

## Zhodnocení některých metodik stanovení glycidů v pivovarských produktech papírovou chromatografií

JOSEF DYR, JOSEF MOŠTEK,

Katedra kvasné chemie a technologie Vysoké školy  
chemicko-technologické v Praze

663.4:641.13:545.84

Papírové chromatografie k určení cukrů v mladině po prvé využili *Blom* a *Schwarz* [1] v roce 1947. Zároveň poukázali na biochemický význam hlavních glycidových složek v mladině. Od té doby určování glycidů v pivovarských produktech značně pokročilo. Různí pracovníci postupně v mladině určili několik pentos a hexos a řadu oligosacharidů. K dělení glycidů používali různých rozpouštědlových soustav a detekčních činidel. Jen druh papíru a aparatura zůstávaly v podstatě stejné. Jednotlivé rozpouštědlové soustavy se liší dělicím účinkem pro určitou skupinu cukrů. Také detekční činidla jsou na jednotlivé cukry různě citlivá. V této práci jsme porovnali a zhodnotili několik nejběžnějších rozpouštědlových soustav pro dělení cukrů a vyzkoušeli citlivost a vhodnost některých detekčních činidel v postřikové a ponořovací technice pro cukry v mladině a pive.

### Část experimentální

#### Použité zařízení a materiál

V první řadě pokusů byla chromatografie prováděna ve skleněných válcích průměru 28 cm, vysokých 50 cm. Horní okraj válců byl zabroušen a poklopen skleněnými deskami. Uvnitř válců byla upevněna skleněná hranolovitá vanička vnitřních rozměrů 19×5×4 cm. K lepšímu sycení vnitřní atmosféry byly do válců vloženy archy filtračního papíru, jež byly zesponu zvlhčovány vodnatější fází rozpouštědlové soustavy.

Rozměry chromatogramů byly 17,5×50 cm. Čára startu 8 cm od kraje. Vzorky nanášeny v kapičkách 2 cm od sebe.

Ve druhé řadě pokusů bylo použito chromatografických skříní, vnitřních rozměrů 15×70×60 cm. Dokonalejší sycení atmosféry zajišťovalo podobné opatření s filtračními papíry jako u skleněných válců.

Rozměry chromatogramů byly 37×56 cm. Jelikož skleněné vaničky ve skříních byly poměrně hluboké a široké, byl start až 10 cm od kraje. Vzorky nanášeny na čáru 2 nebo 3 cm dlouhou ve stejné vzdálenosti od sebe.

Většinou se pracovalo s papírem Whatman č. 1, méně s Whatman č. 4 a jen v ojedinělých případech s Whatman č. 3. Každý druh chromatografického papíru má přednosti a nedostatky, které byly vhodně využívány, event. eliminovány. Ve všech případech byly spodní okraje chromatogramů zubovité ostříhány, aby rozpouštědlová soustava dokonaleji odkapávala.

Teplota místnosti:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Úprava vzorku:* K srovnání citlivosti jednotlivých činidel byla do několika Freudenreichových lahviček vysterilována  $10^\circ$  světlá mladina z provozní várky. K analýze se haematologickou pipetkou odměřilo vždy 0,01 ml vzorku zfiltrovaného přes filtrační papír. Obsah pipetky byl ve 3 až 4 kapičkách nanesen na chromatografický papír a vysušen infračervenou lampou.

#### Zkoušené rozpouštědlové soustavy a jejich charakteristika

1. n-butanol : kyselina octová : voda = 4 : 1 : 5.

Tato soustava se všeobecně používá a doporučuje k dělení cukrů a aminokyselin [2]. K dělení cukrů v mladině ji použil *Winkler* [3] a *Vlček* [4]. Výsledky, které jsme dosáhli v rozdělení cukrů mladiny při způsobu „s přetékáním“ rozpouštědla, byly rovněž velmi dobré. Skvrny cukrů na papíru byly jasně ohraničené. Čas potřebný k dostatečnému rozdělení fruktosy od glukosy a k vzájemnému rozdělení maltosy, maltotriosy a maltotetraosy byl kolem 36 hod. Delší čas a event. opakované promývání zlepšovalo dělení.



