article provides a summary about various types of methods for the determination of sulphur dioxide in beer, with the emphasis on the electrochemical methods. In this article a new electrochemical method for the determination of free and total sulphur dioxide – flow chronopotentiometry is described. This new method was optimized, compared with standard EBC methods and introduced to the practice.

Dvořák, J. – Dostálek, P. – Čejka, P. – Kellner, V. – Čulík, J. – Horák, T. – Jurková, M.: Die Bedeutung des Schwefeldioxids im Bier. Teil 2.: Methoden zur Bestimmung des Schwefeldioxids im Bier. *Kvasny Prum.* 53, 2007, Nr. 11–12, S. 338–343.

Eine kurze Übersicht von Methoden zur Bestimmung des Schwefeldioxids im Bier mit der Betonung an die elektrochemische Methoden wird in diesem Artikel angeführt. Eine neue elektrochemische Methode – Durchflusschronopotenziometrie, die Bestimmung von freiem und gebundenem Schwefeldioxid ermöglicht – wird beschrieben. Diese neue Methode wurde optimisiert, mit standarden EBC Methoden verglichen und in die Praxis eingeführt.

Дворжак, Й. – Досталек, П. – Чейка, П. – Келлнер, В. – Чулик, Й. – Горак, Т. – Юркова, М.: Значение двуокиси серы в пиве. Часть 2: Метода определения двуокиси серы в пиве. *Kvasny Prum.* 53, 2007, No. 11–12, стр. 338–343.

Статья дает краткое описание методов определения двуокиси серы в пиве, с ударением на электрохимические метода. Характеризован здесь новый электрохимический метод позволяющий определение свободной и связанной двуокиси серы – проточная хронопотенциометрия. Новый метод был оптимизирован, сравнен с стандартными методами EBC и введен в практику.

Klíčová slova: SO₂, pivo, stanovení SO₂, elektrochemické metody

Keywords: SO₂, beer, determination of SO₂, electrochemical methods

1 ÚVOD

Ideální metoda stanovení oxidu siřičitého v pivu by měla být spolehlivá, rychlá, nenáročná na práci a měla by také umožňovat měření celkového a volného SO₂.

Metody stanovení SO₂ můžeme rozdělit na přímé a nepřímé (nepřímé metody vyžadují před stanovením SO₂ ještě separaci). EBC (European Brewery Convention) doporučuje tyto tři metody: Monier-Williamsovu destilační metodu, spektrofotometrickou metodu využívající DNTB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová) kyselina] a enzymovou metodu využívající sulfireduktasu (EC 1.8.99.3) [1]. ASBC (The American Society of Brewing Chemists) doporučuje metodu s využitím p-rosanilinu [2]. IOB (The Institute of Brewing) doporučuje destilační metodu vycházející z Monier-Williamsovy metody a p-rosanilinovou metodu [3].

2 METODY STANOVENÍ OXIDU SIŘIČITÉHO V PIVU

2.1 Destilační metoda

Mezi široce rozšířené metody stanovení celkového oxidu siřičitého patří destilační metody. Jde převážně o úpravy Monier-Williamsovy destilační metody (dále jen destilační metoda) [4].

Oxid siřičitý se nejprve oddestiluje z okyseleného roztoku vzorku piva, jímá se do neutralizovaného roztoku peroxidu vodíku, kde se oxiduje na kyselinu sírovou. Kyselina sírová se titruje hydroxidem sodným.

Tato metoda je doporučována EBC. Výhodou je její vysoká přes-

1 INTRODUCTION

The ideal method for analysis of sulphur dioxide in beer should be reliable, rapid, not labor-intensive and should allow measurement of total and free SO₂.

Analytical methods for determination of SO₂ can be divided into direct and indirect (indirect methods require separation of SO₂ prior to analysis). EBC (The European Brewery Convention) recommends three methods: Monier-Williams distillation method, a spectrophotometric method using DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid] and an enzymatic procedure employing sulphite reductase (EC 1.8.99.3) [1]. ASBC (The American Society of Brewing Chemists) recommends a method using p-rosaniline [2]. IOB (The Institute of Brewing) recommends a distillation method based on the Monier-Williams method and also the p-rosaniline method [3].

2 METHODS FOR DETERMINATION OF SULPHUR DIOXIDE IN BEER

2.1 Distillation method

Distillation methods are among the most widely used procedures for analysis of the total SO₂. Most are adaptations of the Monier-Williams distillation method (below: distillation method) [4].

Sulphur dioxide is transported from acidified beer sample by nitrogen and carbon dioxide at 100 °C to the hydro peroxide solution. SO₂ is converted to sulphuric acid, which is titrated with NaOH.

This method is recommended by EBC. Method has the advantage

nost, relativní směrodatná odchylka je 5 %. Nevýhodou této metody je její časová náročnost [5].

Existuje velké množství modifikací Monier-Williamsovy metody, které využívají například přidavku methanolu nebo zpětného chladiče a které jsou více či méně přesné [5].

2.2 Enzymová metoda

Firma Boehringer-Mannheim vyrábí enzymový kit na stanovení celkového oxidu siřičitého v potravinách a jiných materiálech.

Siřičitanový anion je v přítomnosti kyslíku oxidován enzymem siřičitanoxidasou ($\text{SO}_2 - \text{OD}$) na anion síranový. Peroxid vodíku vytvářející se při této reakci se NADH-peroxidasou (NADH-POD) redukuje v přítomnosti NADH (nikotinamidadeninindinukleotid). Množství NADH zoxidovaného při druhé reakci odpovídá množství aniontu SO_3^{2-} . Úbytek absorbance NADH je stanoven při 340 nm [6].

Relativní směrodatná odchylka enzymové metody je 3,21–5,71 %, v závislosti na koncentraci oxidu siřičitého v roztoku [6].

2.3 Jodometrická metoda

Tato metoda spočívá v jodometrické titraci piva. Umožňuje stanovit jak volný, tak i vázaný, v závislosti na nastaveném pH roztoku. Bod ekvivalence se detekuje vizuálně nebo elektrometricky. Přítomnost redukujících sloučenin a pomalost reakce mezi SO_2 a jodem při nízkých koncentracích mohou vést k analytickým chybám [7].

