

Využití chromatografie na tenké vrstvě v pivovarské analytice ke stanovení zkvasitelných a jiných sacharidů

683.41:543.544
543.854.7 547.455/.458

Ing. VALENTIN CHRISTOV BAČVAROV - Doc. Ing. JOSEF MOŠTEK, DrSc.
Vysoká škola chemickotechnologická, katedra kvasné chemie a technologie, Praha

Práce je součástí připravované kandidátské dizertační práce prvního autora pod vedením druhého autora

Do redakce došlo 24. února 1977

Metoda chromatografie na tenké vrstvě byla poprvé vědecky doložena *Ismailovem* a *Schreiberem* [1]. Dosáhla velmi rychle významného postavení v souboru současných analytických metod. Úspěšně se uplatnila v organické chemii, anorganické chemii, biochemii, medicíně, biologii, farmacii, toxikologii a potravinářské chemii [2–4].

V analytice sacharidů byly vyvinuty metodiky za použití různých forem tenkých vrstev sorbentů, a to hlavně:

- křemelinové podle *Stahla* a *Kaltenbacha* [5], směsi křemeliny a silikagelu [6];
- silikagelové podle *Preye et al.* [7], různě upravené silikagelové sorbenty [8];
- celulóзовé sorbenty [9, 10].

Řada výrobců doporučuje průmyslově zhotovené formy sorbentů s nosičem, nazývané „desky pro chromatografii na tenké vrstvě“.

Použití desek s celulóзовými sorbenty slučuje přednosti papírové chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě [11], a to: dobrá separace biologicky důležitých sacharidů, postačující kapacita sorbentů desek, jednoduchost a rychlost provádění.

Otázka stanovení zkvasitelných sacharidů a jiných štěpných produktů škrobu a neškrobových polysacharidů extraktu sladu v pivovarství je stále středem pozornosti předních pivovarských odborníků. O stanovení jednotlivých zkvasitelných sacharidů chromatografií na

tenké vrstvě v pivovarských meziproduktech a výrobcích referovala již řada autorů [12–15].

Schur, *Pfenniger* a *Narziß* [16] popsali metodiku stanovení jednotlivých zkvasitelných sacharidů sladiny a piva chromatografií na tenké vrstvě. Ve své práci uvedli a vzájemně posoudili variační koeficienty stanovení jednotlivých zkvasitelných sacharidů tenkovrstvou chromatografií a plynovou chromatografií.

Cílem naší práce bylo proto navržení vhodné metodiky stanovení jednotlivých sacharidů a jejich frakcí pomocí chromatografie na tenké vrstvě pro praktické využití ve výzkumné, laboratorní a kontrolní praxi.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Materiály

Sacharidy — D(+)glukóza p. a., D(–)fruktóza p. a., sacharóza p. a. a maltóza p. a. (n. p. Lachema)
Chemikálie — antron p. a., kyselina sírová p. a., aceton p. a., metanol p. a., kyselina mravenčí „konc.“ p. a., anilin, difenylamin, kyselina fosforečná „konc.“.

Přístroje

Spektrofotometr VSU-2 P, Carl Zeiss Jena, NDR
Glycerinová lázeň temperovaná na teplotu $95 \pm 0,1^\circ\text{C}$
Vodní lázeň temperovaná na teplotu $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Příprava vzorku: K 5 ml sladiny, mladiny nebo piva se přidá 15 ml metanolu [16]. Tato operace zaručuje vysrážení vysokomolekulárních extraktivních složek původ-

ního vzorku a zároveň jeho konzervaci na určitou dobu. Takto upravený vzorek se uchovává v chladničce asi při 4 °C. Před analýzou se vzorek zfiltruje analytickým papírovým filtrem s bílou páskou.

Chromatografické desky: DC-Alufolien Cellulose Merck, fy E. Merck AG, Darmstadt, NSR

Vyvíjecí směs: aceton : metanol : voda : kyselina mravenčí = 55 : 15 : 15 : 15 (obj.)