Promývala se vrstva horní, dolní se sytila atmosféra. Soustava byla i při výchylce teploty  $\pm 5^\circ\text{C}$  stálá.

Úsporně [5] se soustava připraví takto: V odměrném válci se 13 ml ledové kyseliny octové a 43,5 ml vody doplní n-butanolem na objem 200 ml. Po protřepání se po 10 min hotová směs odlije přímo do žlábků chromatografické skříně od cca 0,5 až 1 ml dolní fáze, usazené u dna. Odpadají ztráty s vyléváním dolní fáze, nasycené rozpouštědly, obvyklé u přípravy n-butanol : kyselina octová : voda = 4 : 1 : 5; průběh chromatografie je shodný.

2. n-butanol : pyridin : voda = 5 : 3 : 1.

Této soustavy použili k dělení cukrů *Wallenfels a Bernt* [6]. Proti soustavě ad 1. dělila rychleji, avšak na úkor dobrého ohraničení skvrn. Zvláště u rmutů vznikaly opožděné stíny, k jejichž odstranění by bylo třeba složitější úpravy vzorku. Dostatečného rozdělení uvedených cukrů se při nepřetržitém promývání dosáhlo během 16 hod.

Složky soustavy se v uvedeném poměru úplně mísí. Soustava je stálá. Atmosféra se sytila soustavou zředěnou vodou.

3. Octan ethylnatý : pyridin : voda = 2 : 1 : 2.

Touto soustavou dělil u nás cukry *I. Vavruch* [7]. K dělení cukrů v mladině jí využili *Harris a spol.* [8]. Soustava dělí velmi rychle, skvrny jsou však bez kontrastnějšího ohraničení, dost často rozmazané. Přesto však některé chromatogramy byly uspokojivé. Čas potřebný k dobrému rozdělení dříve uvedených pěti hlavních cukrů mladiny byl pouze 9 hod. Nevýhodou této soustavy je její nestálost, neboť ethylacetát se časem hydrolysuje.

4. Pyridin : amoniak : voda = 6 : 2 : 1.

Použití této soustavy k dělení cukrů uvádí *Hais a Macek* [2]. Složky se v uvedeném poměru úplně mísí. Soustava dělila, vlastně vymývala tak radikálně, že se jednotlivé cukry nestačily vůbec rozdělit a přeběhly přes celý chromatogram v neurčitém shluku 2 až 3 cm dlouhém. Kromě toho okrajové vzorky často „běžely“ rychleji než vzorky uprostřed chromatogramu, takže po detekci se příslušné shluky cukrů jevíly na chromatogramu jako obrácené „V“.

Touto soustavou se nepodařilo získat uspokojivý chromatogram cukrů mladiny.

5. n-butanol : ethanol : voda = 4 : 1 : 5.

Tuto soustavu doporučili pro dělení cukrů *Hough, Jonnes a Wadman* [9]. K dělení neredukujících cukrů a vícemocných alkoholů jí použil také *Joda* [10], k dělení cukrů mladiny *Harris a spol.* [8]. Námi použitý ethanol byl asi 95 %ní a rozdělení fází nastávalo teprve při poměru 4 : 1,1 : 4,9. Touto soustavou bylo pak během 24 hod. při nepřetržitém promývání dosaženo dostatečného oddělení již dříve jmenovaných hlavních cukrů. Do 36 hod. se zřetelně oddělila i sacharosa od maltosy. Skvrny byly dobře ohraničené.

Soustava je proti soustavě ad 1. o něco citlivější na teplotní změny, avšak při odchylkách nepřesahujících  $\pm 2^\circ\text{C}$  původně dosažené rovnováhy fází je prakticky stálá. Atmosféra se sytila fází bohatší vodou.

6. n-butanol : aceton : voda = 2 : 7 : 1.