2.4 Spektrofotometrické metody

2.4.1 Steigmanova metoda

Principem této metody je reakce oxidu siřičitého s p-rosanilinem za tvorby kyseliny fuchsinsířičité, která s formaldehydem poskytuje oranžově fialové zabarvení, jehož intenzita se měří při vlnové délce 550 nm [8].

Steigmanova metoda (dále jen spektrofotometrická metoda) umožňuje stanovit jak volný, tak celkový SO_2 . Metoda je velmi rozšířená, ale během posledních několika let se od ní spíše upouští, a to v důsledku možné karcinogenity p-rosanilinu. Jde o doporučenou metodu ASBC a IOB. Pro spektrofotometrickou metodu jsou hodnoty opakovatelnosti $r_{95} = 0,51 + 0,1 \text{ m}$ a reprodukovatelnosti $R_{95} = 0,63 + 0,26 \text{ m}$ (m = průměr) [5].

2.4.2 Metoda s využitím DTNB [5,5 – dithiobis-(2-nitrobenzoová) kyselina]

Tato metoda je doporučena EBC pro pivo o obsahu SO_2 v rozmezí 0–20 mg/l. SO_2 se oddestiluje z odkysličeného okyseleného roztoku do roztoku DTNB ve fosfátovém tlumivém roztoku o pH 8,0, jako nosný plyn se používá dusík. Dále se změří absorbance produktu při 415 nm [9].

2.5 FIA (Flow Injection Analysis)

Většina FIA metod jsou adaptace spektrofotometrických metod. Vzorek se nastříkne do nosného proudu, který obsahuje NaOH pro uvolnění vázaného HSO_3^- , tento proud je smíšen s proudem, který obsahuje H_2SO_4 . Sníží se tak pH a tím se uvolní plyn SO_2 . SO_2 je v proudu veden na plynovou difusní membránu, kde je oddělen. SO_2 dále reaguje s p-rosanilinem (nebo malachitovou zelení) a formaldehydem. Tím vznikne barevný komplex, který je detekován spektrofotometricky [10].

Užití metody FIA přináší mnohé výhody oproti manuálním metodám; snížení kontaktu s nebezpečnými chemikáliemi, snížení spotřeby reagentů a zvýšení výtěžnosti, tj. za stejný časový interval lze vyhodnotit více vzorků [5].

2.6 Chromatografické metody

Asaka et al. [11] popsal HPLC (high performance liquid chromatography) metodu pro stanovení siřičitanů ve víně s využitím N-(9-akridinyl)-maleimid (NAM). Siřičitan reaguje s NAM za tvorby fluorescenčního produktu. Fluorescence se měří při 436 nm a je úměrná obsahu siřičitanu ve vzorku. HPLC stanovení trvá přibližně 10 minut. Tato metoda vyžaduje objem vzorku kolem 100 μl .

Volný i vázaný SO_2 lze stanovit rovněž pomocí plynové chromatografie (GC). Vázaný SO_2 se uvolní přidáním hydroxidu, je zachycen tetrachlorortuťnatým iontem a dále se okyslí na svoje původní pH. Kalibrace může být provedena vytvořením kalibrační křivky nebo přidáním vnitřního standardu. K detekci se využívá plamenofotometrický detektor (FPD) nebo také chemiluminiscenční detektor [12].

Alternativou k HPLC a GC (gas chromatography) je iontově výměnná chromatografie. Jde o kapalinovou chromatografii, kde náplní kolony je silný anion a detekce probíhá pomocí elektrochemického detektoru. Ionově výměnná chromatografie je jednoduchá a rychlá. Metoda má dobrou opakovatelnost a krátký analyzační čas [13].

of accuracy, the relative standard deviation is about 5 %. The disadvantage of this method is its time cost [5].

There are many modifications of the Monier-Williams method, using for example the addition of methanol or the reflux condenser, which are more or less accurate [5].

2.2 Enzymatic method

Boehringer-Mannheim company produces enzymatic kit for the determination of total sulphur dioxide in food and other materials.

The determination is based on the oxidation of sulphite by oxygen in the presence of sulphite-oxidase ($\text{SO}_2\text{-OD}$) to the sulphate anion. Hydrogen peroxide formed in this reaction is reduced by nicotinamideadenine dinucleotide (NADH) in the presence of the enzyme NADH-peroxidase. The concentration of sulphite is calculated from the changes in the NADH absorbance at 340 nm [6].

The relative standard deviation is 3.21–5.71 %, depending on the concentration of sulphur dioxide in the solution [6].

2.3 Iodometric method

The iodometric method is based on the iodometric titration of beer. Free and total SO_2 can be measured by careful pH adjustment. The alternative to visual determination of the end point is to use an electrometric procedure. The interferences can occur due to other reducing materials and also due to the low speed of reaction between iodine and SO_2 at low concentration of sulphur dioxide [7].

2.4 Spectrophotometric method

2.4.1 Steigman's method

The colorimetric determination is based on the reaction between sulphur dioxide, p-rosaniline and formaldehyde, which forms the violet colour. On completing the reaction and development of the colour an absorbance of the p-rosaniline-sulphite complex at 550 nm is measured [8].

Steigman's method allows (below: spectrophotometric method) the determination of free and total SO_2 . The method is widely used, but there is a danger of possible carcinogenic effect of p-rosaniline. This method is recommended by ASBC and IOB. The values of repeatability and reproducibility for spectrophotometric method are $r_{95} = 0.51 + 0.1 \text{ m}$ and $R_{95} = 0.63 + 0.26 \text{ m}$ (m = mean), respectively [5].

2.4.2 Method using DTNB [5,5 – dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid]

DTNB method is recommended by EBC for the total SO_2 in beer (0–20 mg/l). Sulphur dioxide is distilled from acidified beer sample into a buffered DTNB solution, pH = 8.0, with a nitrogen carrier gas. The absorbance is measured at 415 nm [9].

