

Kis mennyiségű fenol meghatározása mézben

Barabás Béla és Percsich Kálmán

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Központi Laboratórium, Gödöllő

Érkezett: 2001. május 16.

A kaptárak kezelésénél a méhek távoltartására a hagyományos füstölésnél hatékonyabbnak bizonyult különféle illékony szerves vegyületek párologtatása [1]. A leggyakrabban alkalmazott vegyület a fenol, amely azonban egészségkárosító hatású (protoplazmaméreg), ráadásul jelentős mértékben megkötődik a mézben. Koncentrációja elérheti a 2000-6000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ot is [2, 3].

A Magyar Élelmiszerkönyv a méz fenoltartalmára nem ad meg határértéket, csak általánosan tiltja idegen anyag jelenlétét. Természetes eredetű fenol azonban a kezeletlen mézben is kimutatható [3]. A megengedhető fenoltartalomra vonatkozóan a nagy mézimportáló országok gyakorlatát tekinthetjük irányadónak, mely szerint korábban 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, az utóbbi két évben pedig általában csak 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ alatti fenoltartalmú mézet vesznek át. Élelmezés-egészségügyi és kereskedelmi okokból tehát szükséges a méz fenoltartalmának mérése.

A szakirodalomban a fenoltartalom mérésére gáz- és folyadékkromatográfiás analitikai eljárások állnak rendelkezésre [1, 3, 4, 5]. Meghatározási határunk legfőljebb 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A megengedett határérték szigorodása miatt e módszerek már nem biztosítanak kellő terjedelmet a még elfogadható fenoltartalmú mézek közötti differenciálásra, ezért szükségessé vált kisebb koncentrációk mérése is.

Munkánk célja a [3] gázkromatográfiás módszer továbbfejlesztésével a meghatározási határ csökkentése volt. Megvizsgáltuk a kidolgozott módszer analitikai teljesítőképességét rutinszerű mérési körülmények mellett jellemző fő paramétereket. Vizsgálat tárgya volt továbbá, hogy a mérési pontosság szempontjából belső standardként elegendő-e valamilyen fenolszármazékot alkalmazni, vagy szükséges az ideális belső standardnak tekinthető, de több mint egy nagyságrenddel drágább deuterizált fenol (fenol- d_6) használata.

Anyag és módszer

A vizsgálatok során fölhasznált fontosabb műszerek, eszközök, anyagok a következők voltak:

Gázkromatográf GC 8000 Series, FISOONS

Detektor: quadropol tömegspektrométer, MD 800, FISIONS
Szilárdfázisú extraháló (SPE) oszlop: ENVICHrom P, 6 ml, SUPELCO
Kromatográfiás oszlop: SPB-1701 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, SUPELCO
Fenol, 99+ % (Ph), ALDRICH
Fenol-d₆ 99+ atom% D (Ph-d₆), ALDRICH
2,5-Dimetil-fenol 99+ % (DMPH), ALDRICH
terc.-Butil-metil-éter, SupraSolv, MERCK
Metanol, HPLC-minőségű, Carlo Erba
Nátrium-klorid, analitikai tisztaságú, REANAL
Nátrium-szulfát, vízmentes, tiszta, MERCK
o-Foszforsav, 85 %-os, analitikai tisztaságú, MERCK
Víz, kétszer desztillált
Méz, magyar akác- és vegyes virágméz

Fenolmeghatározás módszere

Mintaelőkészítésként vízgőz-desztillációt, majd sztirol-divinilbenzol kopolimer gyantatöltetű oszlopon szilárd fázisú extrakciót (SPE) alkalmaztunk. A szerves oldószerbe került fenolt gázkromatográfiás módszerrel, 14 % cianopropilfenil- és 86 % dimetil-polisziloxán állófázisú oszlopon különítettük el, és tömegspektrometriásan detektáltuk. Belső standardként dimetil-fenolt (DMPH) és fenol-d₆-t (Ph-d₆) használtunk.