Této soustavy použil při dělení různých monosacharidů a oligosacharidů kruhovou chromatografií *Girri a Nigam* [11]. Přesto, že tato soustava měla podle autorů nejlepší dělicí účinek při kruhové chromatografii, nepodařilo se při sestupné chromatografii získat obstojné rozdělení cukrů mladiny.

#### Zkoušená detekční činidla a jejich charakteristika

Snahou bylo najít z mnoha užívaných a doporučovaných detekčních činidel takové, které by indikovalo přítomnost co nejširšího rozmezí různých cukrů, aby technika jeho použití byla co nejjednodušší a chromatogramy stálé.

Zkoušena byla tato detekční činidla v postřikové technice:

1. Anilinfthalát, který jako postřikové činidlo doporučuje *Partridge* [12], byl připraven jako směs 0,93 g čerstvě předestilovaného anilinu a 1,66 g kyseliny ftalové ve 100 ml vodou nasyceného butanolu. Chromatogram po postřikání byl zahřát na  $105^\circ\text{C}$ . Jednotlivé cukry vystoupily jako skvrny s různými odstíny hnědé barvy. Intensita zbarvení u ketos a částečně i u různých disacharidů závisí na promývací soustavě. Tak např. soustava ad 1. intenzitu zřetelně zeslabuje.

2. *Lemicus a Bauer* [13] doporučili k detekci směsi monosacharidů a oligosacharidů čerstvou směs 4 dílů 2 % vodného jodistanu sodného a 1 dílu 1 % vodného manganistanu draselného ve 2 % vodném roztoku sody. Postříkaný usušený chromatogram se za hodinu vypere vodou a po usušení vzniká trvalý chromatogram, na němž vynikají hnědé skvrny cukrů na téměř bílém pozadí. Ačkoliv autoři uvádějí velkou citlivost činidla, cukry v mladině nebyly na našich chromatogramech indikovány s dostatečnou barevnou intenzitou.

3. Anilinoxalové činidlo, kterého k detekci směsi různých cukrů použil *Vavruch* [14], bylo připraveno smícháním vodného 0,2 M roztoku kyseliny šťavelové s roztokem obsahujícím 1,86 g čerstvě předestilovaného anilinu na 100 ml ethanolu v poměru 1 : 1. Cukry mladiny se jevíly jako různě odstíněné hnědé skvrny.

4. *Stöckli* [15], *Winkler* [3] a *Vlček* [4] použili k detekci cukrů v mladině směsi 5 dílů 2 %ního difenylaminu v ethanolu, 5 dílů 2 %ního anilinu v ethanolu a 1 dílu 85 %ní kyseliny orthofosforečné. Cukry po 10 min. zahřátí na  $80^\circ\text{C}$  vystoupily jako různé zbarvené skvrny na slabě šedomodrém pozadí. Chromatogramy však již během 1 až 2 hod. zčernaly. Bylo proto nutno ofotografovat je co nejrychleji.



Zkoušená detekční činidla s ponořovací technikou:

Harris a MacWilliam [16] navrhli tato činidla:

1. Směs 0,5 g benzidinu v 5 ml kyseliny octové, 4 g kyseliny trichloroctové v 5 ml vody a 90 ml acetonu. Promyté, usušené chromatogramy se protáhnou roztokem detekčního činidla, usuší a pak zahřejí na 100 °C. Na slabě žlutém pozadí vyniknou cukry jako hnědé skvrny.

Činidlo zvláště dobře indikovalo vyšší oligosacharidy. Chromatogramy v temnu uložené se během měsíce téměř nezměnily. Podle autorů je směs v tmavé láhvi při 0 °C stabilní. Během pokusů se však zjistilo, že je jen prospěšné, připraví-li se činidlo vždy čerstvé. Starším činidlem se totiž zmenšuje kontrastnost mezi skvrnami cukrů a pozadím.

2. Směs 5 objemů 2 %ního roztoku difenylaminu v acetonu, 5 objemů 2 %ního roztoku čerstvě předestilovaného anilinu v acetonu a 1 objem 85 %ní kyseliny orthofosforečné.