2.5 FIA (Flow Injection Analysis)

Most flow injection analyses are modifications of spectrophotometric methods. The sample is injected into the carrier stream which contains NaOH to release bound sulphites, this flow is mixed with a stream that contains H_2SO_4 . The pH is decreased with H_2SO_4 and the SO_2 is released. SO_2 is carried to a gas diffusion membrane where it is separated. Then SO_2 is then reacts with p-rosaniline (or malachite green) and with formaldehyde to give a colored product. The colored product is measured using a spectrophotometer [10].

Flow injection analysis offers several advantages in comparison with manual methods: shorter operator contact with hazardous chemicals, lesser consumption of reagents and greater numbers of samples can be run for the same degree of operator effort [5].

2.6 Chromatographic methods

Asaka et al. [11] described a HPLC (high performance liquid chromatography) method for determination of sulphites in wine using N-(9-acridinyl)-maleimide (NAM). The sulphite reacts with the NAM to give a fluorescent product. The fluorescent intensity is measured at 434 nm and is proportional to the sulphite content of the sample. The HPLC determination takes 10 minutes. This method requires sample volume of less than 100 μl .

Free and bound SO_2 can be measured by gas chromatography (GC). Bound SO_2 is released by from the solution by addition of alkali and then trapped by using tetrachloromercurate ions, the sample is then acidified to restore it to its original pH value. Such GC method can be calibrated using a separately prepared standard curve, or by using a sulphur-containing compound as an internal standard. Chemiluminescence detection or FPD detection are used [12].

An alternative to HPLC and GC (gas chromatography) is the ion exclusion chromatography. This method uses a liquid chromatography system equipped with a strong anion exclusion column and the de-

2.7 Metody využívající selektivní elektrody

Selektivní elektrody můžeme rozdělit na enzymové a neenzymové, přičemž enzymové jsou běžnější. Enzymové elektrody jsou založeny na působení enzymu siřičitanoxidasu, který katalyzuje oxidaci siřičitanu na síran. Fassnige a Van Engel [14] vyvinuli elektrodu pro stanovení SO_2 ve vzorcích piva; jde o kyslíkovou elektrodu, která má na membráně siřičitanoxidasu. Siřičitan se detekuje amperometricky, podle množství spotřebovaného kyslíku ve vzorku během oxidačního procesu. Přítomnost kvasinek může vést k chybám, stejně tak i přítomnost kyseliny askorbové nebo cysteinu.

Jiné elektrody využívají permeabilní membránu, přes kterou oxid siřičitý prochází do plnicího roztoku elektrody.

Nevýhodou selektivních elektrod je jejich krátká životnost, ne vždy uspokojivá přesnost a především velké pořizovací náklady.

2.8 Metoda využívající infračervenou spektrometrii

Skands et al. [15] představili novou metodu pro stanovení celkového oxidu siřičitého. Metoda je založena na infračervené spektrometrii. Mez detekce metody leží pod 1 ppm a čas potřebný pro analýzu je přibližně 15 minut. Metoda je jednoduchá a nenáročná na obsluhu. Opakovatelnost a přesnost metody je přibližně stejná jako u GC metody. Nevýhodou je její finanční nákladnost.

Zařízení tvoří uzavřený adiabatický systém, ve kterém je v rovnováze kapalná a plynná fáze. Koncentrace v plynné fázi je měřena Air-Tech 1312 PAS/IR zařízením vybaveným SO_2 filtrem. SO_2 signál se měří po a před přidáním kyseliny fosforečné a konečný výsledek je dán rozdílem těchto dvou signálů.

Měření může narušit přítomnost složek piva absorbujících ve stejném pásmu jako SO_2 , jde např. o ethanol a jiné sloučeniny s hydroxyskupinami.

2.9 Elektrochemické metody

Holak et al. [16] použili rychlou a citlivou polarografickou metodu ke stanovení siřičitanů v potravinách a nápojích. Metoda zahrnuje Monier-Williamsovu destilaci s následnou polarografickou detekcí diferenční pulsní polarografií nebo polarografií s pravouhlým napěťovým pulsem. Tato metoda je specifická pro SO_2 .

Cardwell et al. [17] použili voltametrii ke stanovení oxidu siřičitého v červeném víně. Metodu stanovení volného a celkového oxidu siřičitého v pivu voltametriky navrhli Almeida et al. [18].

2.9.1 Voltametrická metoda [18]

Voltametrickou metodu lze použít ke stanovení volného a celkového SO_2 v pivu využitím rtuťové kapkové elektrody. Nejprve se provádí stanovení acetaldehydu, který tvoří 95 % všech aldehydů v pivu, a poté oxidu siřičitého.

Acetaldehyd lze stanovit jak v kyselém, tak i v zásaditém prostředí. Ke stanovení se využívá reakce aldehydu (acetaldehydu) s hydrazinem v kyselém prostředí za tvorby elektronaktivní sloučeniny hydrazone. Redukce hydrazonu na rtuťové kapkové elektrodě (DME) je dvouelektronový proces a elektrický proud je úměrný koncentraci acetaldehydu (obdobně se na DME redukuje H_2SO_3 , proud je opět úměrný koncentraci H_2SO_3).

Po odstranění acetaldehydu se vzorek piva okyslí. Všechny ionty HSO_3^- se v kyselém pH vyskytují ve formě SO_2 , a ten může být jednoduše odstraněn probubláním dusíkem do voltametrické cely, kde je voltametriky stanoven v acetátovém pufru (pH = 5,0). H_2SO_3 se v cele redukuje a proud je úměrný koncentraci H_2SO_3 .

Koncentrace volného SO_2 se získá jako rozdíl mezi celkovou koncentrací SO_2 a koncentrací acetaldehydu, která představuje víc než 95 % všech aldehydů v pivu.

2.9.2 Průtoková chronopotenciometrie

Jde o elektrochemickou metodu (dále chronopotenciometrická metoda), která byla vyvinuta slovenskou

tekcí je prováděna elektrochemickým detektorem. Ion exclusion chromatography is simple and rapid, with good repeatability and short time of analysis [13].