a) Vízgőz-desztillálás

Vízgőz-desztilláló készülékbe 40 g vizsgálandó mézet, 29 g konyhasót, 8 ml 10 %-os foszforsav-oldatot és 20 ml belső standard-oldatot (400 mg DMPH + 400 mg Ph-d₆ / 1000 ml) mértünk. A mézben lévő fenolt kb. 30 ml desztillátumba vittük át. (Kalibrálásnál a fenolt 10 ml vizes oldatban juttattuk be. Ilyenkor mézet nem mértünk be.)

b) Szilárd fázisú extrahálás

Az SPE oszlopot 6-6 ml t-butil-metil-éterrel, metanollal majd desztillált vízzel kondicionáltuk [6] szerint. Ezután átengedtük a minta-desztillátumot. Az oszlopot kétperces levegő-átszívással szárítottuk. A megkötött fenolt 6 ml t-butil-metil-éterrel mostuk le a szilárd fázisról, és osztott kémcsőbe vittük át. A szerves fázisból késhegynyi nátrium-szulfáttal kivontuk a nyomokban jelen lévő vizet. Az így nyert oldatot használtuk a gázkromatográfiás analízisnél.

c) Kromatografálás

A vizsgálati körülmények a következők voltak:

Injektálás: 200 °C, splitless üzemmód, 1 µl minta

Oszlop: SPB-1701, vivőgáz: He, 40 cm/s lineáris sebesség

Oszloptér hőmérséklet: 40 °C, 1 min; 49,9 K/min 70 °C-ig; 5,0 K/min
170 °C ig

Detektálás: tömegspektrometriás, elektronütközéses ionizálással (EI+)

Üzem mód: egyionos (SIR)

Mért tömegek: Ph:94 AMU, Ph-d₆: 100 AMU, DMPH: 107+122 AMU

d) Adatkiértékelés

A fenolkoncentrációt a kromatogram megfelelő csúcsainak területe alapján számítottuk ki, a belső standard és a visszanyerés figyelembevételével.

Az analitikai teljesítőképesség vizsgálata

Az analitikai jel és a fenolmennyiség közötti összefüggés meghatározásához 0–70 µg tartományban lineáris regressziószámítást alkalmazva ötszintű kalibrálást végeztünk. A tartomány 40 g méz bemérése esetén 0–1750 µg/kg fenolkoncentrációnak felel meg. (A továbbiakban minden adatot 40 g bemért mézre vonatkoztatva adunk meg.)

A visszanyerés meghatározásához párhuzamos mérést végeztünk kis fenoltartalmú (8 µg/kg) méz jelenlétében és méz nélkül, négyszeres ismétlésben, öt hozzáadási szinten. A fenolt 10 ml vizes oldatban juttattuk be desztillálás előtt. A hatásfokot az /1/ képlettel számítottuk ki, ahol Ph_m a méz jelenlétében, Ph_v a méz nélkül mért fenoltartalmat jelenti. Az i index a hozzáadási szintet, a 0 index pedig a 0 hozzáadott fenolmennyiségnél kapott mérési eredményt jelöli.

$$\eta_i [\%] = \frac{Ph_{mi} - Ph_{m0}}{Ph_{vi} - Ph_{v0}} \cdot 100\% \quad /1/$$

A rutin méréseknél elérhető pontosság meghatározásához 290 különböző fenoltartalmú mézet vizsgáltunk meg két párhuzamos méréssel. Az eredményeket nagyság szerint sorrendbe állítottuk, majd tízesével csoportosítottuk. Az egyes csoportok abszolút és relatív pontosságát a /2/ és /3/ képlettel számítottuk ki. Az Ph a mért fenoltartalmat, az 1-2 index az i -edik minta két párhuzamos mérésének eredményét, n pedig a csoportonkénti mintaszámot (jelen esetben $n=10$) jelöli.

$$pr_{abs} [\mu\text{g} / \text{kg}] = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Ph_{i1} - Ph_{i2})^2}{2(n-1)}} \quad /2/ \quad pr_{rel} [\%] = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left(2 \frac{Ph_{i1} - Ph_{i2}}{Ph_{i1} + Ph_{i2}} \right)^2}{2(n-1)}} \cdot 100\% \quad /3/$$

