

Fenolické látky v ječmenu

MIROSLAV ČERVINKA, Hlavní specializovaná šlechtitelská stanice pro obiloviny, Branišovice

663.421:547.57

I. Metodika důkazu a stanovení fenolických kyselin

Fenolické látky v ječmenu zajímají technologa i šlechtitele. Nebiologické zákaly piva, o nichž přehledně referuje *Moštek a Dyr* [1], jsou nepříjemným průvodním jevem u lahvového piva. Podle modelových pokusů *Silbereisena* a *Plomanna* [2] nejsou monomery těchto látek pravděpodobně schopny srážet bílkoviny; jejich existence v zákalu byla však bezpečně prokázána, např. *Waldschmidt-Leitz, Kloos* [3].

Konečným produktem šlechtitelovy práce je odřůda s požadovanými pěstitelskými a technologickými ukazateli. Genetický základ interaguje s ekologickými faktory a agrotechnickými zásahy, což rezultuje ve změněném metabolismu proti původnímu „ideálnímu“ stavu a navenek se projeví změnami základních ukazatelů. V tomto procesu, máme-li na mysli pouze vratné děje, uplatňují se fenolické látky jako přirozené redoxní systémy a v této souvislosti např. jako součást procesu oxidativní fosforylace [4, 5, 6] a jako přirozené regulační aktivity stimulatorů růstu [7, 8, 9, 10, 11].

Ze stručného přehledu významu fenolických látek v metabolismu rostliny vyplývá podnět pro laboratoře šlechtitelských stanic k jejich hlubšímu studiu. Jejich bohaté spektrum v rostlinném organismu nedovoluje ovšem studovat je v plném rozsahu. V naší laboratoři jsme se omezili na fenolické kyseliny, přesněji na deriváty kyselin benzoové a skořicové, k nimž se také vztahuje citovaná literatura. Jejich přehled a příslušné hodnoty $R_f \cdot 10^2$ pro rozdělovací chromatografii na papíře shrnuje *tabulka 1*.

Na základě dostupné literatury prověřil autor metodiku jejich extrakce z ječmene, a navrhl jejich dělení a stanovení. Bude jí použito ke studiu metabolismu fenolických kyselin v době dozrávání zrna, k jejich stanovení v pluchách ječmene a účasti na nebiologických zákalech piva.

Extrakce, hydrolyza a izolace kyselin

K extrakci je nejvhodnější 80% etanol [12, 13, 14, 15, 16]. Zelený materiál (čerstvý), rozstříhaný na malé kousky, se vaří dvě hodiny pod zpětným chladičem, při čemž výchozí koncentrace alkoholu se volí vzhledem k obsahu vody v materiálu tak, aby výsledná koncentrace v suspenzi byla 80 %. Pro suchý materiál (např. pluchy) lze výhodně použít Soxhletovy aparatury a extrahovat 6 hodin.

Čirý etanolový extrakt se odpaří vakuově při 50 °C a suchý odparek se hydrolyzuje 2N-HCl na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Kyselý hydrolyzátní se důkladně extrahuje éterem a z něj se převedou kyseliny do 5% NaHCO₃. Hydrokarbonátový extrakt se okyslí zředěnou HCl na pH 2 a kyseliny se reextrahují do éteru. Po odpaření éteru se rozpustí odparek v 80% etanolu.

Zbytek původního materiálu po etanolové extrakci se hydrolyzuje 2N-NaOH v inertní atmosféře při teplotě místnosti 5 hodin. Inertní atmosféru lze nahradit dobře uzavřenými nádobami, v nichž suspenze zaujímá podstatnou část obsahu. Alkalický hydrolyzátní po okyselení 2N-HCl na pH 2 se extrahuje éterem. Další postup je shodný s předšlým.

Papírová chromatografie a detekce

Při dělení získaných extraktů prokázala papírová chromatografie (rozumí se rozdělovací chromatografie na papíře) jako obvykle své přednosti. K jiným technikám se prozatím nepřihlíželo. *Tabulka 1* uvádí přehledně hodnoty $R_f \cdot 10^2$ pro rozpouštědlové soustavy shrnuté v *tabulce 2*. Pokud není jinak udáno, používá se papír Whatman č. 1. Optimální objem nanášeného vzorku je 5 až 10 μ l s obsahem 1 až 50 μ g kyselin.

Jednorozměrná chromatografie vyžaduje kombinaci dvourozpouštědlových až třírozpouštědlových soustav, neboť skvrny se mohou překrývat. Podle autorových zkušeností je nejvhodnější soustava č. 15.

Po nanesení vzorků se papír nejprve promyje sestupně (nebo vzestupně) směsí benzin:benzen (1:1), aby se odstranily zbytky lipoidních látek, které jinak vytvoří modře fluoreskující pás od startu k čelu rozpouštědla a znesnadňují tím identifikaci skvrn pod UV. Po usušení v proudu vzduchu se vyvíjí některou z uvedených soustav.