2.7 Method using selective electrodes

Selective electrode can be split into enzymatic and nonenzymatic, of which the enzymatic types are most common. Enzymatic electrodes are mostly based on the use of sulphite oxidase to catalyze oxidation of sulphite to sulphate. Fassnige and Van Engel [14] evaluated an electrode for use in beer; which was based on the oxygen electrode and contained sulphite oxidase on the membrane. Sulphite is detected amperometrically as oxygen in the sample is depleted during the oxidation process. The presence of yeast in the sample led to erratic results, interference also resulted from the presence of either ascorbic acid or cysteine.

Other electrodes feature the use of gas-permeable membrane, through which SO_2 can pass into the filling solution of electrode.

The disadvantage of this method is a short operating life of the electrode, not always satisfactory accuracy and also heavy costs.

2.8 Method using infrared spectroscopy

Skands et al. [15] provided a new method for the determination of total sulphur dioxide. The method is based on infrared spectroscopy. A detection limit is less than 1 ppm and time of analysis of less than 15 minutes. This method is simple and easy to manipulate. The present measuring method for SO_2 has proven very repeatable and the accuracy is at least as good as that of the GC method. The disadvantage is its heavy costs.

The set-up consists of closed, adiabatic system containing an aqueous and gaseous phase in equilibrium. Concentration in the gaseous phase is measured using an Innova Air-Tech 1312 PAS/IR instrument fitted with a SO_2 -filter. The SO_2 signal is measured before and after addition of phosphorous acid and the final measurement is defined as the difference between these two signals.

Several minor components in beer samples may absorb in the SO_2 region and so cause interference, for example ethanol and the other compounds with hydroxy group.

2.9 Electrochemical methods

Holak et al. [16] used rapid and active polarographic method for the determination of sulphites in food a beverages. This method involves Monier-Williams distillation method with polarographic detection by a differential pulse polarography or a polarography with rectangular voltage. Mentioned method is specific for SO_2 .

Cardwell et al. [17] used voltammetry for the determination of sulphur dioxide in a red wine [18].

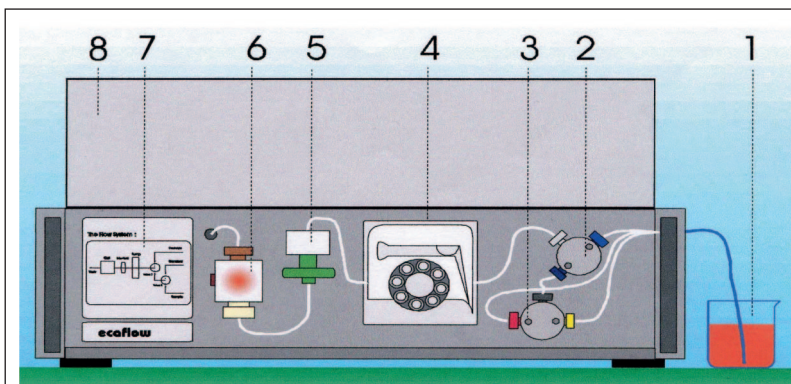
Voltammetric determination of sulphur dioxide and acetaldehyde was at first presented by Almeida et al. [18].

2.9.1 Voltammetric method [18]

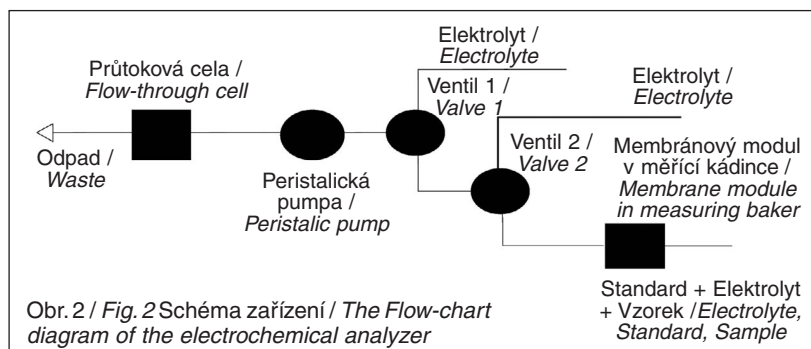
Voltammetric method is proposed to for the determination of both total and free sulphur dioxide in beer, using a hanging mercury drop electrode. First the determination of acetaldehyde is performed, because it represents approximately 95 % of all aldehydes in beer, and finally SO_2 is analyzed.

Acetaldehydes can be determined voltammetrically in either acidic or alkaline media. By reacting with hydrazine under acidic conditions acetaldehyde can be quantitatively converted into an hydrazone, which is electroactive. The reduction of the hydrazone at the dropping mercury electrode (DME) is a two-electron process and the current is proportional to acetaldehyde concentration. (reduction of H_2SO_3 is also two-electron process, the current is proportional to H_2SO_3 concentration).

Then, beer is acidified with HCl to convert all sulphite into SO_2 . SO_2 is then



Obr. 1 / Fig. 1 Popis zařízení: 1) roztok vzorku, 2) přepínací ventil na dávkování standardu nebo blanku, 3) přepínací ventil na přepínání mezi vzorkem a elektrolytem, 4) peristaltické čerpadlo, 5) držák filtru, 6) měřicí cely, 7) signalizační panel, 8) ochranný kryt / The description of instrumentation: 1) sample solution, 2) change-over valve for dosing of standard or blank, 3) change over valve for switching between sample and electrolyte, 4) peristaltic pump, 5) filter holder, 6) measuring cell, 7) signalling panel, 8) safety screen



firmou Istran a umožňuje stanovení volného a celkového SO_2 . Výhodami této metody jsou přesnost, dobrá opakovatelnost a časová nenáročnost.

Siřičitany se převedou oxyselením na oxid siřičitý, který se po průchodu přes semipermeabilní membránu nahromadí na pracovní elektrodě a následně se konstantním proudem oxiduje na síran:



Při tomto kroku se zaznamená signál – rozpouštěcí chronopotenciogram, ze kterého se vypočítá množství a koncentrace siřičitanů ve vzorku.

