

## Význam chmelové třísloviny a nová modifikace kolorimetrického stanovení

MILENA KOTRLÁ - HAPALOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha,  
JIRÍ SOUDEK, Československá akademie zemědělských věd, Výzkumný ústav chmelářský, Žatec

663.423:547.98:545.81

Úloha tříslovin v pivovarství není dosud zcela objasněna. Názory na jejich uplatnění se značně měnily. Většina starších autorů [1, 19, 20] považuje třísloviny za složky, které se nepříznivě uplatňují při vytváření chuti a barvy piva nebo při tvorbě komplexů s ostatními extraktivními složkami mladiny. Výsledky novějších prací [15] však ukázaly, že vliv tříslovin, zejména chmelové třísloviny až do určité optimální koncentrace v roztoku, lze právě s ohledem na zmíněné faktory pokládat za velmi příznivý.

K řešení sporných a často výrobně velmi důležitých otázek o účinku tříslovin v pivovarském výrobním procesu chybějí dosud základní nutné znalosti o molekulární struktuře těchto látek. Třísloviny patří k nejméně prozkoumaným skupinám organických sloučenin, které se vesměs definují pouze podle svých specifických skupinových reakcí. Podle základního rozdělení *Freudenbergova* [4] se třísloviny rozdělují do dvou skupin:

1. třísloviny gallové,
2. třísloviny katechové.

V pivovarství se setkáváme se zástupci obou skupin. Třísloviny sladové (ječné) patří k typu gallovému, třísloviny chmelové k typu katechovému.

Kromě v pivovarství, má chmelová tříslovina význam jako jeden z ukazatelů jakosti při oceňování chmele. Bylo prokázáno [10], že je v těsném genetickém vztahu k ostatním účinným složkám chmele, zvláště k hořkým látkám, s nimiž ve zralé hlávce vytváří provenienčně charakteristický poměr.

Nedávné práce [5, 11] na tomto úseku chemie chmele přinesly nové poznatky o složení chmelové třísloviny. Roztřepáváním a rozdělovací chromatografií byla z chmelové třísloviny izolována řada sloučenin typu flavonového a leukoanthocyanového, jejichž strukturální podoba s katechinů způsobuje analogii fyzikálně-chemických a chemických vlastností a vedla pravděpodobně k dosavadnímu zařazení chmelové třísloviny. Od rozřešení struktury chmelové třísloviny očekáváme právem obdobnou kvalitativní složitost, jaká byla nalezena u hořkých látek chmelových [21]. Množství chmelových tříslovin, které ve chmelech našli různí autoři [13, 17, 18] kolísá od 1 % do 8 %. Tyto značné rozdíly způsobuje rozdílný původ zkoušených chmelů a také to, že některými metodami se stanoví pouze nezměněná původní tříslovina a některými opět tříslovina spolu se svým kondenzačním produktem flobafenem, který má obdobné chemické reakce. Prokázaný význam chmelové třísloviny jako kritéria jakosti a jako výrobně důležitého faktoru si vyžádal úměrně zvýšenou pozornost analytiků. Pro posuzování jakosti chmelů a pro jejich ocenění pivovarsko-technologické dostačuje sumární stano-

vení chmelových tříslovin a jejich oxidačních a kondenzačních produktů na základě některé ze skupinových reakcí.

### Pokusná část

Kvantitativní stanovení chmelových tříslovin, pro něž byla vypracována celá řada metod [2, 3, 6, 7, 8, 12, 16], jsou založena převážně:

1. na oxidační schopnosti chmelové třísloviny,
2. na schopnosti chmelové třísloviny srážet se z roztoků působením alkaloidů a bílkovin,
3. na barevných reakcích chmelové třísloviny se solemi železitými.

Po předběžném přezkoušení všech známých způsobů jsme srovnali a zhodnotili čtyři základní metody:

1. Vážkovou metodu *Chapmannovu* [2], při níž se stanoví veškeré třísloviny (včetně flobafenů) srážením síranem cinchoninu.
2. *Hartongovu* modifikaci původní metody *Löwenthalovy* [6], při níž se stanoví množství volné chmelové třísloviny v roztoku před a po vytřepání kaseinem.
3. *Stádníkovu* [16] metodu titrační, která stanoví volné chmelové třísloviny z rozdílu spotřeby jodového roztoku při titraci vodného extraktu třísloviny před a po vytřepání hydroxydem železitým.
4. *De Clerck - Descampsovu - Vandermeerschovu* [3] metodu kolorimetrickou.

