

Libovazství a dzoždáčství

Rutinní stanovení etanolu v sulfitových fermentačních médiích metodou plynové chromatografie

663.14.031.236
547.262:543.544

Ing. MILADA ŠESTÁKOVÁ, Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, odbor mikrobiálních výrob, Praha

1. ÚVOD

V posledních pěti letech se ve všech oblastech kvasné chemie a fermentačního průmyslu rozšířily analytické metody plynové chromatografie [1, 6]. Tato metoda je také nejobvyklejším způsobem stanovení etanolu v biologických kapalinách. Umožňuje velmi rychlé a přesné stanovení složitých směsí chemických sloučenin (i v nepatrných koncentracích) jednou analýzou vzorku. Zatímco pyknometrické a různé oxidačně redukční metody pro stanovení etanolu určují pouze „celkovou redukční aktivitu“ vzorku (nebo jeho izolovaných frakcí), umožňuje plynová chromatografie oddělit etanol od ostatních těkavých a redukčních sloučenin, rušících jeho stanovení [2, 3]. Ve srovnání s plynovou chromatografií jsou výše uvedené metody nejen málo přesné, ale i časově náročné a proto nevhodné pro stanovení etanolu ve fermentačních médiích mikrobiálních kultivací. Při výrobě kvasničné bílkoviny ze sulfitových výluhů (nebo z jejich směsi se syntetickým líhem) nepřevyšší obsah etanolu v médiu obvykle 0,5 % hmot. etanolu. Kromě tvorby intermediárních metabolitů (tj. především acetaldehydu a kyseliny octové) znemožňuje stanovení etanolu klasickými metodami především složení sulfitových výluhů, které jsou komplikovanou směsí anorganických a organických sloučenin [4, 5].

Z rozsáhlé literatury o stanovení etanolu plynovou chromatografií v kapalinách vyplývá, že se jako sorbenty pro tyto účely nejčastěji používá některých typů polyethylenglykolu na různých nosičích. Nejnovější metody však dávají přednost různým druhům porézních polymérních kuliček, např. Porapak Q, Chromosorb 101, Synachrom apod. Na nich lze dělit různé typy polárních chemických sloučenin (kyseliny, alkoholy aj.) bez chvostování retenčních písků; jejich další výhodou je chemická stabilita a jednoduchost přípravy kolon. Jako první použil těchto porézních polymérů pro stanovení vody, nižších alkoholů, glykolů, esterů a C₁ — C₃ těkavých kyselin Hollis [7]. Jiné druhy porézních polymérů byly použity pro směsi vody, nižších mastných alkoholů a C₂ — C₆ mastných kyselin [8, 9].

Fermentační média se někdy analyzují přímou injikací vzorku do plynového chromatografu, většinou se však před analýzou upravují (např. filtraci, destilací, difúzí, extrakci aj.).

V této práci jsme vypracovali rychlou metodu pro rutinní stanovení etanolu v sulfitových výluzích plynovou chromatografií na Porapaku Q. Etanol se musí předběžně vydestilovat ze vzorku fermentačního média, protože velké množství balastních látek v sulfitovém výluhu ne-

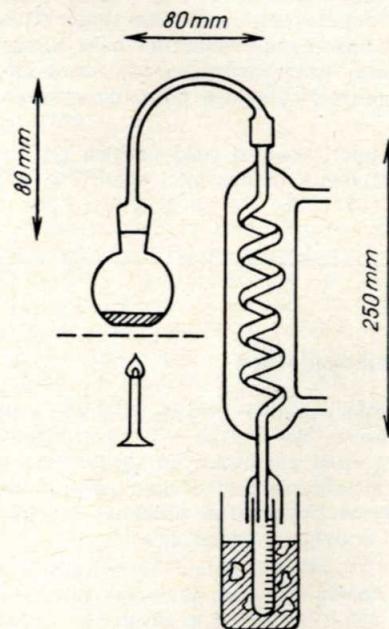
dovoluje přímou analýzu vzorků. První část práce popisuje metodiku a zařízení pro získávání destilátu a pro plynové chromatografickou analýzu, druhá část uvádí experimentální ověření metody.

2. METODIKA

2.1 Příprava destilátu vzorku fermentačního média pro plynové chromatografickou analýzu

2.1.1 Destilační aparatura

Destilační přístroj pro předběžné oddělení etanolu ze vzorku (obr. 1) se skládá z 50 ml varné baňky se zábrusem nasazeným na jednoduchý přestupník a ten na spirálový chladic (může se použít i Liebigův, asi 300 mm dlouhý). Ústí chladice je vloženo do kalibrované zkumavky (nebo cdmerné baňky) obsahu 10 ml, umístěné v ledové vodní lázni (směs vody a ledu).



