

Stanovení některých vedlejších produktů dezinfekce ve varní vodě a v pivu

Determination of Some Disinfection Byproducts in Brewing Water and Beer

JIRÍ ČULÍK, TOMÁŠ HORÁK, VLADIMÍR KELLNER, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, DANUŠA HAŠKOVÁ, JOSEF DVOŘÁK

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Brewing Institute Prague, Lípová 15, 120 44 Prague 2, Czech Republic

e-mail: horak@beerresearch.cz

Čulík, J. – Horák, T. – Kellner, V. – Jurková, M. – Čejka, P. – Hašková, D. – Dvořák, J.: Stanovení některých vedlejších produktů dezinfekce ve varní vodě a v pivu. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 7–8, s. 303–305.

Při výrobě piva je nutné věnovat náležitou pozornost dezinfekci technologického zařízení. Nejčastěji se vyskytujícími vedlejšími produkty dezinfekce jsou trihalogenmethany a halogenoctové kyseliny. Tato práce popisuje vývoj účinné metody pro stanovení kyseliny chloroctové, bromoctové a jodoctové ve varní vodě a v pivu. K přečištění byla použita metoda extrakce na pevné fázi. Za tímto účelem bylo zkoušeno několik různých typů SPE kolonek. Látky byly stanoveny po methylování na plynovém kapilárním chromatografu vybaveném detektorem elektronového zachytu. Ke kvantitativnímu stanovení byla použita metoda vnitřního standardu. Postup je vhodný pro rutinní stanovení halogenoctových kyselin v pivu. Obsah halogenoctových kyselin ve zkoumaných českých pivech byl vždy pod mezí detekce.

Čulík, J. – Horák, T. – Kellner, V. – Jurková, M. – Čejka, P. – Hašková, D. – Dvořák, J.: Determination of some disinfection byproducts in brewing water and beer. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 7–8, p. 303–305.

Disinfection of the technological equipment during beer production is necessary. Trihalomethanes and haloacetic acids are the most frequent chlorinated byproducts of disinfection. We developed an efficient method for the determination of chloroacetic acid, bromoacetic acid and iodoacetic acid in brewing water and in beer. Solid phase extraction (SPE) was used for the sample clean-up, several SPE columns being tested. The compounds of interest were determined after methylation by capillary gas chromatographic analysis coupled with electron capture detector. A method of internal standard was used for quantitative determination. This procedure is suitable for routine analyses of haloacetic acids in beer. Several Czech beers have been analyzed for the content of monohaloacetic acids, negative results being found in all cases.

Čulík, J. – Horák, T. – Kellner, V. – Jurková, M. – Čejka, P. – Hašková, D. – Dvořák, J.: Die Bestimmung der einigen Desinfektionsnebenprodukten im Wasser und im Bier. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 7–8, S. 303–305.

Während der Bierherstellung wichtig, das Augenmerk auf Desinfektion von Brauanlagen zu legen. Die häufigsten Nebenprodukte der Desinfektion sind die Trihalogenmethanen und Halogenessigsäure. Im diesen Artikel wird eine Entwicklung einer wirksamen Methoden zur Bestimmung der Chloressig-, Bromessig-, Iodessigsäure im Wasser und im Bier beschrieben. Zur weiteren Reinigung wurde die Methode der Extraktion auf der festen Phase mit verschiedenen Typen von SPE Kolonnen angewandt. Die Stoffe werden nach der Methylation am Gaskapillarchromatograph mit einem Detektor des Elektronabfangs festgestellt. Zur quantitativen Bestimmung wurde eine Methode des inneren Standards angewandt. Dieser Verfahren ist zur routinemäßigen Bestimmung der Halogenessigsäuren im Bier geeignet. In den geprüften tschechischen Bieren wurde der Inhalt an Halogensäuren immer unter der Grenze der Detektion.

Klíčová slova: halogenované vedlejší produkty dezinfekce, extrakce na pevné fázi, derivatizace, varní voda, pivo

Keywords: disinfection halogenated byproducts, solid phase extraction, derivatization, brewing water, beer

1 ÚVOD

Mezi vedlejší produkty vznikající při úpravě pitné vody patří toxické trihalogenmethany [1,2] a halogenoctové kyseliny. Při nedostatečném proplachu technologického zařízení po provedené sanitaci se mohou halogenoctové kyseliny také objevit až ve finálním produktu, v pivu [3–5]. Přítomnost těchto látek v nápojích je již řadu let zakázána [6].