Stanovení byla provedena u vzorků chmelů různé proveniencce.

Stanovení chmelové třísloviny

Označení chmele:	Množství chmelové třísloviny v % stanovené metodou podle			
	Chapmanna	Hartonga	Stádníka	De Clercka
Žatec I	3,7	1,4	1,6	4,0
Žatec II	3,7	1,5	1,5	3,8
Ústěk	2,7	1,1	1,2	2,8
Tršice	2,6	1,1	1,2	2,4
Roudnice	3,3	1,4	1,4	3,4
Anglie	1,2	0,5	0,6	1,3
Alsasko	2,0	0,9	0,9	2,2
Holledavsko	2,4	1,1	1,1	2,5
Tettnang	2,4	1,1	0,9	2,3
Hersbruck	2,9	1,2	1,1	2,9
Poppering	1,4	0,6	0,6	1,4
Amerika I	2,4	1,1	1,1	2,5
Amerika II	2,4	1,1	1,1	2,6

Tabulka 1

Chapmannovou a De Clerckovou metodou se došlo ke shodným číslům, která podávají obraz o veškerém množství chmelové třísloviny v roztoku. Metodou Hartongovou a Stádníkovou byly nalezeny



hodnoty mnohem nižší. Metody jsou založeny na výpočtu množství chmelové třísloviny z rozdílu spotřeby oxydačního činidla před a po vysrážení chmelové třísloviny z výluhu (kaseinem nebo hydroxydem železitým). Předpokládáme, že obě tyto látky mají specifický účinek pouze na volnou tříslovinu chmelovou, t. j. na tříslovinu v neoxydované formě. Stádníkovou metodou jsme stanovili tříslovinu v čerstvém chmelu žateckém, roudnickém a úštěckém během zrání hlávek [14] zjistili jsme průměrně 3 % třísloviny v čerstvém zralém chmelu. Přesto, že je to méně, než bylo nalezeno při obdobném pokusu podle metody De Clerckovy [10], je to podstatně vyšší množství než jaké bylo nalezeno u chmelů téže provenience po několikaměsíčním uskladnění.

Po zkušenostech s technikou jednotlivých metod se nám pro stanovení veškerých tříslovin jevila jako nejvhodnější metoda De Clerckova. Její jednoduchost umožňuje seriovou analýsu s vyhovující přesností a reprodukovatelností. Hodnota veškerých tříselných látek (včetně flobafenů) také lépe vyjadřuje očekávané reakce chmele než pouhé stanovení volné chmelové třísloviny. Tato metoda byla proto zařazena do JAM [9]. Chapmanova metoda, která poskytuje shodné výsledky, je zdlouhavá a těžkopádná a vyžaduje značnou zkušenost analytickou. Výhodu při stanovení volné chmelové třísloviny má metoda Stádníková, jejíž přesně znatelný bod ekvivalence umožňuje dokonalou reprodukovatelnost, zatím co barevný přechod u obdobné metody Hartongovy probíhá v poměrně širokém rozmezí a vyžaduje zkušeného analytika.

Kolorimetrická metoda De Clerckova klade při seriové práci značné nároky na zrakový vjem analytika a hledal se proto způsob, který by nahradil subjektivní posuzování. Pro kolorimetrické stanovení koncentrace tříselných extraktů byl vypracován vhodný postup a na základě faktoru tříselného extraktu sestaven vzorec pro zjištění procenta veškerých tříselných sloučenin v roztoku.