Obr. 1. Destilační přístroj

2.1.2 Pracovní postup

Do varné baňky se odpipetuje 10 ml filtrátu nebo supernatantu fermentačního média, zalkalizuje se kapkou

40 %ního NaOH (na pH asi 10). Po přidání varných kuliček se baňka nasadí na přestupník. Zkumavka na jímání destilátu se umístí pod chladič do ledové vodní lázně a začájí se destilace, která trvá asi 10 minut. Jímá se asi 8 ml destilátu. Po vyjmouti zkumavky a vytopenování se obsah doplní destilovanou vodou na objem 10 ml.

2.2 Podmínky metody plynové chromatografie

2.2.1 Přístroj: laboratorní plynový chromatograf Chrom II (Laboratorní přístroje Praha, ČSSR) s modifikací komínkového plamenoionizačního detektoru, jehlových ventilů (na přesnější regulaci průtoku plynů) a s regulací teploty vstřikovací komůrky plynového chromatografa.

2.2.2 Kloná: skleněná, délky 3 m × 3 mm, naplněná Porapakem Q (80–100 mesh).

2.2.3 Nosný plyn: žárovkový dusík: 26 ml/min, vstupní tlak 1,46 kp/cm², výstupní tlak: atmosférický.

2.2.4 Plamen: elektrolytický vodík: 35 ml/min, vzduch: 600 ml/min.

2.2.5 Teplota kolony: 182 °C, vstřikovací komůrky: 220 °C.

2.2.6 Velikost vzorku: 4 µl destilátu, injikovaného Hamiltonovou stříkačkou objemu 5 µl.

2.2.7 Rychlosť posuvu papíru zapisovače: 10 mm/min.

2.2.8 Citlivost zapisovače: 1 : 20 nebo 1 : 200.

2.3 Identifikace a kvantitativní stanovení etanolu v médiu

2.3.1 Stanovení etanolu ve vzorku

Kvalitativně se etanol stanoví porovnáním retenčních časů chromatografického píku vzorku a referenčního vodného roztoku.

Ke kvantitativní analýze slouží metoda absolutní kalibrace:

Po ustálení pracovních podmínek plynového chromatografa se na kolonu dávkují 4 µl destilátu vzorku a na registračním papíře se ihned zaznamená začátek (start) chromatografického záznamu. Po uplynutí pěti minut se analýza může opakovat. Celková doba pro tři paralelní analýzy je 15 minut. Na záznamu se zjistí výška písku (nebo při nestabilitě a nepřesné nastavitelnosti podmínek plynové chromatografie se vypočte plocha písku vyňásobením výšky a šířky písku v polovině výšky) a vypočítá se průměr. Z kalibrační křivky (výška nebo plocha písku versus koncentrace etanolu) odečte se odpovídající obsah etanolu v médiu. Při kinetických studiích často stačí analyzovat pouze jeden vzorek a měřit výšku písku, čímž se zkrátí celková doba pro stanovení etanolu v médiu na 15–20 minut.

2.3.2 Sestrojení kalibračních křivek

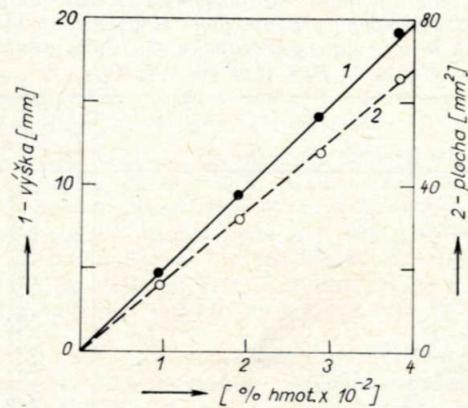
2.3.2.1 Přečištění etanolu pro přípravu standardních roztoků

Velejemný absolutní etanol se předdestiluje s 5 % hmot. množství (vztaženo na etanol) dobře očištěného kovového sodíku pod CaCl₂. Jímá se asi 750 ml střední frakce destilátu.

