

REFERENZSTANDARD FÜR ANALYSEMETHODEN ZUR TPO-MESSUNG

Einleitung

Bislang gibt es keinen Referenzstandard für den TPO (Sauerstoffgesamtgehalt), obwohl Methoden und Geräte zur Messung dieses für Brauereien wichtigen Parameters breite Anwendung finden. Der TPO gehört derzeit zu den wenigen Parametern der Bieranalytik, für die es keinen Standard gibt. Im Folgenden wird eine neue Methode zum Erstellen eines Standards für den TPO beschrieben und mit anderen Methoden verglichen. Mithilfe dieses neuen Standards wird dann die TPO-Messung mittels bestehender Methoden bewertet.

Sauerstoff gilt hinsichtlich des Frischeprofils von abgefülltem Bier als wichtiger Parameter.

Eine 1984 von K. Uhlig und C. Vilachá publizierte Arbeit ist aus mehreren Gründen als Durchbruch anzusehen:

- Wechsel von der Luft- zur Sauerstoffmessung
- Wechsel von der Nasschemie zur Analyse mit modernen Geräten
- Absenken der unteren Nachweisgrenze auf wenige ppb verglichen mit zuvor etwa 1 mL Luft (entsprechend 270 ppb TPO)

25 Jahre später erfolgte mit der Einführung von Analysatoren speziell für die TPO-Messung der nächste bedeutende Schritt.

Die Luftinjektion erwies sich als die Methode mit den besten Ergebnissen. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode wurde in Kombination mit dem neuen Hach Orbisphere Analysator 6110 nachgewiesen.

Was versteht man unter TPO?

Abbildung 1 zeigt eine 330 mL Dose bei 8 °C nach der Äquilibration. Abbildung 2 zeigt eine Dose direkt nach dem Abfüllen. Die gelben und blauen Bereiche zeigen das Volumen von Bier und Kopfraum (Headspace, HS) mit dem jeweiligen O₂-Gehalt. Die Berechnung für Abbildung 1 erfolgte mit dem Z-Faktor. Der Anteil der Fläche entspricht jeweils dem Verhältnis von Volumen und Sauerstoffgehalt.

Das Paradox beim TPO besteht darin, dass der Sauerstoff sich überwiegend in dem Teil der Verpackung mit dem kleinsten Volumen befindet, nämlich dem Kopfraum.

Dieses Phänomen lässt sich zunächst durch die physikalischen Eigenschaften von Sauerstoff erklären. Sauerstoff ist 30 Mal weniger löslich als CO₂ und verbleibt in der Gasphase, wobei die Konzentration von der Temperatur der Flüssigkeit und den Volumenverhältnissen abhängt. Dies ist in Abbildung 1 dargestellt.

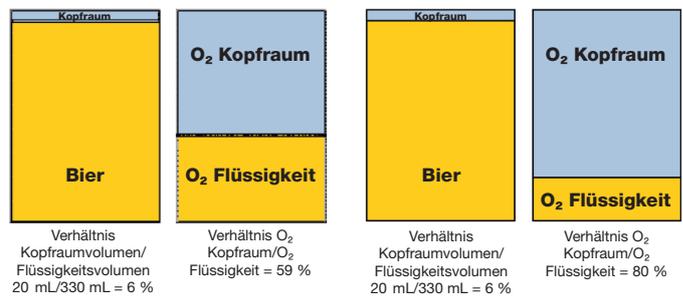


Abbildung 1: Dose im Äquilibrium, Kopfraumvolumen 20 mL

Abbildung 2: Dose nach der Befüllung, kein Äquilibrium

Änderungen des Kopfraumvolumens wirken sich wesentlich auf den TPO aus: Eine Zunahme des Kopfraumvolumens um 10 mL bewirkt eine Zunahme des TPO um 9 %.

Anforderungen an einen TPO-Standard

Die Eignung als neue Standardreferenz für die TPO-Messung wurde anhand der folgenden Kriterien beurteilt:

- Präzision (Richtigkeit)
- Wiederholbarkeit
- Reproduzierbarkeit
- Bereich

Einfachheit der Anwendung (kann überall eingesetzt werden, Labor- und Anlagenbereich, bedienerunabhängig)

Prinzipien der untersuchten TPO-Standards

Hauptziel des TPO-Standards ist es, eine bekannte Menge an Sauerstoff in einer Verpackung sowie eine bekannte Unsicherheit zu erhalten.