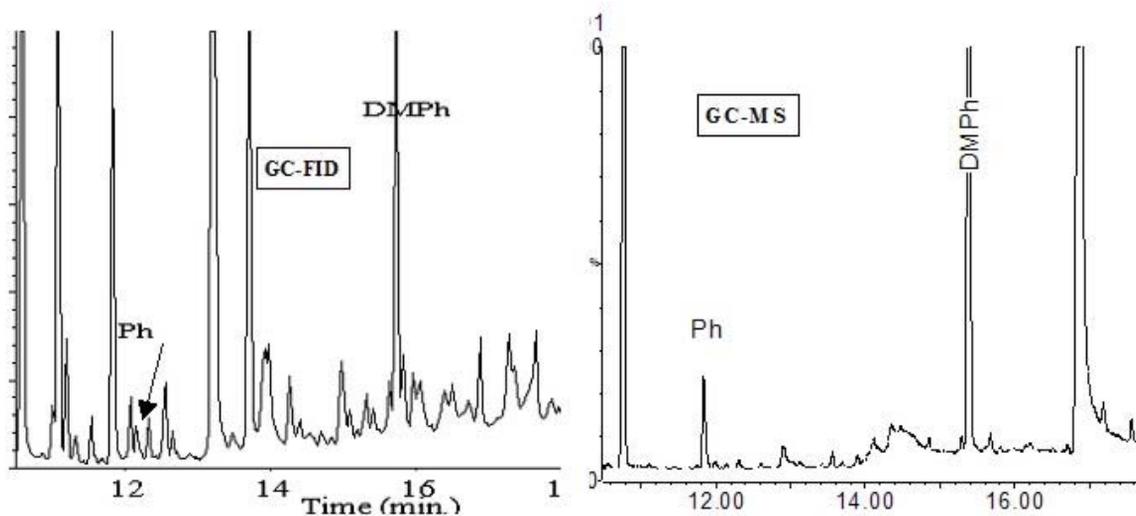
A kimutatási határ elemzéséhez az alapzaj háromszorosát ($3 \cdot \text{peak to peak noise}$) és a (méz nélküli) vak mérési pontosságának háromszorosát ($3 \cdot pr_{abs}$)

hasonlítottuk össze. Az előbbinél a feltételezett koncentrációt a csúcsmagasság alapján számítottuk, az utóbbinál 20 rutin mérésorozat párhuzamos vak-értékeit használtuk föl.

Meghatározási határnak azt a koncentrációt tekintettük, ahol pr_{rel} eléri a 20 %-ot.

Eredmények

Az 1. ábra bal oldalán egy 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fenoltartalmú méz minta GC-FID módszerrel [3] készült kromatogram-részlete látható. Feltűnő, hogy a kétszeres tisztítás (desztillálás és folyadék-folyadék extrakció) ellenére a vizsgálandó oldatba igen sok illó komponens kerül. Az analízis szempontjából a fő probléma az, hogy a fenol az előző csúcstól nem válik el megfelelően, ezért annak zavaró hatása 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fenol-koncentráció alatt túl nagy mérési hibát okoz. Előkísérletek alapján előnyösebbnek bizonyult az extrakciót szilárd fázisúra cserélni, eugenol helyett pedig dimetil-fenol belső standardot használni. Ezzel a fenol-visszanyerés mintegy 50 %-kal, a pontosság 10 %-kal javult, de a csúcsfelbontás továbbra sem vált kielégítővé, ezért lángionizációs helyett a fenolra specifikussá tehető tömegszelektív detektálást vezettünk be (GC-MS módszer). A 1. ábra jobb oldali képén az előbbi méz minta GC-MS módszerrel készült kromatogramja látható, amely szerint a fenol csúcsa elől eltűnt a zavaró csúcs, ezáltal kisebb koncentrációk mérése lehetővé vált.



1. ábra: Fenoltartalmú méz minta GC-FID és GC-MS módszerrel készült kromatogramja (Ph: Fenol, DMPH: dimetil-fenol belső standard)

A továbbiakban megvizsgáltuk az így kialakított GC-MS módszer analitikai teljesítőképességét jellemző fontosabb paramétereket.