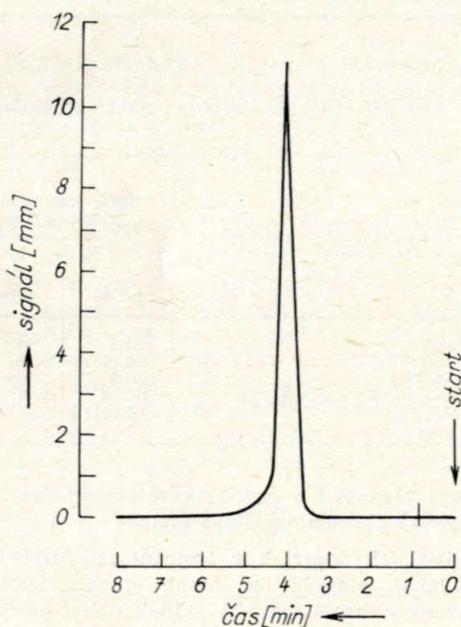
2.3.2.2 Postup práce

V odměrných baňkách se připraví alespoň pět roztoků odstupňované koncentrace v rozmezí 0,001 až 0,02 % (pro citlivost přístroje 1 : 20) a pět roztoků v rozmezí 0,02–0,4 % (pro citlivost 1 : 200) nafeděním přečištěného lihu do destilované vody. Do plynového chromatografu se potom injikují 4 µl každého standardního roztoku (po 5 min se stanovení třikrát opakuje). Vypočítá se průměr výšek nebo ploch písků a pro příslušné citlivosti se sestrojí kalibrační křivky.

Kalibrační křivka pro citlivost 1 : 200 a typický chromatogram jsou na obr. 2 a obr. 3. Retenční čas etanolu byl přesně 4 min.



Obr. 2. Kalibrační graf pro etanol; 1 — výška písků nebo 2 — plocha písků versus koncentrace etanolu



Obr. 3. Typický chromatogram pro kvantitativní stanovení etanolu na Porapaku Q

3. VÝSLEDKY

Optimální rychlosť dusíku (nosného plynu) byla zjištěna experimentálně z průběhu van Deemterovy křivky, měřené etanolem. Počet teoretických pater pro etanol byl 785. Pro určení separační schopnosti kolony byly za stejných chromatografických podmínek stanoveny retenční časy řady těkavých látek, zředěných destilovanou vodou na roztoky 0,1 % hmot. Zjištěné relativní retenční časy (vzhledem k etanolu) těchto sloučenin, tj. metanolu, propanolu, 2-propanolu, n-butanolu, 2-metyl-1-propanolu (izobutylalkoholu), 2-metyl-2-propanolu (terc. butylalkoholu), 3-metyl-1-butanolu (izoamylalkoholu), acetaldehydu, krotonaldehydu, acetonu, metyletylketonu, dietyléteru, etylacetátu a kyselin mravenčí, octové a propionové jsou uvedeny v tab. 1.

Tabulka 1 ukazuje, že kolona je vhodná i pro stanovení případných metabolitů etanolu, tj. acetaldehydu, kyseliny octové aj. Žádná z testovaných sloučenin ne-

ruší stanovení etanolu, kromě kyseliny mravenčí, která v analyzovaných destilátech není nikdy přítomna.

Tabulka 1. Relativní retenční časy (R_x/R_{etanol}) některých těkavých organických sloučenin vzhledem k etanolu na Porapaku Q (další podmínky stanovení jsou uvedeny v textu).

Sloučenina	R_x R_{etanol}
metanol	0,50
acetaldehyd	0,74
kyselina mravenčí	0,99
etanol	1,00
aceton	1,49
2-propanol	1,54
dietylér	1,93
n-propanol	1,96
kyselina octová	2,30
2-metyl-2-propanol (terc. butylalkohol)	2,34
metyletyketon	3,02
etylacetát	3,18
2-butanol	3,20
2-metyl-1-propanol (izobutylalkohol)	3,52
krotonaldehyd	3,84
n-butanol	4,10
kyselina propionová	4,74
3-metyl-1-butanol (izoamylalkohol)	7,78

Tabulka 2. Stanovení přesnosti, reproducovatelnosti (relativní chyby stanovení a směrodatné odchylky) při stanovení etanolu chromatografickou metodou

Ukazatel chromatografické metody (průměrné hodnoty z 12 stanovení)	Koncentrace etanolu (zjištěná pyknometrickou metodou) [% hmot.]	
	0,0728	0,1536
výška píku [mm]	41,6	90,7
etanol [% hmot.]	0,0739	0,1587
nalezeno etanolu [%]	101,5	103,8
chyba chromatografického stanovení [%]	± 1,88	± 1,58
směrodatná odchylka	± 0,0016	± 0,0036

3.1 Ověření přesnosti a reproducovatelnosti destilační a plynové chromatografické metody

Ve standardních vzorcích s koncentrací 0,0728 % a 0,1536 % hmot. etanolu byl obsah etanolu stanoven jednak plynovou chromatografií, jednak pyknometrickou metodou [10]. Zjištěná chyba chromatografické metody byla ve srovnání s pyknometrickým stanovením vždy menší než +5 % rel. (tab. 2). Pro zjištění reproducovatelnosti metody byla analýza destilátů 12krát opakována a byla vypočtena střední chyba stanovení a směrodatná odchylka. Střední relativní chyba byla vždy nižší než ± 2 %. Směrodatná odchylka při stanovení etanolu v koncentraci 0,0728 % činila ± 0,0016 a při stanovení etanolu v koncentraci 0,1536 % činila ± 0,0036 (tab. 2).