Princip De Clerckovy metody je založen na měření intensity zbarvení taninu a chmelové třísloviny s choridem železitým v alkalickém prostředí při pH 10. Pro objektivní stanovení chmelové třísloviny bylo nutno znát tyto předpoklady:

1. Vodný roztok taninu poskytuje s chloridem železitým při pH 10 2,4krát intenzivnější zbarvení než roztok chmelové třísloviny stejné koncentrace (10 mg% taninu poskytne stejné zbarvení jako 24 mg% chmelové třísloviny).
2. Pro měření bylo možno použít vztahů, platných pro absolutní kolorimetrii (t. j. kolorimetrii bez srovnávacích roztoků).

$$m_{\text{ext}} = \frac{A}{d} = a \cdot c$$

kde:

$m_{\text{ext}}$  — modul extinkce  
 $A$  — extinkce

$d$  — tloušťka měřené vrstvy  
 $a$  — extinkční koeficient  
 $c$  — koncentrace

Při tloušťce vrstvy barevného roztoku 1 cm je  $A = m_{\text{ext}}$  z toho:

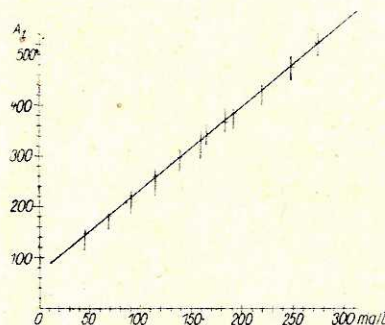
$$c_1 : m_1 = c_2 : m_2$$

$$\frac{c_1}{m_1} = \frac{c_2}{m_2} = K$$

Stanovíme-li konstantu  $K$  srovnávacího roztoku, lze vypočítat koncentraci zkoušeného roztoku ze vztahu:

$$c = m_{\text{ext}} \cdot K$$

3. Kalibrační křivka závislosti extinkce na koncentraci v rozsahu od 25–150 mg/l (obr. 1) má charakter přímky a vyhovuje Lambert-Beerovu zákonu.



Obr. 1 — Závislost extinkce na koncentraci (Vodný roztok taninu)

Výpočet  $K$  při použití 10 mg % taninového roztoku byl proveden podle vztahu

$$K = \frac{c \cdot d}{A_t} = \frac{c}{m_t}$$

kde:

$K$  — konstanta,  
 $c$  — 10 mg% taninu, t. j. 24 mg% chmelové třísloviny,  
 $d$  — tloušťka měřené vrstvy,  
 $A_t$  — extinkce taninu,  
 $m_t$  — modul extinkce taninu.

Pak byla měřena extinkce chmelových tříslovin  $A_{\text{tr}}$  tak, že vyrovnávacím roztokem byl výchozí chmelový roztok, alkalizovaný na pH 10. Tak byla získána  $A_{\text{tr}}$  porovnatelná s extinkcí taninu známé koncentrace taninového standardu. Nalezená extinkce tříslovin byla dosazena do vztahu:

$$c = K \cdot \frac{A_{\text{tr}}}{p}$$

Procentové množství tříslovin je pak dáno součinem zjištěné koncentrace ( $c$ ) a faktoru ( $f$ ) 0,25, vyplývajícího z použité navážky chmele a ředění chmelového extraktu:

$$\text{množství chmelové třísloviny v \%} = f \cdot c$$

Protože  $f$  je konstantní, mohl být pojat do konstanty  $K$  a získána tak konstanta pro výpočet chmelových tříslovin ( $K_{\text{tr}}$ )



$$K_{tf} = \frac{c \cdot f \cdot d}{A_t} \quad \text{Po numerickém dosazení:}$$

$$K_{tf} = \frac{24 \cdot 0,25 \cdot d}{A_t} = \frac{6 \cdot d}{A_t}$$

Konečný výraz pro stanovení procenta chmelových tříslovin je tedy dán vztahem:

$$\text{množství chmelové třísloviny v \%} = K_{tf} \cdot m_{tf}$$

Kolorimetrická modifikace se s původní metodou De Clerckovou srovnávala u chmelů s různým obsahem tříslovin, takže k vizuálnímu stanovení byly nutné různé koncentrace srovnávacího roztoku. Tím se zároveň prověřila použitelnost fotokolorimetrie v širokém rozsahu. Přehled výsledků porovnání je v tabulce 2.