Většina publikovaných metod je založena na různých způsobech extrakce a derivatizace halogenoctových kyselin a jejich následném stanovení pomocí plynové chromatografie [7–10]. K detekci se nejčastěji používají detektor elektronového zachytu nebo hmotnostní detektor [7–12]. Většinou se k extrakci používala extrakce v systému kapalina-kapalina [7–10]. Jinou možností izolace těchto látek je metoda extrakce na pevné fázi (SPE) [13–15].

Halogenoctové kyseliny se stanovují po jejich derivatizaci, obvykle methylovací BF_3/MeOH [13], ethylací s $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ [9, 16], butylací pomocí $\text{BF}_3/n\text{-BuOH}$ [10] nebo pentafluorbenzylací s pentafluorbenzylbromidem (PFBBR) [10, 16].

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení halogenoctových kyselin v pivu. V rámci přečištění bylo odevzkoušeno několik SPE kolonek naplněných čtyřmi různými typy sorbentů. K derivatizaci byla použita methylovací činidlem $\text{BF}_3/\text{methanol}$.

1 INTRODUCTION

Trihalomethanes and haloacetic acids are toxic compounds which are disinfection byproducts of the chlorination of drinking water [1,2]. These compounds may be detected in beers also after the inadequate disinfection of the technological equipment during beer production [3–5]. The content of these compounds in beer is prohibited by the legislation of most countries [6].

The most of published methods have been based on different extraction procedures and derivatization followed their determination by gas chromatography [7–10]. The electron capture detector respectively mass selective detector were used most frequently [7–12]. Liquid-liquid extraction procedures were shown in studies [7–10]. Solid phase extraction (SPE) is another possibility for isolation of these compounds [13–15].

The extracted haloacetic acids have been esterified by methylation with BF_3/MeOH [13], ethylation with $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ [9, 16], butylation with $\text{BF}_3/n\text{-BuOH}$ [10] or pentafluorobenzoylation with pentafluorobenzylbromide (PFBBR) [10, 16].

In this work an improved method for the determination of haloacetic acids in beer is reported. Systematic investigations were performed on the off-line clean-up using SPE columns filled with four different types of sorbents followed derivatization of the compounds of interest with $\text{BF}_3/\text{methanol}$ derivatization agent.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie a činidla

Methanol p. a., ethanol p. a., síran sodný bezvodý p. a., kyselina chlorovodíková p. a. byly nakoupeny od firmy Lachema (ČR), ethylacetát p. a., 20% roztok BF_3/MeOH , hexan, kyseliny chloroctová, dichloroctová, bromoctová a jodoctová byly získány od fy Merck (Německo). Ultračistá voda byla získána z přístroje Milli-Q grade Millipore (USA).

Přehled testovaných SPE kolonek a jejich parametrů je uveden v tab. 1.

2.2 Přístroje

Vlastní stanovení bylo provedeno na plynovém chromatografu Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series s detektorem elektronového záchytu. Byly vyzkoušeny tři různé křemenné kapilární kolony: SPB-5 o délce 30 m a vnitřním průměru 0,32 mm s tloušťkou filmu 0,25 μm ; DB-1301 o délce 30 m a vnitřním průměru 0,32 mm s tloušťkou filmu 0,25 μm ; DB-5 o délce 60 m a vnitřním průměru 0,32 mm s tloušťkou filmu 1,0 μm .

2.3 Příprava vzorku

Před použitím byly SPE kolony kondicionovány 3 ml methanolu a poté 3 ml ultračisté vody. V dalším kroku bylo skrz kolonku prosáto za pomoci vakua 20 ml vzorku. Sorbent kolony byl následně promyt 1 ml ultračisté vody. K eluátu byly přidány 2 g NaCl a 10 μl vnitřního standardu dichloroctové kyseliny. Hodnota pH vzorku byla upravena přidáním koncentrované kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 0,5 za použití pH metru a vzorek byl vložen na dobu 1 min do ultrazvukové lázně. Poté byly halogenoctové kyseliny intenzivním třepáním vyextrahovány 4 x 2,5 ml ethylacetátu. Po následné centrifugaci při 3900 ot/min po dobu 4 min byla odebrána ethylacetátová vrstva. Roztok ethylacetátu byl vysušen 2 g bezvodého síranu sodného a ethylacetát byl odpařen do sucha na vakuové rotační odparce při 35 °C.

Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml methanolu a pak byl přidán 1 ml BF_3/MeOH . Roztok byl převeden do šroubovací skleněné vialky a po uzavření byla vialka umístěna na dobu 60 min do vodní lázně o teplotě 85 °C.

Po methylaci byl roztok zchlazen na laboratorní teplotu a extrahován 1,5 ml hexanu protřepáním v ruce po dobu 1 min. Hexanová vrstva byla oddělena a buď ihned nastříknuta do injektoru plynového chromatografu nebo v uzavřené vialce skladována při teplotě -18 °C po dobu několika dnů.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Nejprve byly optimalizovány podmínky plynové chromatografie. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně DB-5 o délce 60 m a vnitřním průměru 0,32 mm a tloušťce filmu 1,0 μm . Chromatografické píky všech stanovených látek byly dobře separovány bez ovlivnění interferencemi. Ostatní kolony poskytl horší separaci.

Optimalizované podmínky pro plynově chromatografickou separaci byly následující: kolona byla vyhřívána na 60 °C po dobu 2 min, poté následoval teplotní gradient 3 °C/min do 80 °C a následně teplotní růst rychlostí 40 °C/min do 285 °C. Injektor byl použit v režimu split-splitless a split ventil byl otevřen po 0,5 min. Teplota injektoru byla 250 °C a detektoru elektronového záchytu 320 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium v kvalitě 5.0, a to při tlaku 55 kPa při 60 °C. Dusík v kvalitě ECD o tlaku 150 kPa byl použit jako přídavný plyn pro detektor.

Dále byla pozornost věnována nalezení nejlepších podmínek pro extrakci. Výsledky získané se sorbentem Extrelut byly neuspokojivé (výťažnost < 5 % při obohacení 100 $\mu\text{g/l}$ každou látkou). Nízká výtěž-

Tab. 1 SPE kolony použité pro stanovení halogenoctových kyselin / SPE columns used for the determination of haloacetic acids

Typ kolony / Column type	Objem / Volume (ml)	Množství náplně / Amount of sorbent (g)	Výrobce / Producer
Extrelut	15	3	Merck (GER)
Separon SGX CN	1	neudáno / unknown	Tessek (CZE)
Bond Elut SAX	3	0.5	Varian (USA)
Separcol Si 18	3	0.5	Anapron (SVK)

2 EXPERIMENTAL

2.1 Reagents and standards

Methanol p. a., ethanol p. a., sodium sulphite anhydrous p. a., salt acid p. a. were purchased from Lachema (Czech Republic), ethylacetate p. a., 20% solution of BF_3/MeOH , hexane, chloroacetic acid, dichloroacetic acid, bromoacetic acid, iodoacetic acid were obtained from Merck (Germany). Water used was Milli-Q grade Millipore (USA).

Outline of tested SPE columns is given in Tab. 1.

2.2 Instrumentation

The GC analysis was carried out using a Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series gas chromatograph equipped with electron capture detector. Three fused capillary columns were tested: SPB-5, 30 m x 0.32 mm i. d. with 0.25 μm film thickness; DB-1301, 30 m x 0.32 mm i. d. with 0.5 μm film thickness; DB-5, 60 m x 0.32 mm i. d. with 1.0 μm film thickness.

2.3 Sample preparation

Prior to use SPE cartridges were conditioned by 3 ml of methanol followed 3 ml of purified water. Then the 20 ml of sample was forced through the bed of sorbent using vacuum. The sorbent was washed with 1 ml of purified water. 2 g of NaCl and 10 μl of internal standard (dichloroacetic acid) were added to the collected eluate. The pH of the sample was changed to the value 0.5 by addition of concentrated HCl by pH meter and sonication was carried out for 1 min. Then the haloacetic acids were extracted with 4 x 2.5 ml of ethylacetate by intensive shaking. After centrifugation at 3900 rpm for 4 min, the supernatant ethylacetate layer was transferred into flask. The ethylacetate solution was dried over 2 g anhydrous Na_2SO_4 . Then ethylacetate was removed by rotary evaporator and vacuum at 35 °C.