Viele potenzielle Methoden basieren auf dem Einbringen einer bekannten oder unbekannt Menge an Luft in den Kopfraum der Verpackung. In der chemischen Analyse wird diese Methode auch als SAM (Standardadditionsmethode) bezeichnet.

Vor der Luftinjektion wird eine Charge von Leerproben (altes Bier mit wenig Sauerstoff) analysiert. Der erwartete Endwert ist die Summe aus der TPO-Konzentration der Leerproben und der hinzugefügten Luft.

Mögliche Lösungen für TPO-Standards

Spülung des Kopfraums mit Luft

Die Flaschen werden in einer Kammer mit kontrollierter, sauerstoffarmer Atmosphäre vorbereitet.

Richtigkeit und Wiederholbarkeit sind bei dieser Methode gut, es sind jedoch besondere Geräte und lange Spülzeiten erforderlich. Dies wirkt sich negativ auf die Einfachheit der Anwendung aus.

Testdosen mit Wasser

An einem Einfüllstutzen mit bekannten Eigenschaften bezüglich der Aufnahme von Luft wird eine Charge von Dosen mit kohlenstoffhaltigem Wasser befüllt. Es werden Messungen an einem Teil der Charge durchgeführt, und die statistische Verteilung des TPO wird ermittelt.

Diese Methode ist einfach anzuwenden, die Richtigkeit kann jedoch nicht ermittelt werden.

Die Methode wurde zunächst 2004 von der ASBC untersucht und dann abgelehnt.

Luftinjektion in den Schaum bei geöffneter Flasche

Eine Flasche mit pasteurisiertem Bier wird vorsichtig geöffnet. Mit einem festen Stab wird seitlich leicht an die Flasche geklopft, sodass reichlich Schaum aus der Flasche austritt. Der Inhalt einer luftgefüllten Spritze wird in den Schaum eingespritzt. Unmittelbar darauf wird die Flasche wieder mit einem Kronkorken verschlossen.

Auch diese Methode wurde von einem Unterausschuss der ASBC untersucht und 2007 nach einer laborübergreifenden Prüfung abgelehnt. Bezüglich der Wiederholbarkeit und der Unterschiede von Mitarbeiter zu Mitarbeiter waren die Ergebnisse nicht gut genug.

Luftinjektion in den Kopfraum

Hierbei handelt es sich um eine Variante der oben beschriebenen Methode der ASBC. Bei dieser Methode wird der Kronkorken durch einen anderen ersetzt, der ein Septum enthält. Die Methode erbrachte bezüglich der Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit Ergebnisse mit einem Verhältnis von Standardabweichung zu Mittelwert, das 28 % betrug. Es muss ein besonderer Kronkorken angefertigt werden. Bei der Standardmethode für die TPO-Analyse ergab sich eine Richtigkeit von 80 %, woraus sich für den Fehler ein Wert von 20 % ergibt.

Die neue Methode: Luftinjektion in Dosen

Eine Variante dieser Methode wurde 2007 im Fazit des Abschlussberichts des ASBC-Unterausschusses erwähnt. Eine bekannte Menge an Luft wird in eine Aluminiumdose eingespritzt. Zuvor wird an der Einstichstelle ein Gummiseptum angebracht. Dieses wird durch eine große Schlauchklemme in Position gehalten. Siehe Abbildung 3.

Die Methode wird seit 4 Jahren angewendet und liefert gute Ergebnisse.

Die Probenvorbereitung ist einfach, und mit dieser Methode lässt sich Luft in fast beliebiger Menge in die Dose einspritzen. Sie bietet daher eine Lösung hinsichtlich Richtigkeit, Linearität und Wiederholbarkeit.

Es werden Standarddosen mit altem Bier verwendet, und sowohl die für die Vorbereitung benötigte Zeit als auch die Einfachheit der Anwendung sind akzeptabel.



Abbildung 3: Luftinjektion in eine Dose

Bewertung der Methoden

Tabelle 1 zeigt die Bewertung sämtlicher Methoden bezüglich verschiedener Kriterien.