Srovnání výsledků, dosažených vizuálně-kolorimetrickým a fotokolorimetrickým stanovením třísloviny

Označení vzorku	Koncentrace použitého roztoku taninu mg/l	Množství chmelové třísloviny stanovené		Rozdíl obou stanovení %
		vizuálně kolorimetricky %	fotokolorimetricky %	
1	100	4,37	4,35	-0,02
2	100	5,05	4,98	-0,07
3	100	4,50	4,45	-0,05
4	100	4,60	4,67	+0,07
5	100	5,15	5,05	-0,10
6	75	3,70	3,74	+0,04
7	75	3,24	3,27	+0,03
8	75	3,09	3,20	+0,11
9	50	2,08	2,17	+0,09
10	50	1,99	1,95	-0,04

Tabulka 2

U De Clerckova stanovení byla koncentrace roztoku taninu 50, 75 a 100 mg/l. Měřilo se na kolorimetru čs. výroby, bez filtru.

Přesnost metody je  $\pm 0,1$  %, tedy v mezích spolehlivosti stanovené jednotlivými analytickými metodami. Kromě jednoduchosti a objektivity při měření má navrhovaný způsob tu přednost, že používá jednotné koncentrace taninového roztoku pro stanovení množství chmelové třísloviny v celém procentovém rozsahu mezi chmelovými tříslovinami chudými a bohatými, zatím co u De Clerckova způsobu je rozsah měření omezen maximálním přírůbkem ředící vody k taninovému standardu. Tím se analýsa podstatně zkracuje. Stejně dobrých výsledků bylo v další práci dosaženo s kolorimetrem různých značek (Lange, Siegrist, Pulfrich s filtrem S 53).

### Metodika

5,00 g rozemletého chmele se nasype do odměrné baňky na 250 ml a rozmíchá se asi ve 200 ml vroucí vody. Baňka se za občasných míchání obsahu udržuje 2 hodiny ve vroucí lázni. Po ochlazení se obsah baňky doplní na 250 ml a přidá se ještě (jako náhrada za objem chmele) 2,5 ml vody. Veškerý obsah baňky se dobře promíchá a sfiltruje suchým skládaným filtrem. 50 ml filtrátu se odpipetuje do odměrné baňky na 250 ml a doplní vodou ke znač-

ce. 1 litr tohoto roztoku odpovídá 4 g chmele. Během extrakce chmele se připraví čerstvý standardní roztok taninu (10 mg %). Tanin je nutno uchovávat v exikátoru. K 10,0 ml taninového roztoku se přidává po kapkách 15 % roztok uhličitany sodného, až do dosažení pH 10 (kontroluje se kapkovou metodou s 0,1 % roztokem thymolftaleinu do temné modrého zbarvení). Potom se přidá 0,5 ml 1 % roztoku  $\text{FeCl}_3$ , dokonale se promíchá, vyčká se 3 minuty a měří se  $A_t$  proti vodě. Objemová korekce (na ředění roztokem  $\text{FeCl}_3$  a roztokem sody) se provede podle vztahu:

$$A_t = A_{ot} \frac{10 + (a + b)}{10}$$

v němž:

$A_{ot}$  — naměřená extinkce taninového roztoku

$a$  — množství 1 % roztoku  $\text{FeCl}_3$  v ml

$b$  — množství 15 % roztoku sody v ml

(1 kapka se rovná asi 0,05 ml).

Z korigované hodnoty se vypočte  $K_{tf}$ :

$$K_{tf} = \frac{6 \cdot d}{A_t}$$

Hodnotu  $K_{tf}$ , stanovenou pro každý přístroj, lze používat během celého průběhu měření, stačí ji pouze občas překontrolovat. Obdobně se postupuje při stanovení  $A_{tf}$ . Ze zředěného roztoku chmelové třísloviny se odpipetuje 10,0 ml, alkalizuje se stejně jako u taninového roztoku a přidá se 0,5 ml roztoku  $\text{FeCl}_3$ .  $A_{tf}$  se stanoví proti alkalizovanému roztoku chmelové třísloviny bez přidání  $\text{FeCl}_3$  a koriguje se stejně jako  $A_t$  podle vztahu:

$$A_{tf} = A_{otf} \frac{10 + (a + b)}{10}$$

v němž:

$A_{otf}$  — naměřená extinkce tříselného roztoku

$a$  — množství 1 % roztoku  $\text{FeCl}_3$  v ml

$b$  — množství 15 % roztoku sody v ml

Hodnota  $A_{tf}$  se dosadí do vzorce pro výpočet procenta chmelové třísloviny:

množství chmelové třísloviny v % =

$$K_{tf} \cdot m_{tf} = K_{tf} \cdot \frac{A_{tf}}{d}$$

Poznámka:

Pro seriovou práci lze zanedbat ředění způsobené roztokem uhličitany sodného (které zpravidla nepřesahuje u roztoku taninu 4 kapky, t. j. 0,2 ml, a u chmelového výluhu 6 kapek, t. j. 0,3 ml), a používat nádoby speciálně kalibrované, s přihlédnutím k objemové korekci na přidané množství roztoku  $\text{FeCl}_3$ . V tom případě se 50,0 ml filtrátu chmelového výluhu doplní vodou na 237,5 ml. Standardní roztok taninu obsahuje analogicky 100 mg taninu/950 ml. K jednotlivým stanovením se odměřuje pouze 9,5 ml roztoku.



## Diskuse:

Chmelové tříslovině se do nedávné doby věnovala podstatně menší pozornost než hořkým chmelovým látkám. V současné době se však stále více uplatňuje názor, že tato složka, stejně jako chmelová silice, má svou pivovarskou cenu, těsně spojenou s jakostí hořkých chmelových látek. Sovětští chmelařští výzkumníci [22] na př. sledují reakce všech účinných složek chmele komplexně, jako vzájemně souvisící reakce vícemocných fenolů.

Při srovnání metodik na stanovení chmelové třísloviny, s přihlédnutím k uplatnění této složky v technologickém postupu při výrobě piva, se prokázala nutnost používat metody, která stanoví veškeré tříselné látky obsažené ve chmelové hlávce, tedy nezoxydované třísloviny i flobafeny. Tento požadavek splňuje nejlépe kolorimetrická metoda De Clerckova, z jejíž výsledků vyplynou mnohem důrazněji podstatné a zásadně důležité rozdíly v obsahu veškerých tříslovin u chmelů velmi a méně jakostních než u metod na stanovení pouze volné chmelové třísloviny (viz tabulka 1). Právě tyto velké rozdíly a skutečnost, že se česká piva, vařená z našich chmelů, vyznačují rázovitou chutí a řízností, vedly k řešení otázky významu a uplatnění chmelové třísloviny při chmelovaru a v dalších fázích výroby piva. Již to potvrzuje cenu optimálního obsahu chmelové třísloviny.

Vypracovaná modifikace kolorimetrické metody De Clerckovy zjednodušuje a zrychluje analýsu a dosahuje se přesných a reprodukovatelných výsledků.

## Souhrn:

Při soustavném sledování všech cenných složek chmele byly přezkoušeny analytické metody na stanovení chmelové třísloviny. Konstatovalo se, že s hlediska pracovní techniky, dosažitelné přesnosti a požadavku stanovení všech tříselných složek chmele nejlépe vyhovuje kolorimetrická metoda De Clerckova.

Aby se zpřesnilo a urychlilo seriové stanovení bez zrakové únavy analytika, byla vypracována objektivní modifikace této metody, založená na principech absolutní kolorimetrie.

## Выводы

При систематическом исследовании всех ценных составных частей хмеля были проверены аналитические методы определения дубильных веществ хмеля. Было установлено, что с точки зрения практики работы, достижимой точности и требования определения всех дубильных составных частей хмеля лучше всего удовлетворяет колориметрический метод по Де Клерку.

С целью уточнить и ускорить серийные определения без напряжения зрения, модификация этого метода основана на принципах абсолютной колориметрии.