A kalibrálás eredményeit az 1. táblázat foglalja össze. A táblázatban megadottnál nagyobb terjedelem vizsgálatának nincs gyakorlati jelentősége. Dimetil-fenol belső standard mellett a korrelációs koefficiens 0,99-et meghaladó értéke, valamint a kalibrációs diagram alapján az összefüggés a vizsgált tartományban lineárisnak tekinthető. Fenol-d₆ belső standard használatával a kalibrációs paraméterek lényeges javulása volt tapasztalható. A kalibrálás hibája koncentrációfüggő, ezért a feltüntetett átlagos érték, a SEC csak a kétféle belső standard összehasonlítására szolgáltat adatot.

1. táblázat: A kalibrálás jellemző adatai dimetil-fenol (DMPH) és fenol-d₆ (Ph-d₆) belső standarddal

Kalibrálás paraméterei	Belső standard	
	DMPH	Ph-d ₆
Tartomány [µg/kg]	0 – 1750	0 – 1750
Kalibrációs szintek száma	5	5
Kalibrálás hibája (SEC) [µg/kg]	92,2	12,7
Korrelációs koefficiens (r) [-]	0,9927	0,9998

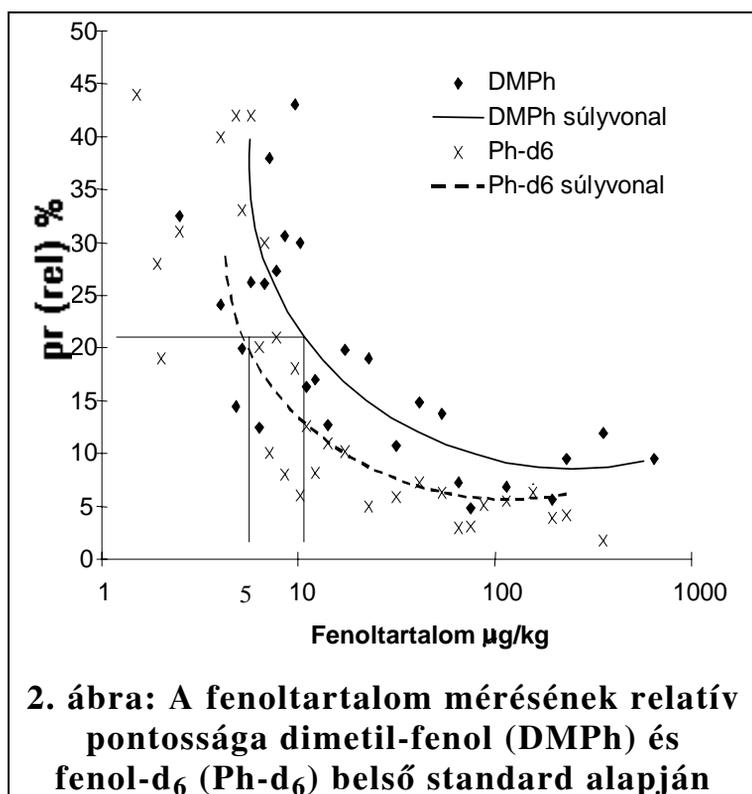
A visszanyerés adatait foglalja össze a 2. táblázat. Eszerint a dimetil-fenol belső standard figyelembevételével kapott visszanyerés csak 89 % körüli, míg deuterizált fenol belső standarddal 100 %-hoz közeli érték adódott. Az ellentmondás oka – itt nem részletezett mérési adatok szerint – a DMPH mintegy 110 %-os látszólagos visszanyerése, amely (belső standardként) a fenolra kapott visszanyerési értéket a fordított arányosság miatt csökkenti. A DMPH-többlet feltehetően a mézből átdesztillálódó egyéb komponensektől és a tömegspektrometriás fragmensektől ered. A táblázatban feltüntetett adatok felhasználásával a visszanyerési hiba mindkét belső standard esetén kompenzálható, a kisebb relatív szórások alapján azonban fenol-d₆-lal a kompenzálás pontosabb.

A mérés relatív pontosságát a 2. ábra mutatja be. Mint látható, dimetil-fenol standarddal értéke 100 µg/kg koncentráció fölött 10 %-nál kisebb, 100 és 10 µg/kg között fokozatosan, majd az alatt rohamosan nő. Hasonló lefutású – alacsonyabb értékekkel – a fenol-d₆ belső standarddal kapott görbe.