3.2 Vliv sulfitového výluhu na přesnost chromatografického stanovení etanolu v destilátech modelových vzorků

Pro zjištění vlivu sulfitového výluhu na přesnost stanovení etanolu byly v odměrných baňkách (objemu 25 ml) připraveny modelové vzorky pipetováním odstupňovaných množství standardního vodného roztoku etanolu, destilované vody a sulfitového výluhu z Vratimovských papíren (s obsahem asi 2 % redukujících látek a hustoty 15 °Bg) podle schématu, uvedeného v tabulce 3. Vzorky byly předdestilovány a chromatografovány. Průměrný obsah etanolu ze tří paralelních stanovení byl zjištěn po odečtení výšky píku z kalibrační křivky. Výsledky analýz jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Návratnost etanolu při plynové chromatografickém stanovení po destilaci ze standardních vzorků a z modelových vzorků s přidavkem sulfitových výluh. * — vzorky nebyly destilovány, ostatní byly před chromatografií předdestilovány

Číslo vzorku	Podíl kapalin v odměrné baňce (obsahu 25 ml) [ml]			Nalezeno etanolu	
	etanol	voda	sulfitový výluh	[hmot. %]	recovery [%]
1*	5	20	0	0,086	100,0
2*	10	15	0	0,166	100,0
3*	15	10	0	0,272	100,0
1	5	20	0	0,088	102,3
2	10	15	0	0,168	101,2
3	15	10	0	0,288	105,8
4	5	10	10	0,087	101,2
5	10	5	10	0,172	103,6
6	15	0	10	0,288	105,8
7	5	0	20	0,086	100,0
8	5	10	10	0,087	101,2
9	5	15	5	0,087	101,2
10	0	0	25	0,000	—

Z výsledků vyplývá, že v destilátech vzorků byly vždy zjištěny vyšší hodnoty etanolu ve srovnání se stanovením etanolu bez destilace. Maximální střední chyba stanovení byla 5,8 % relativních. Nepodstatně vyšší hodnoty etanolu byly pravděpodobně způsobeny nepřesnostmi v kalibraci nádob. Složení sulfitového výluhu tedy nemá za uvedených podmínek žádný vliv na přesnost stanovení etanolu.

Závěrem lze shrnout, že přesnost a reproducovatelnost plynové chromatografického stanovení etanolu při vyhodnocování z výšky píku je za uvedených podmínek velmi dobrá. Při třech paralelních analýzách je chyba stanovení 5,8 %. Rozdíly mezi stanovením etanolu ve vodních roztocích chromatografickou a pyknometrickou metodou nepřesahovaly 5 %. I když zahrneme všechny vlivy na přesnost stanovení etanolu v sulfitových výluzech, je chyba stanovení nižší než 10 %, což pro sledovaný cíl stačí. Celková doba stanovení etanolu v sulfitovém výluhu je max. 30 min.

Literatura

- PURNELL, H.: Plynová chromatografie. SNTL, Praha, 1966
- JAIN, N. C. - CRAVEY, R. H.: J. Chromatog. Sci., **10**, 1972 s. 257–262
- JAIN, N. C. - CRAVEY, R. H.: J. Chromatog. Sci., **10**, 1972 s. 263–267
- HARVÁNEK, J.: Sulfitový líh a krmné kvásnice. SNTL, Praha, 1960
- BARTA, J.: Kvás. prům., **17**, 1971, č. 7, s. 145–150
- KUMIDER, J.: Przem. Ferment. Rolny, **17**, 1973, č. 8, s. 8–11
- HOLLIS, O. L.: Anal. Chem., **32**, 1966, s. 309–316
- KAPLANOVÁ, B. - JANÁK, J.: Mikrochim. Acta, 1966, č. 1–2, s. 119–125
- ROGOSA, M. - LOVE, L. L.: Appl. Microbiol., **16**, 1968, č. 2, s. 285–290
- Laboratorní kontrola surovin, pomocných látek a výrobků v lihovarském oboru, I. díl, ŠÚVPP, STIPP, Praha, 1967.

Sestáková, M.: Rutinní stanovení etanolu v sulfitových fermentačních médiích metodou plynové chromatografie. Kvás. prům., **21**, 1975, č. 11, s. 252–255.