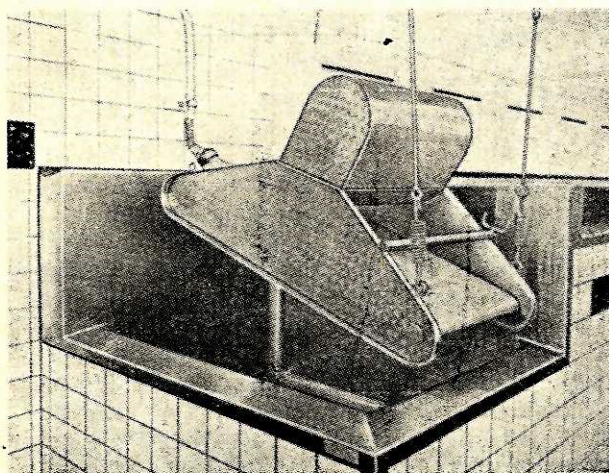
## Zusammenfassung

Im Rahmen der systematischen Verfolgung aller wertvollen Hopfenbestandteile wurden die analytischen Methoden zur Hopfengerbstoff-Bestimmung überprüft. Es ist festgestellt worden, daß vom Standpunkt der Arbeitstechnik, der erreichbaren Genauigkeit und der Forderung, alle Gerbstoffbestandteile des Hopfens zu bestimmen, die kolorimetrische Methode De Clerks am besten entspricht.

Auf Grund der Prinzipie der absoluten Kolorimetrie wurde eine objektive Modifikation der erwähnten Methode ausgearbeitet, um die Serienbestimmungen zu beschleunigen, ihre Präzision zu erhöhen und die Ermüdung der Sehkraft des Analytikers auszuschalten.

## Literatura

- [1] BILGRAM H., Wo. Br., 46 (1929) 137
- [2] CHAPMAN A. C., J. Inst. Brew. 13 (1907) 360
- [3] DE CLERCK J., DESCAMPS A., VANDERMEERSCH E., Bull. Anc. Et. Brasserie Louvain 68 (1947) 43
- [4] FREUDENBERG K., Handb. der Pflanzenanalyse, Wien, 1932, III. Band, 2. Teil, 344
- [5] HARRIS G., J. Inst. Brew. 62 (1956) 390
- [6] HARTONG D. B., Wo. Br. 46 (1929) 543
- [7] HAYDUCK M., Wo. Br., 11 (1894) 409
- [8] KOKOSIŃSKI C., Wo. Br. 8 (1891) 60
- [9] Jednotné analytické metody pro průmysl potravinářský, Pivo, dosud nevydáno
- [10] KOTRLÁ - HAPALOVÁ M., VANČURA M., Průmysl potravin 5 [1954] 97
- [11] LEBRETON F., Le petit J. du Brasseur 65 (1957) 253
- [12] LING A., NANJİ D. R., Wo. Br. 38 (1921) 64
- [13] LUERS H., Die wiss. Grundlagen von Mälzerei und Brauerei, Nürnberg, 1950, 78
- [14] SALAC V., HAPALOVÁ M., Průmysl potravin 2 (1951) 133
- [15] SALAC V., KOTRLÁ - HAPALOVÁ M., VANČURA M., Brauwiss. 7 (1954) 258
- [16] STÁDNÍK A., Kvas 57 (1928) 101
- [17] STÁDNÍK A., Pivovarský sborník, Praha (1929) 38
- [18] WILDNER H., Wo. Br. 50 (1933) 289
- [19] WINDISCH W., Wo. Br. 36 (1919) 16
- [20] WINDISCH W., Wo. Br. 44 (1927) 65
- [21] Die Nomenklatur der Hopfenharze, Brauwelt 97 (1957) 696
- [22] Soukromé sdělení N. I. Bulgaková



## Vibrační síto na kvasnici

A. Petersen a Henius, Kodaň - Dánsko

Síto pracuje na elektromagnetickém principu a vibrace odpovídají periodám střídavého proudu. Normálně při 50 periodách má síto 3000 vibrací za minutu. V kvasnicích procházejících sítím propadávají kvasinky sítím, hrubé nečistoty, chmelové pryskyřice a pod. přepadávají přes síto. Síto má značný výkon, při rozměrech 500 × 1000 mm asi 100 litrů za minutu. Spotřeba proudu je nepatrná.

PVS Braník