Detekční směs: 4 g anilinu, 4 g difenylaminu, 200 ml metanolu, 30 ml konc. kyseliny fosforečné [17]

Doba detekce: 5–10 min při 80 °C

Metodika vlastního stanovení sacharidů:

20 až 60 μ l metanolvého filtrátu analyzovaného vzorku (pro sladinu o koncentraci 8–10 % se používá 40 μ l) se nanáší přesně kalibrovanou mikropipetou na chromatografickou desku ve tvaru čárky dlouhé 20 mm. Na jednu desku je vhodné nanášet tři vzorky takto: startovní čára je 20 mm nad dolním okrajem desky, okrajové vzdálenosti jsou 20 mm, mezery mezi vzorky 15 mm. Vzorky jsou nanášeny v pořadí: vzorek, slepý vzorek, vzorek, vzorek pro detekční pruh, vzorek. Deska se pak vloží do chromatografické komory a vyvíjí se vzestupným způsobem tak dlouho, pokud čelo vyvíjecí soustavy nedosáhne 2 až 5 mm od horního okraje desky. Při stanovení obsahu maltotetraózy se desky vyvíjejí vždy po předchozím volném usušení dvakrát, maltopentaózy a maltohexaózy třikrát (obr. 1). Chromatogram se pak nechá 15 min volně uschnout na vzduchu. Z chromatogramu se odstříhne pruh určený pro detekci a detekuje se. Po volném usušení na vzduchu se tento pruh vloží na dobu 5 až 10 min do sušárny s teplotou 80 °C. Potom se podle něj ostrým rydlem vyznačí polohy skvrn jednotlivých sacharidů v ostatních pruzích, ty se vystříhnou a každá skvrna se pečlivě vloží do zábrusové zkumavky obsahu 15 ml. Totéž platí i pro slepý vzorek.

Sacharidy se eluují 5 ml redestilované vody (pro maltózu 10 ml) 15 min při teplotě 70 °C [16] za intenzivního protřepávání. Adsorbent se oddělí odsáváním na skleněné fritě S 4.

3 ml čirého eluátu se pipetují do zábrusové zkumavky obsahu 15 ml, přidá se 10 ml 0,1 % antronu v 85 % kyselině sírové — metoda podle *Yadavy et al.* [18]. Po rychlém promíchání se zkumavky vloží do termostátové glycerinové lázně s teplotou $95 \pm 0,1$ °C na dobu 20 min. Potom se během 3 min ochladí vodovodní vodou, další 2 min se temperuje za pohybu při 20 °C v termostátové vodní lázni a nejpozději do 15 min se změří absorbance při vlnové délce světla 625 nm.

Výpočet obsahu sacharidů

Sestrojení kalibračních křivek. Je vhodné použít takové koncentrace fruktózy, glukózy, sacharózy a maltózy v 75 % metanolu, aby eluci z chromatografických desek byl obsah jednotlivých sacharidů: 0,015 mg/ml, 0,030 mg/ml, 0,045 mg/ml, 0,060 mg/ml a 0,080 mg/ml.

Na osu X jsme nanášeli množství jednotlivých sacharidů v mg/3 ml a na osu Y hodnoty absorbance při vlnové délce světla 625 nm. Hodnoty koeficientů K kalibračních křivek jsou uvedeny v tab. 1. Vypočítávají se jako hodnota $\tan \alpha$, tj. úhlu kalibračních křivek = přímek jednotlivých sacharidů svírajících s osou X.

Tabulka 1. Koeficienty kalibračních křivek získané za podmínek metodiky

Sacharid	$K = \tan \alpha$
Fruktóza	2,76
Glukóza	3,08
Sacharóza	3,06
Maltóza	3,08

K výpočtu obsahu sacharidů jsme použili námi upraveného vztahu, dříve uvedeného *Schurem, Pfenningerem* a *Narzišem* [16]:

$$g \text{ sacharidu} / 100 \text{ ml} = \frac{a \cdot b \cdot 20}{K \cdot c \cdot 5 \cdot 3 \cdot 10} = \frac{a \cdot b}{K \cdot c} \cdot 0,133$$

kde: a je hodnota absorbance světla při vlnové délce 625 nm,

b — ml vody použité k eluci vzorku ze sorbentu (5 ml; 10 ml pro maltózu),

K — hodnota koeficientu kalibračních křivek,

c — ml metanolem upraveného vzorku použitého pro chromatografii na tenké vrstvě (CHTV),