Volné siřičitany se stanovují přímo po oxyselení vzorku, celkový obsah siřičitanů po převedení volných a vázaných siřičitanů na anion SO_3^{2-} a následně na oxid siřičitý.

3 ZAVEDENÍ PRŮTOKOVÉ CHRONOPOTENCIOMETRIE DO PRAXE

3.1 Roztoky a reagenty

Pro přípravu roztoků byla použita redestilovaná voda (MilliQ, Millipore, USA). Jako zdroj SO_2 sloužil Na_2SO_3 (SigmaUltra). Koncentrace standardů byly 0,5; 1,0 a 2,0 mg SO_2/l . Ke generování oxidu siřičitého byla použita 1M H_2SO_4 . Nosný elektrolyt tvořila 0,1M H_2SO_4 . Pro uvolnění vázaného SO_2 byl přidáván 1M NaOH (97% H_2SO_4 a NaOH byly p. a. kvality, Penta Chrudim, ČR).

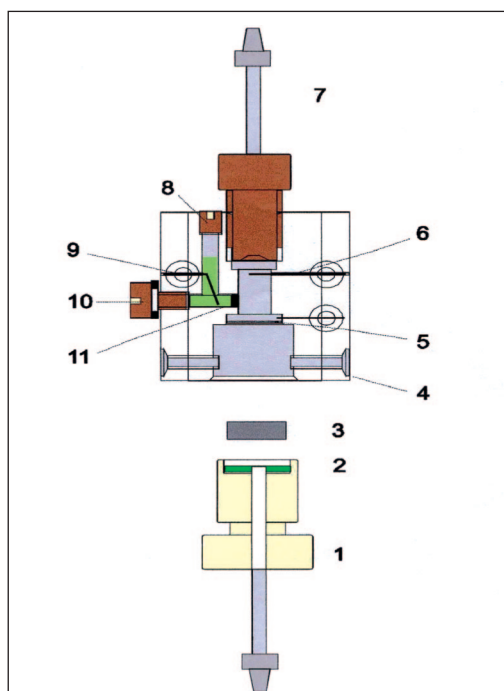
3.2 Aparatura

Elektrochemické (chronopotenciometrické) stanovení bylo provedeno na průtokovém elektrometrickém analyzátoru EcaFlow Model 150 GLP (Istran, Bratislava) vybaveném 3-elektrodovou měřicí celou EcaCell typ 353c a separační jednotkou (membránovým modulem). Aparatura byla napojena na počítač třídy PC se softwarem EcaSoft 2.2. Na obr. 1 a 2 je zobrazen popis a schéma zařízení.

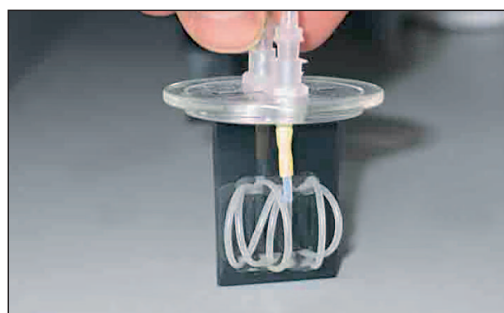
3.2.1 Průtoková ceta EcaCell Typ 353c

Průřez průtokové cety a její součásti jsou schematicky znázorněny na obr. 3. Vyměnitelná válcová pracovní elektroda se skládá z elektricky vodivé obruče a obsahuje porézní elektrodový materiál. Pracovní elektroda se vloží do šroubu s bajonetovým závitem a je utěsněna silikonovým těsnicím kroužkem.

Jako pracovní elektroda byla užitá elektroda E-T/AX (Istran, Bratislava), jako pomocná byla užitá platínová elektroda, která je trvale upevněna v pro-



Obr. 3 / Fig. 3 Průtoková ceta EcaCell 353c, 1) přítlačná struktura s bajonetovým závitem, 2) silikonové těsnění, 3) pracovní elektroda, 4) blok cely, 5) kontakt k pracovní elektrodě, 6) pomocná elektroda, 7) struktura s výstupní hadičkou, 8) uzávěr referenčního prostoru, 9) referenční elektroda, 10) uzávěr referenčního prostoru na doplnění referenčního elektrolytu se silikonovým těsněním, 11) membrána / The Flow-through cell EcaCell Typ 353c, 1) press wheel with bayonet cap, 2) silicone caulking, 3) measuring electrode, 4) cell, 5) connection to measuring electrode, 6) auxiliary electrode, 7) structure with output tube, 8) cap of reference place, 9) reference electrode, 10) cap of reference place for refilling reference electrolyte with silicone caulking, 11) membrane



Obr. 4 / Fig. 4 Membránový modul (separační jednotka) / The membrane module (separation unit)

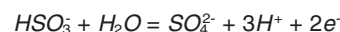
transferred by nitrogen gas into a trapping solution (0.1 M acetate buffer, pH 5.0) in a voltammetric cell, where it is determined and the current is proportional to H_2SO_3 concentration

Free sulphur dioxide is estimated as the difference between the total SO_2 and the acetaldehyde concentrations.

2.9.2 Flow-through chronopotentiometry

A new electrochemical method, which was developed by Slovakian company Istran, provides the determination of total and free sulphur dioxide. This method is accurate, with good repeatability and not time-consuming.

Sulphites in beer samples are converted to free sulphur dioxide, which after passing through a semi-permeable membrane is collected on the working electrode and then oxidized to sulphates, is determined by stripping chronopotentiometry.



The potential of the electrode is monitored providing the chronopotentiometric response curve. The peak area is directly proportional to the sulphur dioxide content in the sample.

Free sulphites are determined after acidifying the beer sample. The total sulphite content is determined after adding a hydroxide solution to the sample to release the bound forms of sulphites.