K detekci skvrn se nejčastěji používá 1% FeCl₃, diazotovaného p-nitranilinu, diazotované kyseliny sulfanilové a UV, při čemž fluorescenci skvrn lze zesílit parami amoniaku. Identifikace kyselin podle hodnot R_f a zabarvení s uvedenými činidly musí být doplněna alespoň srovnáním se standardem, není-li již možné stanovit bod tání a vyhodnotit IČ spektra.

Další podrobnosti o těchto kyselinách a metodikách jejich stanovení a důkazu jsou uvedeny v pracích: *Paech, Tracey* [17], *Hais, Macek* [18] *Reio* [19, 20]. Pro rychlou orientaci používá autor kruhovou chromatografii v této úpravě: Kruhový výsek Whatmanu č. 1 průměru 24 cm se upevňuje do exsikatoru mezi nádobu a víko. Přívod rozpouštědla obstarává proužek papíru široký 1 cm, který je vystřižen od kraje do středu papíru, s nímž zůstává spojen. Jeden vzorek se nanáší na čtyři starty kolem středu papíru. Při použití uvedených detekčních činidel vedle sebe se stává informace o vzorku velmi přehlednou.

Stanovení kyselin

Je to nejobtížnější úsek práce, neboť vymývání skvrn z papíru pro fotometrická měření je zatíženo značnou chybou. *Said El-Basyouni* a *Towers*

Tabulka 1

Přehled fenolických kyselin a jejich hodnoty $R_f \cdot 10^2$ pro uvedené rozpouštědlové soustavy

Kyselina	Rozpouštědlová soustava																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
skořicová	35	81													92	27	86	71	63	16												
melilotová																					72	79	80	84	93	84						
floreťová																																
o-kumarová	09	51																			42	57	75	70	92	79				20	23	
p-kumarová	06	44						93	68	88					89	09	89	48	29	01	39	47	69	65	90	75		28	82	16	18	
kávo	00	17	05	19	53	08		86	46																				22			
p-metoxyskořicová								96							90	10	92	91	83	70								96				
2-hydroxy-4- -metoxyskořicová																																
2,3-dimetoxy- skořicová								96	82	78					91	12	90	90	89	67										99		
2,4-dimetoxy- skořicová															93	19	93	90	86	76												
3,4-dimetoxy- skořicová								94	85	51																				99		
o-ferulová													75	36																		
izoferulová															91	04	79	59	28	05												
ferulová	09 22	32						92	78													27	50	57	67	81	76		61	89		
sinapová	13 28	24													88	03	77	75	28	06												
salicylová	13	70																														
p-hydroxybenzoová	04	37	23	55	68	42	65																									
2,3-dihydroxy- benzoová						43	49																									
2,4-dihydroxy- benzoová			39	38	34	30	53																									
2,5-dihydroxy- benzoová			68	26	34	20	70																									
2,6-dihydroxy- benzoová			77	11	48	16	78																									
3,4-dihydroxy- benzoová	00	12	06	16		08	30				57																					
3,5-dihydroxy- benzoová			35	09	39	02	54																									
2-hydroxy-4- -metoxybenzoová																																
2-hydroxy-5- -metoxybenzoová																																
2-hydroxy-6- -metoxybenzoová																																
3-hydroxy-5- -metoxybenzoová																																
3-metoxy-4- -hydrobenzoová	16	27	32	80																												
3,4-dimetoxy- benzoová	36	44																														
3,5-dimetoxy-4- -hydroxybenzoová	25	21	18	79																												

[13] našli např. pro kyseliny p-kumarovou a ferulovou hodnotu 97 %. Nagasawa [21] udává pro kyselinu chlorogenovou jen 70 %. Situace se komplikuje tím, že existuje závislost mezi hodnotami extinkce a podmínkami vyvíjení [22]. K omezení těchto vlivů a snížení chyby stanovení na přípustnou mez je nutné dodržet tento postup. Pro určitý

vzorek používat jen tutéž komoru. Kromě vzorku nanášet na papír standardní roztoky o koncentracích 10, 20, 30, 40 a 50 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$. Jak vzorek, tak i standardy se nanášejí 3krát vedle sebe. Odpovídající eluáty se spojí a změří se extinkce. Popsaný postup byl ověřován u kyseliny ferulové a relativní chyby činily $\pm 5,68 \%$.