2. táblázat: Fenoltartalom visszanyerése (η) és relatív szórása (RSD) dimetil-fenol (DMPH) és fenol-d₆ (Ph-d₆) belső standard alapján

Hozzáadási szint [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Belső standard			
	DMPH		Ph-d ₆	
	η %	RSD %	η %	RSD %
14	80	18,7	105	10,2
77	90,2	7,9	102,5	2,04
450	89,7	6,7	102	1,7
1750	88,4	5,8	100,5	1,06

A 2. ábrából leolvasható a meghatározás határa is, amely dimetil-fenol belső standardnál 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, fenol-d₆ belső standardnál 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ értéknek adódott. A kimutatási határra kapott adatokat a 3. táblázat 3. oszlopa tartalmazza. A vak mérési



pontossága alapján számított érték nagyságrenddel nagyobb az alapvonalzajból származtatottnál. Ezért az előbbi limitálja a kimutatási határt, amelynek közelítő értéke DMPH belső standardnál 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Ph-d₆-nál 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mivel a mérési pontosság koncentrációfüggő, feltehető, hogy a desztillált vízből és egyéb vegyszerekből származó – vizsgálatainknál mintegy 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – fenolszennyezés csökkentésével a kimutatási határ tovább javít-

ható, elvileg a zajszint által meghatározott értékig.

Következtetések

A kidolgozott GC-MS módszer alkalmasnak bizonyult a méz fenoltartalmának meghatározására. A méréstartomány dimetil-fenol belső standarddal 10 – 1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$, fenol-d₆ belső standarddal 5 – 1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A számításoknál csak kismértékű visszanyerési korrekciót kell figyelembe venni.

3. táblázat: A kimutatási határ az alapvonal-zaj és a vak mérési pontossága alapján, valamint a vak értéke

Meghatározásalapja	Belsőstandard	Kimutatási határ [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Vak (átlag) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Alapvonal-zaj		0,45	
Vak mérési pontossága	DMPH	5,8	5,4
Vak mérési pontossága	Ph-d ₆	2,4	5,5

Az új módszer meghatározási határa – dimetil-fenol belső standard alkalmazása esetén – 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, amely fele az irodalomban található GC-FID és HPLC módszerek hasonló adatának. A kimutatási határ 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A mérési szórás 100 – 1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tartományban 10 % alatt van. Ezek a paraméterek a kereskedelemben és az élelmiszeriparban jelentkező rutinanalitikai igényeket kielégítik.

A módszer fenol-d₆ belső standardot alkalmazó változatával a várakozásnak megfelelően jelentősen javul az összes analitikai paraméter. A fenoltartalom meghatározási határa 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, kimutatási határa 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ugyancsak javul a mérés pontossága is. Alkalmazása a standard magas ára miatt elsősorban igényesebb vizsgálatoknál és a kutatásban javasolható.

Lehetőség látszik a kimutatási határ további csökkentésére is. Eddigi vizsgálataink alapján azonban a mézek természetes fenoltartalma 5–10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ körüli érték, ezért a határ csökkentése nem tűnik szükségesnek.

Irodalom

1. Kwan, S. és Sporns, P.: Analysis of bee repellents in Honey, J. Apicult. Res. **27** (1988), 3 162-168
2. Daharu, P. A., Sporns, P.: Residue levels and sensory evaluation of the bee repellent, phenol, found in honey, Can. Inst. Food Sci. Technol. J. **18** (1985)
3. Beckh, G., Lüllmann, C.: Phenol – ein natürlicher Bestandteil neuseelandischen Waldhonigs? Dtsch. Lebensm. Rdsch. **94** (1998) 5, 149-152
4. Sporns, P.: High pressure liquid chromatographic determination of phenol in honey, J. Off. Anal. Chem. **64** (1981) 2, 337-339
5. Daharu, P. A., Sporns, P.: Evaluation of analytical methods for the determination of residues of the bee repellent, phenol, in honey and beeswax, J. Agric. Food Chem. **32** (1984) 108
6. Use solid phase extraction to isolate phenols from aqueous samples, SUPELCO Application, Note 32