3 INTRODUCTION OF FLOW CHRONOPOTENTIOMETRY TO THE PRACTICE

3.1 Reagents

Analytical reagent grade chemicals and purified water (MilliQ, Millipore, USA) were used in the preparation of the solutions. Na_2SO_3 was used as a source of SO_2 (sodium sulphite anhydrous – SigmaUltra). Standards with concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 mg SO_2/l were used. Sulphuric acid 1 M and 0.1 M were used as a solution for generating sulphur dioxide and as a carrier electrolyte, respectively. For releasing of bound sulphur dioxide 1 M NaOH was used. (97% H_2SO_4 and NaOH both p.a. qualities were purchased from Penta Chrudim, Czech Republic).

3.2 Instrumentation

The electrochemical determination was done on the PC controlled EcaFlow 150 GLP electrochemical analyser (Istran, Ltd., Bratislava, Slovakia) equipped with the 3-electrode measuring cell of type 353c and also with the separator module (membrane module). For signal processing and evaluation PC and the software version EcaSoft 2.2 for Windows were used. The description of instrumentation and the schema are depicted in Fig. 1 and Fig. 2.

3.2.1 Flow-through cell EcaCell of type 353c

The crosscut of the flow-through cell EcaCell of type 353c and its components are depicted in Fig. 3. The interchangeable cylindrical operating electrode is composed of the electric conducting ring and it contains porous electrode material. The measuring electrode has to be placed to the bolt with bayonet cap and is caulked with silicone circular section ring.

The working and auxiliary electrodes were of the type E-T/AX gold wire electrode (Istran, Ltd., Bratislava, Slovakia) and platinum

storu nad pracovní elektrodou. Referenční elektroda je Ag/AgCl ponořená v nasyceném roztoku KCl. Elektroda je oddělena od proudícího roztoku membránou.

3.2.2 Membránový modul (separační jednotka)

Membránový modul (obr. 4) tvoří silikonová hadička o vnitřním průměru 1,0 mm a vnějším průměru 1,4 mm. Separační jednotka slouží k odstranění rušivých vlivů matrice vzorku. Měřený oxid siřičitý po okyselení vzorku piva difunduje přes semipermeabilní membránu do nosného elektrolytu, odkud se dále dostává do měřicí cely.

3.3 Měření

Před zahájením měření je nejprve nutné nastavit pracovní parametry (tab. 1), naplnit průtokový systém a měřicí celu nosným elektrolytem a aktivovat elektrodu.

Při vlastním měření se k 10 ml studeného piva v 50 ml baňce přidají 3 ml 1M NaOH. Po 5 minutách je objem doplněn na 50 ml 1M H₂SO₄, vloží se membránový modul a roztok se ihned analyzuje. (Pokud je koncentrace SO₂ vyšší než 5 mg/l, používá se pro stanovení pouze 1 ml vzorku piva.)

3.4 Optimalizace elektrochemické metody

Bylo optimalizováno přidávané množství 1M NaOH a čas jeho působení u vzorku piva, ve kterém byla destilační metodou stanovena koncentrace celkového oxidu siřičitého 7,2 mg/l. Výsledky jsou zobrazeny v tab. 2. Jako optimální se jevílo působení 3 ml 1M NaOH po dobu 5 minut.

3.5 Porovnání se standardními metodami EBC

Za účelem porovnání stanovení obsahu celkového oxidu siřičitého elektrochemickou (chronopotenciometrickou) metodou a doporučenými EBC metodami (destilační metoda, enzymová metoda a p-rosanilinová metoda) [19, 20, 21] byl analyzován jeden vzorek piva (jedna hladina). Každé měření bylo zopakováno šestkrát (tab. 3). Rozdíly mezi výsledky jednotlivých metod byly statisticky vyhodnoceny jednofaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA). Bylo zjištěno, že mezi výsledky (měřeními na jednom vzorku) nebyl statisticky významný rozdíl.

Dále se porovnály výsledky stanovení obsahu celkového oxidu siřičitého elektrochemickou (chronopotenciometrickou) metodou a doporučenými EBC metodami na čtrnácti vzorcích (hladinách) českých piv (jednalo se o výčepní piva, ležáky a nealkoholická piva). Vzorek byl vždy proměřen třikrát každou metodou a výsledky měření jsou vyjádřeny jako průměry z těchto měření (tab. 4). Porovnály se výsledky vždy mezi dvěma metodami párovým t-testem. Jediný statisticky významný rozdíl byl zjištěn mezi potenciometrickou a spektrofotometrickou metodou (výsledky byly vyšší u p-rosanilinové metody), mezi dalšími dvojicemi metod byly rozdíly statisticky nevýznamné.

Výsledků z tab. 3 bylo též využito k výpočtu opakovatelnosti. Z jednotlivých měření byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a opakovatelnost pro jednotlivé metody. Souhrn statistického vyhodnocení je uveden ve spodní části v tab. 3. Z výsledků vyplývá, že hodnoty směrodatné odchylky a opakovatelnosti získané elektrochemickou metodou jsou přibližně stejné jako u destilační metody, ale nižší než u enzymové metody a spektrofotometrické metody.

Tab. 1 / Tab. 1 Pracovní podmínky pro elektrochemické stanovení / Operating conditions for chronopotentiometric determination

	Hodnota / Value
Elektrolyt / Electrolyte	kys. sírová / sulphuric acid 0.1 M Istran ET/AX
Elektroda / Electrode	
Počáteční potenciál / Quiescence potential	400 mV
Konečný potenciál / End potential	900 mV
Stripovací proud / Stripping current	1 µA
Maximální čas rozpouštění / Measurement time	60 s
Regenerační čas / Regeneration time	10 s
Regenerační potenciál / Regeneration potential	1500 mV
Objem vzorku / Sample volume	10 ml
Průtok / Flow rate	3 ml/min

Tab. 2 / Tab. 2 Optimalizace množství 1M NaOH a času jeho působení / Optimization of amount 1M NaOH and time of its reacting