Tabulka 2

1. Chloroform nasycený formamidem, papír impregnován směsí formamid : etanol (1 : 1)
2. Butanol sek. : voda (4 : 1), papír pufovaný fosfátem o pH 7,4
3. Izopropanol : amoniak : voda (8 : 1 : 1)
4. Benzen : kyselina propionová : voda (2 : 2 : 1)
5. n-Butanol : pyridin : dioxan : voda (14 : 4 : 4 : 1)
6. Benzen : kyselina octová ledová (20 : 5, nasyceno vodou)
7. n-Butanol : etanol : kyselina boritá (1 : 1 : 1), papír impregnován tetraboritanem sodným 9,54 g/l, Whatman č. 4
8. n-Butanol : kyselina octová 27 % (1 : 1)
9. Fenol : voda (73 : 27, váhově)
10. Destilovaná voda
11. n-Butanol : benzen : kyselina octová : voda (2 : 10 : 2 : 1)
12. n-Butanol : kyselina octová : voda (4 : 1 : 5)
13. Benzen : kyselina octová : voda (10 : 7 : 3)
14. Kyselina mravenčí 2%
15. Metyl-etylketon : aceton : kyselina mravenčí : voda (40 : 2 : 1 : 6)
16. Metyl-etylketon : dietylamin : voda (921 : 2 : 77)
17. Metyl-izobutylketon : kyselina mravenčí : voda (10 dílů ketonu nasyceno 1 dílem 4% kyseliny mravenčí)
18. Chloroform : metanol : kyselina mravenčí : voda (10 dílů chloroformu nasyceného směsí 1 dílu metanolu a 1 dílu 4% kyseliny mravenčí)
19. Benzen : metyl-etylketon : kyselina mravenčí : voda (směs 9 dílů benzenu a 1 dílu ketonu nasyceného 1 dílem 2% kyseliny mravenčí)
20. Benzen : kyselina mravenčí : voda (10 dílů benzenu nasyceného 1 dílem 2% kyseliny mravenčí)
21. n-Propanol : amoniak (7 : 3), Whatman č. 3 MM
22. Kyselina octová 10%, Whatman č. 3 MM
23. n-Butanol nasycený vodou, Whatman č. 3 MM
24. n-Butanol : kyselina octová : voda (4 : 1 : 5), vodná fáze, Whatman č. 3 MM
25. n-Butanol : kyselina octová : voda (4 : 1 : 5), organicá fáze, Whatman č. 3 MM
26. Izopropanol : voda (1 : 4), Whatman č. 3 MM
27. Toluen : mravenčan etylnatý : kyselina mravenčí (5 : 4 : 1), Whatman č. 3 MM
28. n-Butanol nasycený vodou, papír impregnován kyselinou boritou a octanem sodným
29. m-Kresol : kyselina octová : voda (50 : 2 : 48)
30. n-Butanol nasycený vodou, papír impregnován 0,1 m-boritanem sodným
31. n-Butanol nasycený vodou, papír impregnován sek. fosforečnanem sodným.

Soustavy pro dvourozměrnou chromatografii.

1. a-Benzen : kyselina octová : voda (6 : 7 : 3),
b-kyselina mravenčí 2%,
2. a-Benzen : kyselina octová : voda (6 : 7 : 3), organicá fáze, bez syčení papíru,
b-mravenčan sodný : kyselina mravenčí : voda (10 : 1 : 200)
3. a-Etanol : amoniak (95 : 5), nebo etanol : amoniak : voda (80 : 5 : 15),
b n-Butanol : kyselina mravenčí : voda (7 : 3 : 12 nebo 4 : 1 : 5), nebo
n-propanol : eukalyptol : kyselina mravenčí (5 : 5 : 2, nasycený vodou).
4. a-Elektroforéza v ústrojném činidle o pH 6 (pyridin 2,5% a 0,25% ledová kyselina octová ve vodě, 20 V/cm, 3,5 h)
b-2-metoxyetanol : pyridin : kyselina octová : voda (8 : 4 : 1 : 1 a 0,15% 8-hydroxychinolinu), vyvíjeno 2krát vzestupně

Poznámka k přípravě materiálu

Při srovnávacích studiích je nutné mít stále na paměti, že obsah kyselin závisí nejen na odrůdě, ale i na vnějších podmínkách [10, 24]. Autor nalezl mezi dvěma porosty elit jarního ječmene Valtický vzdálenými asi 800 m rozdíl v obsahu kyseliny ferulové po alkalické hydrolýze 17,2 % a po kyselé 11,3 % [dosud nepublikováno]. Je proto nezbytné pěstovat materiál za definovaných podmínek. Ideální je fytotron, který ovšem je nyní nepřístupný pro vysoký pořizovací náklad. Lze jej nahradit do určité míry vhodným skleníkem a materiál vypěstovat v nádobách používaných v pokusech s výživou rostlin. Takto se zajistí stejné koncentrace živin, vody a světla. Morfologická kontrola nadzemních částí a kořenové soustavy v pěti po sobě jdoucích pokusech dala uspokojivé výsledky. Obsah kyseliny ferulové kolísá v těchto pokusech v rozmezí $\pm 6,36$ % pro kyselou a $\pm 7,12$ % pro alkalickou hydrolýzu, což je vzhledem k biologické variabilitě materiálu shoda více než dobrá.