Roztoky difenylaminu a anilinu se uchovávají oddělené při 0 °C a smíchávají se až před detekcí.

Technika použití je stejná jako u benzidinového činidla. Cukry vystoupily jako různé zbarvené skvrny na slabě šedém pozadí. Chromatogramy však do 48 hod. ztmavěly. Bylo proto nutno ofotografovat je záhy po detekci.

3. Dnes velmi rozšířenou [17], [18], [19] detekci s ponořovací technikou je detekce acetonovým roztokem dusičnanu stříbrného podle Greena a Stonea [20]. Autoři jej použili k detekci cukrů při studiu stupně zkvasitelnosti mladiny různými druhy kvasinek. Příprava acetonového roztoku  $\text{AgNO}_3$  a technika jeho použití je tato: 0,5 ml nasyceného vodného roztoku  $\text{AgNO}_3$  smícháno se 100 ml acetonu (k event. vyloučenému  $\text{AgNO}_3$  přidávána po kapkách voda do úplného rozpuštění). Tímto roztokem se vyvolaný (promytý) a dříve usušený chromatogram rychle protáhne a na vzduchu osuší. Usušený se ponoří do alkoholového roztoku NaOH připraveného smícháním 2,3 ml 55 %ního roztoku NaOH a 100 ml 95 %ního ethanolu. Po 5 min. koupeli v roztoku NaOH se chromatogram vyjme a ponoří do asi 6 N roztoku amoniaku, dokud nenastane dokonalá barevná diferenciace černohnědých skvrn cukrů na slabě našedlém pozadí. Následuje 1 hod. praní chromatogramu v tekoucí vodě a usušení.

Během pokusů jsme tuto metodu upravili tak, že asi 6 N amoniak jsme nahradili kyselým ustalovačem běžně prodávaným k fotografickým účelům. Čerstvým roztokem ustalovače se pozadí chromatogramu do 3 až 5 min. dokonale vybělí. To usnadňuje detekční techniku metody, neboť není již zapotřebí pracovat v digestoři. Téměř všechny chromatogramy detekované tímto způsobem měly proti amoniakovému způsobu kontrastnější barevné difference cukrů a pozadí.

Metoda velmi citlivě indikovala všechny redukující cukry mladiny. Ze všech zkoušených činidel detekovala pentosy nejcitlivěji. Chromatogramy jsou stálé.

## Závěr

1. Po přezkoušení popsaných metod bylo k vlastní práci použito dvou nejlépe dělicích soustav:

a) n-butanol : kyselina octová : voda = 4 : 1 : 5,

b) n-butanol : ethanol (cca 95%) : voda = 4 : 1,1 : 9,9.

Druhá z nich dávala při nepřetržitém promývání o něco lepší výsledky v dělení cukrů mladiny. Při opakovaném promývání, které se dále výhradně používalo, se jejich dělicí účinky takřka nelišily.

Jelikož cílem chromatografické analýzy bylo především kvalitativní stanovení cukrů, používalo se opakovaného sestupného promývání, a to trojího a vícenásobného, podle povahy a množství nanášených vzorků.

2. Ze 7 zkoušených detekčních činidel byla za uvedených pracovních podmínek nejvhodnější činidlo s benzidinem a  $\text{AgNO}_3$  s ponořovací technikou. Byla nejcitlivější, pozadí jednotné barvy a chromatogramy dostatečně stálé. Každý vzorek se současně zkoušel oběma činidly, z nichž benzidinové s větší citlivostí detekovalo vyšší oligosacharidy amylolysy, kdežto  $\text{AgNO}_3$  citlivěji zachycoval stopové se vyskytující pentosy. Téměř výhradně jen při použití  $\text{AgNO}_3$  se indikovala mízná množství monosacharidů a maltosy i v dobře vyležalých pivech.  $\text{AgNO}_3$  byl ze všech zkoušených činidel nejcitlivější.