Čas / Time (min)	Objem / Value NaOH (ml)					
	1	2	3	4	5	6
1	0.9	1.2	2.1	2.4	4.0	3.6
2	2.3	3.1	3.4	4.0	5.7	4.9
3	5.2	5.2	5.1	5.7	6.2	6.4
4	6.0	6.4	6.1	6.8	6.9	6.8
5	6.3	6.8	7.2	7.1	7.0	7.0
6	6.2	6.2	7.1	7.0	6.4	6.8
7	6.4	6.4	6.8	6.2	6.8	6.9

Tab. 3 / Tab. 3 Porovnání směrodatných odchylek a opakovatelností srovnávaných metod / Comparison of standard deviations and repeatabilities of tested methods

Měření / Measurement	Elektroch. metoda / Electroch. method	EBC 9.25.1	EBC 9.25.2	EBC 9.25.3
	mgSO ₂ /l	mgSO ₂ /l	mgSO ₂ /l	mgSO ₂ /l
1	3.83	3.20	3.52	3.94
2	3.31	3.60	2.93	2.71
3	3.10	3.40	3.81	3.22
4	3.05	3.70	4.20	3.17
5	3.57	3.00	3.72	3.00
6	3.41	3.30	2.90	4.00
Průměr / Mean	3.38	3.37	3.51	3.34
Směrodatná odchylka / Standard deviation	0.29	0.26	0.51	0.52
Opakovatelnost / Repeatability	0.82	0.72	1.44	1.46

Pozn.: opakovatelnost = 2.8 * SD (směrodatná odchylka)
Note: repeatability = 2.8 * SD (standard deviation)

electrode, respectively. The built-in reference electrode was a silver-silver chloride electrode in saturated KCl. The electrode is separated from flowing sample by membrane.

3.2.2 Membrane module (separation unit)

The membrane separator (Fig. 4) comprises a silicone tube coil of inner and outer diameter 1.0 mm and 1.4 mm, respectively. The separation unit serves as the eliminator of interference from the sample matrix. Sulphur dioxide diffuses through a semipermeable silicone membrane from the acidified beer sample to a carrier electrolyte and then goes to the measuring cell.

3.3 Measurement

Before the start of measurement the experimental parameters are set (Tab. 1), the flow system and the cell are rinsed with the carrier electrolyte and the electrode is activated.

3 mL of 1 M sodium hydroxide is added to 10 mL of a cold beer sample in a 50 mL beaker. After staying 5 min, the volume is made up to 50 mL with 1 M sulphuric acid, the membrane module is immersed into the beaker and the solution is immediately analysed. (If the concentration of SO₂ exceeds 5 mg/L, 1 ml of beer is taken only.)

3.4 Optimization of electrochemical method

The amount of 1 M NaOH and time of its reacting on beer sample were optimized, the concentration of total sulphur dioxide determined by distillation method was 7.2 mg/l. The results are shown in Tab. 2.3 ml of 1M NaOH and 5 minutes of reaction appeared as optimal.

3.5 Comparison with standard EBC methods

In order to compare the electrochemical method and recommended EBC methods (distillation method, enzymatic method and p-rosaniline method) [19, 20, 21] the statistical characterization of methods were carried out by analysing one sample six times. The results are listed in Tab. 3. The statistical test ANOVA (one-way analysis of fluctuation) provided that there was no statistically significant difference among these methods.

Next the determination of total SO₂ in a set of 14 Czech beer samples (lager, nonalcoholic and pale beers were used) was carried out by the electrochemical method and by EBC recommended methods (distillation method, enzymatic method and p-rosaniline method). Each sample was always measured three times by all methods and the results are shown as means in Tab. 4. The data obtained with all methods were compared by pair t-test.

The only one statistically significant difference was found between potentiometric and spectrophotometric methods (the results obtained with the p-rosaniline method were slightly higher than those obtained with the electrochemical method).

The results in Tab. 3 were used for the calculation of repeatability. From the data obtained with all tested methods were calculated mean, standard deviation and repeatability for each method. The summary of statistical evaluation is shown in the bottom part of Tab. 3. The values of relative standard deviation and repeatability obtained with the electrochemical method were similar to the results measured with the distillation method and lower than those obtained by the enzymatic and spectrophotometric methods.

Porovnání objemu vzorku, času analýzy a potřebného vybavení uvedených čtyř testovaných metod je zobrazeno v tab. 5. Z tabulky je patrné, že elektrochemická metoda je rychlejší a jednodušší než ostatní srovnávané metody.

4 ZÁVĚR

Nově vyvinutá elektrochemická metoda byla optimalizována a porovnána se standardními metodami EBC, 9.25.1. – Celkový oxid siřičitý v pivu: Destilační metoda, 9.25.2 – Celkový oxid siřičitý v pivu: Enzymová metoda a 9.25.3 – Celkový oxid siřičitý v pivu: p-rosanilinová metoda. ANOVA testem bylo zjištěno, že rozdíly mezi metodami nejsou statisticky významné na hladině významnosti 95 %, z čehož je patrné, že elektrochemická metoda je srovnatelná s uvedenými referenčními metodami EBC.

Elektrochemická (chronopotenciometrická) metoda je mnohem rychlejší a jednodušší než EBC metody.

Hodnoty směrodatné odchylky a opakovatelnosti elektrochemické metody jsou přibližně stejné jako u destilační metody, ale nižší než u enzymové a spektrofotometrické metody.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (Výzkumný záměr MSM6019369701).