Závěr

Na základě dostupné literatury byla navržena metodika stanovení a důkazu derivátů kyseliny benzoové a skořicové v ječmenu. Navržené metody bude použito ke studiu metabolismu těchto látek v posledních vývojových fázích, zvláště pak ke studiu jejich ukládání v zrnu a k jejich účasti na nebiologických zákalech piva.

Literatura

- [1] MOŠTEK, J. - DYR, J.: „Kvasný průmysl“, 8, 1962 č. 3.
- [2] SILBEREISEN, K. - PLOMANN, L.: „Monatsschr. Brauerei“, 16, 1933 s. 41.
- [3] WALDSCHMIDT-LEITZ, E. - KLOOS, G.: „Brauwissenschaft“, 16, 1933 s. 313.
- [4] HARRISON, K.: „Nature“ [London] 181, 1958 s. 1131
- [5] WIELAND, T.: „Angew. Chem.“ 70, 1959 s. 313.
- [6] ARNON, D. T. - HORTON, A. A.: „Acta Chem. Scand.“ 17, 1933 s. 135.
- [7] TOMASZEWSKI, M.: „Bull. Acad. Pol. Sci.“, 7, 1959 s. 127.
- [8] BUFFEL, K. - VENDRIG, J. C.: „Mededel. Kon. Acad. Wetensch. Belgie“ 25, 1933 č. 1.
- [9] TOMASZEWSKI, M.: V knize „Regulateurs naturels de la croissance végétale. Paris, 1964.
- [10] KONISHI, M. - GALSTON, A. W.: „Phytochemistry“ 3, 1934 s. 559.
- [11] KÖVES, E.: „Acta Bot.“ X (3—4), 1964 s. 299
- [12] IBRAHIM, R. K. - TOWERS, G. H. N.: „Arch. Biochem. Biophys.“ 87, 1930 s. 125
- [13] SAID EL-BASYOUNI, TOWERS, G. H. N.: „Can. J. Biochem.“ 42, 1934 s. 203.
- [14] SAID EL-BASYOUNI, TOWERS, G. H. N.: „Can. J. Biochem.“ 42, 1934 s. 493.
- [15] VAN SUMERE, C. F. - VAN SUMERE-DE PRETER, C. - VINING, L. C. - LEDINGHAM, G. A.: „Can. J. Microbiol.“ 3, 1957 s. 847
- [16] GUENZI, W. D. - Mc CALLA, T. M.: „Agr. J.“ 58, May-June (1966).
- [17] PAECH, K. - TRACEY, M. V.: „Modern Methods of Plant Analysis“, 111, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955.
- [18] HAIS, I. M. - MACEK, K.: Paper Chromatography, ČSAV, Praha 1963.
- [19] REIO, L.: J. Chromatography 4, 1960 s. 458.
- [20] REIO, L.: J. Chromatography 13, 1964 s. 457
- [21] NAGASAWA, M.: „Bull. agric. chem. Soc. Japan“ 22, 1958 s. 21
- [22] TÄUFEL, K. - VOIGT, J.: Zeit. Lebensmittel - Unters. und Forsch.“ 6, 1932 s. 32
- [23] HASKINS, F. A. - WILLIAMS, L. G. - GORZ, H. J.: „Plant Physiol“ 39, 1934 s. 777

(résumé na str. 42)

● ● ● Toto číslo neobsahuje přílohu

ФЕНОЛОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ЯЧМЕНЕ

На основании данных, опубликованных в литературе была разработана методика определения дериватов бензойной и коричной кислот в ячмене. Метод дает возможность изучать метаболизм этих веществ в последних фазах развития ячменя, главным образом в период их образования и концентрации в зерне. Будет также можно определить их роль в процессах не биологического помутнения пива.

PHENOLIC SUBSTANCES IN BARLEY

Taking as a base reports published abroad in literature the author has developed a new method for the determination of derivatives of benzoic and cinnamic acids in barley. The method permits to study the metabolism of the mentioned compounds in the final stages of the barley vegetative cycle, especially their concentration in corns. The participation of phenolic substances in non-biological turbidity of beer can be also reliably assessed by applying the discussed method.

FENOLISCHE STOFFE IN DER GERSTE

Aufgrund der erreichbaren Literatur wurde die Methodik zur Feststellung und zum Beweis der Derivate der Benzoesäure und Zimtsäure in der Gerste vorgeschlagen. Diese Methodik wird man zum Studium des Metabolismus dieser Stoffe in den letzten Entwicklungsphasen anwenden, besonders zum Studium ihrer Bildung im Gerstenkorn und ihrer Teilnahme an den nichtbiologischen Biertrübungen.