Detekcí oběma činidly se u každého vzorku podařilo zachytit řadu cukrů a současně je rozdělit podle redukční schopnosti.

Poněvadž na chromatogramech bylo zjištěno několik dosud blíže neurčených cukrů, je současně použití obou detekčních činidel cenným příspěvkem k jejich charakteristice.

Rozlišení použité dělicí soustavy a detekce bude u každého chromatogramu uvedeno v příští práci.

\* \* \*

Děkujeme řediteli pokusného a vývojového střediska Branického pivovaru F. Hlaváčkovu za laskavé poskytnutí pracoviště k první řadě pokusů. Jemu a Ing. Kahlerovi děkujeme za zájem o práci a podnětné připomínky.

## Literatura:

- [1] BLOM J., SCHWARZ B.: J. Inst. Brew 53 (1947) 302
- [2] HAIŠ J. M. a MACEK K.: Papírová chromatografie, Praha 1954
- [3] WINKLER R.: Kvasný průmysl 2 (1956) 196
- [4] VLČEK J.: Kvasný průmysl 3 (1957) 169
- [5] MIKEŠ O.: Chem. listy 51 (1957) 138
- [6] WALLENFELS K., BERNT E. a spol.: Ref. Sugar. Ind. Abstr. 16 (1954) 11
- [7] VAVRUCH I.: Chem. listy 46 (1952) 116
- [8] HARRIS G. a spol.: J. Inst. Brew. 57 (1951) 264
- [9] HOUGH, JONES, WADMAN: J. Chem. Soc. (1949) 2511
- [10] JODA A.: Ref. Sugar Ind. Abstr. 14 (1952) 116
- [11] GIRRI K. V., NIGAM V. N.: Naturwissenschaften 40 (1953) 343
- [12] PARTRIDGE S. M.: Nature 164 (1949) 443
- [13] LEMICUS R. U. a BAUER H. F.: Anal. Chem. 26 (1954) 920
- [14] VAVRUCH I.: Listy cukr. 68 (1952) 29
- [15] STÖCKLI A.: Schweiz. Brauerei-Rundschau 67 (1956) 1
- [16] HARRIS G., MacWILLIAM I. C.: Ref. Sugar. Ind. Abstr. 16 (1954) 85
- [17] BURGER M. a BERAN K.: Čs. mikrobiologie 1 (1956) 26
- [18] BERAN K., BURGER M., ZELEŇKA S.: Čs. mikrobiologie 1 (1958) 193
- [19] MALEK I. a spol.: Čs. mikrobiologie 2 (1957) 203
- [20] GREEN R. S. a STONE I.: Wallerstein Lab. Com. XV (1952) 347

## Summary

1. After the preliminary tests of the described methods two combinations of solution were selected as giving the best results viz.:

a) n-butylalcohol : acetic acid : water = 4 : 1 : 5,

b) n-butylalcohol : ethylalcohol : water = 4 : 1,1 : 4,9.

In continuous washing the ability of the second solution to classify sugar contents in beerwort was slightly better. In repeated intermittent washing — which method was further used exclusively — no difference was observed between the two solutions.



As the primary aim of the chromatographic analysis was the qualitative determination of sugar, repeated regressive washing procedure was applied. According to the character and quantity of samples three or even more stage washing was used.

2. Under the described working conditions 7 various detecting agents were tested. The best results were obtained with benzinide and  $\text{AgNO}_3$  (in submerging process).

The said agents were very sensitive giving reasonably stable chromatographic pictures. Each sample was tested

by two agents. Benzinide, being more sensitive, detected higher oligosaccharides resulting from amylolysis, whereas  $\text{AgNO}_3$  could trace pentoses. Only by means of  $\text{AgNO}_3$  it was possible to detect negligible quantities of monosacharides and maltose even in beer which has been stored for a period of time.

By applying both agents it was possible to determine many kinds of sugar and classify them according to their reducing capacity. Since the chromatographic analysis revealed several — so far undefined — groups of sugar, the application of two agents can contribute substantially to their classification.