Lektoroval doc. Ing. Jan Šavel, CSc.
Do redakce došlo 4. 1. 2007

Literatura / References

1. Analytica – EBC, EBC Analysis Committee, 5th edition, 1998, Verlag Hans Carl, Getränke-Fachverlag, method 9.25.1–3.
2. ASBC Methods, 9th edition. American Society of Brewing Chemists, 2006, Method Beer-21.
3. Institute of Brewing, Recommended methods of analysis, Institute of Brewing, London, 1991, 227–229.
4. Monier-Williams, G.W.: A new method for the determination of benzoic acid in foods. *Analyst* **52**, 1927, 572–575.
5. Ilett, D.R.: Aspects of the analysis, role, and fate of sulfur dioxide in beer-review. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **32**(4), 1995, 213–221.
6. Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Enzymatic Bioanalysis/Food Analysis. Enzymový kit pro stanovení celkového SO₂ v potravinách a jiných materiálech.
7. Chapon, L., Chapon, C., Djeuga, N.: Free sulfite in beers-kinetic studies. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **40**, 1982, 31–39.
8. Basařová, G. a kol.: Pivovarsko-sladařská analytika, Merkanta, 3. díl, 760–762.
9. Guido, F.L.: How do sulfites help to control beer ageing? *Cerevisia* **30**(2), 2005, 132–137.
10. Fernandes, S.M., Rangel, A.O.S.S.: Determination of total sulfur dioxide in beer by flow injection spectrophotometry using gas-diffusion and the merging zones technique. *J. Inst. Brew.* **104**, 1998, 203–205.
11. Akasaka, K. a kol.: Fluorometric determination of sulfite in wine by N-(9-acridinyl)maleimide. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1990, 501–504.

Tab. 4 / Tab. 4 Porovnání výsledků obsahu celkového oxidu siřičitého v čerstvých pivech získaných elektrochemickou metodou a referenčními EBC metodami / Comparison of the results of total sulphur dioxide determination in fresh beers by proposed chronopotentiometric method and the reference EBC methods

Vzorek piva / Beer	Elektrochemická metoda / Electrochem. method	EBC met. / EBC 9.25.1	EBC met. / EBC 9.25.2	EBC met. / EBC 9.25.3
	mg SO ₂ /l	mg SO ₂ /l	mg SO ₂ /l	mg SO ₂ /l
1	0.5	0.6	0.5	0.4
2	3.7	4.5	3.7	3.2
3	1.8	2.0	1.6	1.8
4	0.4	0.0	0.7	0.3
5	0.4	0.0	1.0	0.6
6	2.6	2.9	2.6	3.1
7	2.0	2.2	2.1	2.3
8	1.3	1.9	1.7	1.9
9	0.1	0.0	0.3	0.3
10	3.0	3.0	2.3	3.5
11	0.1	0.0	0.3	0.2
12	4.1	4.8	4.2	5.0
13	0.3	0.5	0.8	0.6
14	0.0	0.0	0.4	0.1

Tab. 5 / Tab. 5 Porovnání času stanovení, objemu vzorku a vybavení testovaných metod / Time consumption, sample volume and apparatus used in the applications

Metoda / Method	Objem vzorku / Sample volume ml	Vybavení / Equipment	Čas měření / Measurement time (min)	
			1 vzorek / sample	5 vzorků / samples
Elektrochemická metoda / Electrochemical method	10	Analyzátor EcaFlow, Cela EcaCell, E-T/AX elektroda, PC s EcaSoft / Analyser EcaFlow, Cela EcaCell, E-T/AX electrode, PC with EcaSoft	15	30
Enzymová metoda / Enzymatic method EBC 9.25.2	0.1	Enzymový set (R-Biopharm/Boehringer Mannheim), Spektrofotometr / Enzymatic set (R-Biopharm/Boehringer Mannheim), spectrophotometer	50	120
Spektrofotometrická metoda / Spectrophotometric method EBC 9.25.3	10	Spektrofotometr, Vodní lázeň / Spektrophotometr, water bath	40	70
Monier-Williams metoda / Monier-Williams method EBC 9.25.1	100	Destilační aparatura, Topné hnízdo, Tlaková láhev s dusíkem / Distilling apparatus, heating mantle, pressure cylinder with nitrogen	40	200

Comparison of sample volume, time consumption and apparatus used for tested method is shown in Tab. 5. From the Tab. 5 is evident that the electrochemical method proved to be faster and simpler than the other EBC methods.

4 CONCLUSION

The new developed method was optimized and compared with standard EBC methods: 9.25.1. – Total Sulphur Dioxide in Beer: Distillation method, 9.25.2 – Total Sulphur Dioxide in Beer: Enzymatic method and 9.25.3 – Total Sulphur Dioxide in Beer: p-Rosaniline method. From the ANOVA test results that there is no statistically significant difference between these methods at the 95 % confidence level, so the electrochemical chronopotentiometric method is comparable with presented EBC methods.

The electrochemical method proved to be faster and simpler than the other EBC methods.

The values of relative standard deviation and repeatability obtained with the electrochemical method were similar to the results measured with the distillation method and lower than those obtained by the enzymatic and spectrophotometric methods.

Acknowledgement

This study was supported by the Ministry of Education, Youths and Sports of the Czech Republic (Research Project MSM6019369701).

12. Munar, M., Maurice, M.-J., Kluesendorf, A.: Quantitation of sulfur dioxide residues in malt and beer by headspace gas chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**(4), 1994, 168–171.
13. Anderson, C. a kol.: Ion chromatographic determination of sulphites in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**, 1986, 14–19.
14. Fassnidge, D., Van Engel, E.: Evaluation of a sulfite oxidase enzyme electrode for determination of sulfite in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **48**, 1990, 122–124.
15. Skands, B. a kol.: Improved SO₂ control with a new method for at-line measurement. *Proc. 29th Congr. Eur. Brew. Conv.*, 2003, 67/1–67/9.
16. Holak, W., Patel, B.: Differential pulse polarographic determination of sulfites in foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 1987, 572–578.
17. Cardwell, T.J. a kol.: Determination of free sulphur dioxide in red wine by alternating current voltammetry. *Analyst* **116**, 1991, 253–256.
18. Almeida, P.J. a kol.: Free sulfur dioxide in beer as the difference between total sulfur dioxide and acetaldehyde: A voltammetric approach. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **61**(4), 2003, 191–195.
19. Analytica – EBC, EBC Analysis Committee, 5th edition, 1998, Verlag Hans Carl, Getränke-Fachverlag, method 9.25.1.
20. Analytica – EBC, EBC Analysis Committee, 5th edition, 1998, Verlag Hans Carl, Getränke-Fachverlag, method 9.25.3.
21. Analytica – EBC, EBC Analysis Committee, 5th edition, 1998, Verlag Hans Carl, Getränke-Fachverlag, method 9.25.2.