The residue was redissolved in 2 ml of methanol followed by 1 ml of BF_3/MeOH and transferred into a screw-capped glass vial. This was cap sealed and placed for 60 min in a water bath at 85 °C.

After methylation, the solution was cooled and extracted with 1.5 ml of hexane by shaking in hand for 1 min. Hexane layer was collected and either immediately injected into the gas chromatograph or transferred into a screw-capped glass vial and stored at -18 °C for several days.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The optimal GC conditions were evaluated. The fused silica capillary column DB-5, 60 m of length and 0.32 mm of internal diameter i. d. with 1.0 μm film thickness obtained the best separation results. The peaks of all compounds were clearly free from interference by other GC eluents. Other columns showed separation problems.

These conditions could be recommended: the GC column was maintained at 60 °C for 2 min, ramped at a rate of 3 °C/min to 80 °C and then ramped at a rate of 40 °C/min to 285 °C. The split-splitless injector was used and the split vent was opened after 0.5 min. Temperature of the injector and the electron capture detector were 250 °C and 320 °C, respectively. The carrier gas was helium 5.0 quality with a column head pressure of 55 kPa at 60 °C. Nitrogen at ECD quality was used as make up gas at pressure of 150 kPa.

In the second step the extraction procedure was tested. Results obtained by using sorbent Extrelut were unsatisfactory (recovery

Tab. 2 Validační parametry: výťažnost, mez detekce a RSD pro stanovení halogenoctových kyselin v pivu / Validation parameters: recovery, limit of detection and RSD for the determination of haloacetic acids in beer

Halogenoctové kyseliny / Haloacetic acid	Výtěžnost / Recovery (%)	Mez detekce / Detection limit (mg/l)	RSD (%)
Chloroctová kyselina / Chloroacetic acid	98	0.1	7
Dichloroctová kyselina / Dichloroacetic acid	96	0.05	5
Bromoctová kyselina / Bromoacetic acid	96	0.05	4
Jodoctová kyselina / Iodoacetic acid	93	0.01	3

Tab. 3 Obsah halogenoactových kyselin v osmi vzorcích českých piv / Content of haloacetic acids in eight Czech beer samples

Halogenoactové kyseliny / Haloacetic acid	Vzorek / Sample 1	Vzorek / Sample 2	Vzorek / Sample 3	Vzorek / Sample 4	Vzorek / Sample 5	Vzorek / Sample 6	Vzorek / Sample 7	Vzorek / Sample 8
Chloroactová kyselina / Chloroacetic acid	N*	N*	N*	N*	N*	N*	N*	N*
Dichloroactová kyselina / Dichloroacetic acid	N*	N*	N*	N*	N*	N*	N*	N*
Bromoactová kyselina / Bromoacetic acid	N*	N*	N*	N*	N*	N*	N*	N*
Jodoactová kyselina / Iodoacetic acid	N*	N*	N*	N*	N*	N*	N*	N*

*) N – pod mezí detekce / N – below detection limit

nost může být způsobena degradací sorbentu při nízké hodnotě pH 0,5.

SPE kolonky Separon SGX CN poskytly podobně špatné výsledky. O něco lepších výsledků bylo dosaženo na kolonkách naplněných sorbentem Bond Elut SAX, kde se výtěžnost chloroactové kyseliny pohybovala okolo 25 %, ale pro další kyseliny dosahovala hodnoty jen asi 10 %. Nejlepší výtěžnost poskytly kolonky Separcol Si C18 (Anapron, Slovensko). Z tohoto důvodu byly všechny experimenty za účelem zjištění validačních parametrů metody dělány na tomto sorbentu.

Validační charakteristiky jsou shrnuty v tab. 2. Správnost metody byla zjištěna pomocí výtěžnosti jednotlivých halogenoactových kyselin. Detekční limit byl stanoven jako $3 \times S/N$ (S = signál, N = šum). Opakovatelnost postupu byla určena opakovaným měřením (pětkrát během jednoho dne) jednoho a téhož vzorku piva s přidavkem halogenoactových kyselin na koncentrační hladině 100 µg/l každé látky.