Byla vypracována rychlá metoda adsorpční plynové chromatografie na Porapaku Q, vhodná pro rutinní stanovení etanolu v sulfitových fermentačních médiích injikací 4 µl jejich destilátů (Hamiltonovou stříkačkou) do plynového chromatografu Chrom 2 (s plamenoionizačním detektorem). V první části je popsán jednoduchý destilační přístroj pro předběžné vydestilování etanolu z 10 ml zalkalizovaného vzorku, v další části je uveden podrobný postup chromatografické metody a ověření její přesnosti a reproducovatelnosti.

Celková doba stanovení je asi 30 minut. Chromatografické stanovení standardních roztoků etanolu bylo také srovnáváno se stanovením pyknometrickým. Sulfitové výluhy neovlivnily přesnost chromatografického stanovení a maximální střední chyba (při měření výšek píků) byla 5,8 % rel. Výsledky získané oběma metodami se lišily max. o 5 % rel.

Шестакова, М.: Применение газовой хроматографии для определения в производственных условиях содержания этилового спирта в сбраживаемой сульфитной барде. Квас. прум. 21, 1975, № 11, стр. 252—255.

Был разработан скоростный метод для определения в производственных условиях с помощью адсорбционной газовой хроматографии на Porapak Q содержания этилового спирта в сбраживаемой сульфитной барде. При помощи шприца Гамильтона впрыскивают в хроматограф ХРОМ 2, оборудованный пламенно-ионизационным детектором, 4 μl дистиллята, полученного из 10 мл образца сульфитной барды. В первой части статьи описан простой дистилляционный прибор применяемый для приготовления дистиллята, в дальнейших абзацах даются точные указания по методике хроматографического анализа. Приведена оценка точности и воспроизводимости метода.

Весь анализ занимает примерно 30 минут. Из сравнения хроматографического метода определения этилового спирта с пикнометрическим видно, что сульфитная барда не влияет на точность хроматографического определения. Максимальная средняя погрешность была 5,8 (в относительном выражении). Максимальная разница между результатами полученными сравниваемыми методами не превышает 5 % (в относительном выражении).

Šestáková, M.: Application of Gas Chromatography for Routine Determination of Ethanol in Fermenting Sulphite Waste Liquor. Kvas. prům., 21, 1975, No. 11, pp. 252—255.

A new time-saving method has been elaborated for sulphite waste liquor. It is based on adsorption gas chromatography on Porapak Q and requires injection

(by means of a Hamilton syringe) of 4 μl of distillate, obtained from a sample of fermenting substance, into a CHROM 2 chromatograph fitted with a flame-ionization detector. In the first part of the article the authoress describes the design of a simple distilling apparatus which is used to prepare distillate from 10 ml samples. Following paragraphs deal with the technique of chromatographic determination, with the accuracy of the method and its reproducibility.

The analysis takes 30 minutes. The comparison of the chromatographic method with pycnometric one shows that the specific properties of sulphite waste liquor have no negative effects upon the reliability and accuracy of determination. The maximum mean error was 5,8 % and the difference between the results given by the two mentioned methods did not exceed 5 %.

Šestáková, M.: Routinemäßige Äthanolbestimmung in Sulphit-Fermentationsmedien mittels Gaschromatographie. Kvas. prům., 21, 1975, No. 11, S. 252—255.

Es wurde eine schnelle Gaschromatographische Methode ausgearbeitet, die für die routinemäßige Äthylalkoholbestimmung in Sulphit-Fermentationsmedien geeignet ist. 4 μl Destillate der analysierten Medien werden mittels Hamilton-Spritze in den Gaschromatograph Chrom 2 (mit Flammenionisationsdetektor) mit Porapak Q - Säule injiziert. In dem ersten Teil wird der einfache Destillationsapparat für die Destillation des Äthylalkohols aus der alkalisierten 10-ml-Probe beschrieben, im weiteren wird ausführlich die vorgeschlagene chromatographische Methode sowie auch ihre Genauigkeit und Reproduzierbarkeit angeführt.

Die Gesamtdauer der Analyse beträgt ungefähr 30 Minuten. Die chromatographische Bestimmung der Standard-Äthanollösungen wurde auch mit der pycnometrischen Bestimmung verglichen. Die Genauigkeit der chromatographischen Bestimmung wurde durch die Sulphitlaugen nicht beeinträchtigt und der maximale mittlere Fehler (bei Messung der Peak-Höhen) betrug 5,8 % rel. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der chromatographischen und pycnometrischen Bestimmungen waren nicht grösser als 5 % rel.