Kriterien	Testdosen mit Wasser	Spülung des Kopfraums mit Luft	Luftinjektion in den Schaum	Luftinjektion in den Kopfraum	Luftinjektion in Dosen
Präzision (Richtigkeit)	●	●	●	●	●
Wiederholbarkeit	●	●	●	●	●
Reproduzierbarkeit	●	●	●	●	●
Bereich	○	●	●	●	●
Einfachheit der Anwendung	●	○	●	●	●

Tabelle 1: Vergleich verschiedener TPO-Standards

Die Luftinjektionsmethode in Anwendung mit dem Orbisphere TPO-Analysator 6110

Der Orbisphere 6110 misst O₂, CO₂ und Kopfraumvolumen, wobei der Gasgehalt sowohl im Kopfraum als auch in der Flüssigkeit bestimmt wird. Das System verwendet eine patentierte Technik zur Gasprobenentnahme. Siehe Abbildung 4.

Die Wiederholbarkeit der Probenmessung nach der Luftinjektion mit einem Analysator, demselben Bediener und bei durchschnittlich 170 ppb lag zwischen ±20 ppb und ±2 ppb. Letzterer Wert wurde von qualifizierten Bedienern erreicht.

Das Wiederherstellungsverhältnis wird als Standardparameter bei der Validierung verwendet. Die Wiederherstellung ist das Verhältnis von gemessenem O₂ zu eingespritztem O₂ und beträgt idealerweise 100 %. Siehe Abbildung 5.

Der gesamte Messvorgang ist automatisiert. Die Sensoren kommen nicht mit der Flüssigkeit in Kontakt, was den Wartungsbedarf minimiert und für einen konsistenten Betrieb mit zuverlässigen Ergebnissen sorgt.

Für die durchschnittliche Wiederherstellung ergab sich ein hervorragender Wert von 99,2 % (159 ppb) mit einer Standardabweichung von nur ±5 %.

Bei einem Konfidenzintervall von 95 % lagen die Messergebnisse zwischen 144 ppb und 176 ppb.

Die Validierung der Linearität erfolgt häufig bei der Inbetriebnahme. Abbildung 6 zeigt ein Beispiel mit einem Bestimmtheitsmaß R² von 0,99. Es macht die hervorragende Linearität der Luftinjektionsmethode und des Analysators ersichtlich.



Abbildung 4: Orbisphere Analysator 6110

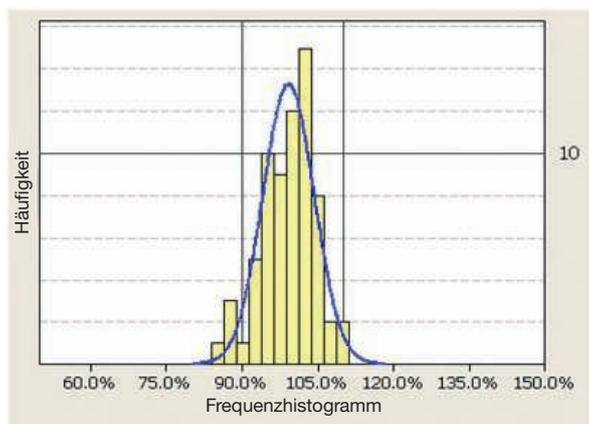


Abbildung 5: Histogramm für die Wiederherstellung beim Orbisphere Analysator 6110