Na základě takto optimalizovaného postupu bylo na obsah halogenoactových kyselin zanalyzováno osm českých piv. Všechny výsledky byly negativní (tab. 3).

4 ZÁVĚR

Byla vyvinuta metoda, která umožňuje stanovení halogenoactových kyselin, jakožto možných vedlejších produktů po sanitaci, po přechlazení pomocí metody SPE, jejich extrakci ethylacetátem a derivatizaci pomocí $BF_3/MeOH$ v desetinných respektive setinách mg/l piva, a to pomocí plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu. Tento postup je vhodný pro rutinní kontrolu obsahu halogenoactových kyselin v pivu.

Poděkování

Tato práce je součástí Výzkumného záměru MSM 6019369701. Autoři také děkují subjektům sdruženým v ČSPS za podporu při řešení tohoto úkolu.

Autoři si dále velmi vážící pomoci a rad kolegů, kteří tak přispěli k vytvoření skvělé atmosféry v laboratoři.

LITERATURA / REFERENCES

- Čulík, J., Kellner, V., Frantík, F., Jurková, M.: Stanovení nižších alifatických halogenuhlovdíků v pivu pomocí statické a dynamické headspace analýzy. Kvasny Prum. **41**, 1995, 105–110.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Kellner, V.: Stanovení chloroactových alifatických uhlovdíků v pivu. Kvasny Prum. **45**, 1999, 317–320.
- Liang, L., Singer, P. C.: Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomethanes in drinking water. Environ. Sci. Technol. **37**, 2003, 2920–2928.
- Villanueva, C. M., Kogevinas, M., Grimalt, J. O.: Haloacetic acids and trihalomethanes in finished drinking waters from heterogeneous sources. Water Research **37**, 2003, 953–958.
- Janhom, T., Wattanachira, S., Pavasant, P.: Characterization of brewery wastewater with spectrofluorometry analysis. J. Envi. Management **90**, 2009, 1184–1190.
- Anonymous: Council of the European Communities, 1987, Regulation No. 822/87.
- Guyot, A. M., Balatre, P.: Hydrolyse de l'acide monobromacétique et de son ester éthylique dans les boissons. Annales des Falsifications et de l'expertise chimique **61**, 1968, 346–359.
- Nijboer, L.: Determination of haloacetic acids in beer. De Ware(n)-Chemicus **15**, 1985, 18–25.
- Fürst, P., Krüger, C., Habersaat, K., Groebel, W.: Halogencarbon-säuren in Getränken -Gaschromatographische Bestimmung und GC/MS-Absicherung mit negativer chemischer Ionisation. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung **A, 185**, 1987, 17–20.
- Lukas, B.: Schnellmethode zur Bestimmung von Monohalogenessigsäuren in alkoholischen Getränken. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **A, 184**, 1987, 30–32.
- Anonymous: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, 1989, L 36.00–10.
- Magnuson, M. L., Kelty, C. A.: Microextraction of nine haloacetic acids in drinking water at microgram per liter levels with electrospray-mass spectrometry of stable association complexes. Anal. Chem. **72**, 2000, 2308–2312.
- Rothenbücher, L., Weishaar, R., Köbler, H.: Bestimmung von Monohalogenessigsäuren in Bier. Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie **40**, 1986, 4–5.
- Willets P., Dennis M. J., Massey R. C.: Measurement of haloacetic acids and their decomposition in wine by capillary gas chromatography. Food Addit. Contam. **8**, 1991, 119–124.
- Sendra, J. M., Todo, V.: Determination of chloroacetic acid, bromoacetic acid and iodoacetic acid in beer by microbore gas-liquid chromatography and electron capture detection. J. Inst. Brew. **96**, 1990, 85–87.
- Gilsbach, W.: Gaschromatographische Bestimmung von Monohalogenessigsäuren in Bier und weinhaltigen Getränken. Deutsche Lebensmittel-Rundschau **82**, 1986, 107–111.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 19. 1. 2010

Přijato k publikování / Accepted for publication: 24. 2. 2010