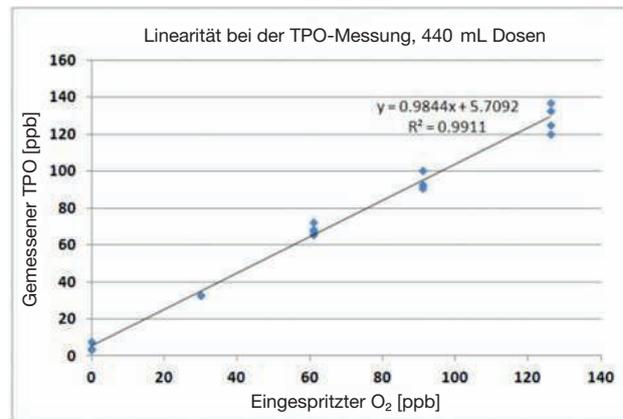


Abbildung 6: Validierung im Feld auf Linearität bei der Luftinjektion in Dosen

Vorteile der neuen TPO-Referenz

Bislang stehen keine Daten aus kollaborativen Untersuchungen zur Verfügung, aber Hunderte an verschiedenen Standorten durchgeführte Luftinjektionen haben gezeigt, dass diese Methode bei jedem TPO-Analysator und jeder TPO-Methode einen höheren Konfidenzgrad liefert. Weitere Vorteile der neuen TPO-Referenz sind:

- Feststellung der Unsicherheit bei installierten Analysatoren und Verbesserung der Qualitätskontrolle.
- Bewertung der Laborleistung durch kollaborative und vergleichende Studien.
- Bessere Kontrolle der nicht spezifikationskonformen Produktion. Es wird möglich, die Produktkonformität durch einen Verwerfungsbereich anstelle der heute verbreiteten festen Einzelgrenze zu kontrollieren.

Die Standardmethode für die TPO-Analyse und ihre Grenzen

Das Vorhandensein einer belastbaren Referenz für den TPO ermöglicht die Leistungsbewertung der Standardmethode für die TPO-Analyse.

Unterschiede zwischen der Standardmethode für die TPO-Analyse und der Methode bei Verwendung des 6110 fanden sich sowohl im Labor als auch in verschiedenen Anlagen. Die auf der Luftinjektion basierende Referenz bestätigte jedoch, dass der 6110 das richtige Ergebnis liefert. Die Standardmethode zur TPO-Messung basiert auf der Annahme, dass nach 5 Minuten eine vollständige Äquilibrierung in der Verpackung erfolgt ist. Das ist nicht immer der Fall, und für die Lücke zwischen Theorie und Praxis gibt es unter anderem folgende wesentliche Gründe:

- Flaschenwender werden durch Horizontalschüttler ersetzt.
- Die Äquilibrierungszeit ist bei Flaschen und Dosen verschieden.
- Der Schaum in der Verpackung reduziert die Bildung von Verwirbelungen.
- Matrixeffekte, mit oder ohne Sauerstoffbinder, wirken sich mit der Zeit auf den gelösten Sauerstoff aus.

Abschließende Diskussion

Die auf der Luftinjektion in Dosen basierende Referenz bedeutet im Vergleich zu anderen Methoden einen erheblichen Fortschritt. Ihre Stärken liegen in der überragenden Leistung sowie der Einfachheit der Verwendung und Anwendung.

Ein weiterer Vorteil der Luftinjektionsmethode besteht darin, dass sie den Kontaminationsvorgang beim Abfüllen nachahmt, wobei der Sauerstoff größtenteils in den Kopfraum gelangt. Die Validierung der TPO-Methode erfolgt demnach anhand einer Verpackung, bei der sehr ähnliche Bedingungen vorliegen wie nach dem Abfüllen.

Zudem hat die Luftinjektionsmethode Grenzen der Standardmethode für die TPO-Analyse aufgezeigt, bei der die Messung des gelösten Sauerstoffs nach einer angenommenen vollständigen Äquilibrierung häufig in zu niedrigen TPO-Werten resultiert. Der Grund liegt in der Schwierigkeit, den richtigen Sauerstofftransfer vom Kopfraum in die Flüssigkeit zu erhalten; es wird fast nie ein vollständiges Äquilibrium erreicht. Da sich 60 bis 90 % des TPO im Kopfraum befinden, bringt die Messung des in der Flüssigkeit vorliegenden geringsten Sauerstoffgehalts bei Anwendung des Z-Faktors eine höhere Unsicherheit mit sich.

Mithilfe des Orbisphere 6110, bei dem keine Äquilibrierung erforderlich ist, konnte die Leistung der auf der Luftinjektion basierenden Referenz bestimmt werden.

Schlussendlich wird die Verwendung einer belastbaren Standardreferenz für den TPO auch dazu beitragen, dass statt der jetzigen, mit der Standardmethode arbeitenden Geräte neue TPO-Analysatoren verwendet werden.



www.hach.com