5 — ml sladin, mladiny nebo piva použité k úpravě vzorku pro analýzu

20 — ml konečného metanolem upraveného vzorku

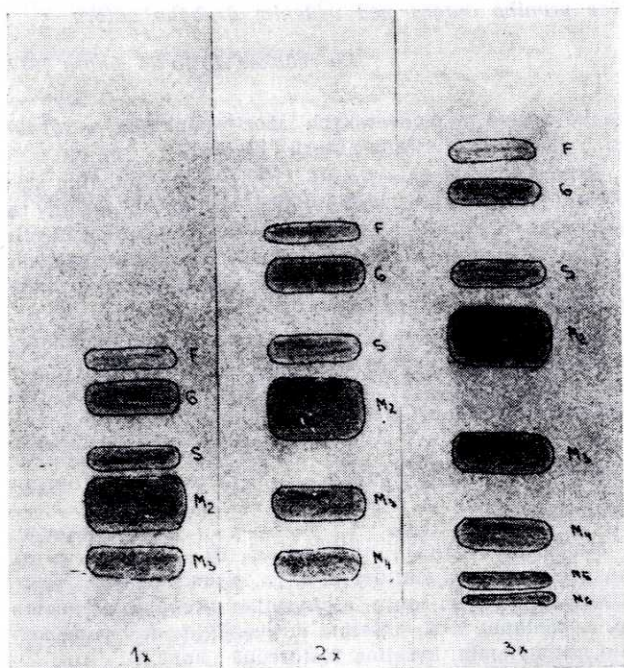
3 — ml eluátu pro spektrofotometrii,

10 — přepočítací faktor výsledku sacharidů na 100 ml původního vzorku.

Obsahy maltotriózy, maltotetraózy, maltopentaózy, maltohexaózy a vyšších oligosacharidů, resp. dextrinů se vyjadřují jako ekvivalent glukózy nebo maltózy (pro výpočet se používá hodnota $K = 3,08$); popřípadě se maltotetraóza a vyšší oligosacharidy mohou z ekvivalentu glukózy přepočítat faktorem 0,915 na „dextriny“ [19].

Výsledky a jejich diskuse

Reprodukovatelnost výsledků: Pro stanovení reprodukovatelnosti výsledků jsme použili kongresní sladinu o koncentraci 8,7 %. Hodnoty získané CHTV pro jednotlivé



Obr. 1. Příklad dělení a možnosti separace jednotlivých sacharidů sladin v závislosti na počtu opakovaného vyvíjení chromatogramu. Objem aplikovaného, metanolem upraveného vzorku: 40 μ l

Význam symbolů: 1x, 2x, 3x = vyvíjeno 1x, 2x 3x; F = fruktóza, G = glukóza, S = sacharóza, M = maltóza, M₃ = maltotrióza, M₄ = maltotetraóza, M₅ = maltopentaóza, M₆ = maltohexaóza

sacharidy jsou uvedeny v tab. 2 [každá hodnota je průměrem z 10 provedených analýz]. Matematicko-statistické zpracování výsledků jsme provedli podle Reisenauera [20].

Tabulka 2. Příklad stanovení reprodukovatelnosti analytických hodnot obsahu jednotlivých sacharidů kongresní sladiny za podmínek vypracované metodiky

Stanovené sacharidy	Průměr z 10 analýz [g/100 ml]	Směrodatná odchylka [g/100 ml]	Variační koeficient [%]	Interval spolehl. při 99% [g/100 ml]
Fruktóza	0,20	± 0,013	± 6,50	± 0,037
Glukóza	0,82	± 0,035	± 4,27	± 0,101
Sacharóza	0,37	± 0,021	± 5,68	± 0,061
Maltóza	3,56	± 0,060	± 1,68	± 0,147
Maltotrióza*	0,88	± 0,024	± 2,73	± 0,069
Celkový obsah analyticky stanovených zkvasitelných sacharidů	5,83	± 0,060	± 1,03	± 0,174
Maltotetraóza*	0,55	± 0,026	± 4,73	± 0,075
Maltopentaóza*	0,27	± 0,022	± 8,15	± 0,064
Maltohexaóza*	0,22	± 0,019	± 8,64	± 0,055
Celkový obsah analyticky stanovených oligosacharidů (M ₄ až M ₆)*	1,04	± 0,043	± 4,14	± 0,124
Celkový obsah analyticky stanovených dextrinů (sacharidy nad M ₆)*	1,58	± 0,059	± 3,73	± 0,170

* Vydána jako ekvivalent glukózy

Tabulka 3. Porovnání získaných variačních koeficientů analytických hodnot hlavních zkvasitelných sacharidů sladiny podle metody Schura, Pfenningera a Narziše [16] a naší metody (BM)

Stanovené sacharidy	Variační koeficienty		
	(%) CHTV (16)	(%) PCH (16)	(%) CHTV (BM)
Fruktóza	± 10,90	± 9,50	± 6,50
Glukóza	± 4,50	± 3,80	± 4,27
Sacharóza	± 15,40	± 3,10	± 5,68
Maltóza	± 1,90	± 1,50	± 1,68
Maltotrióza	± 4,70	± 4,10	± 2,73

CHTV — metoda chromatografie na tenké vrstvě
PCH — metoda plynové chromatografie

Výsledky námi získané při stanovení jednotlivých zkvasitelných sacharidů mají lepší stupeň reprodukovatelnosti než výsledky publikované Schurem, Pfenningem a Narzišem [16]; naše údaje se svou reprodukovatelností blíží jejich hodnotám získaným plynovou chromatografií (tab. 3).

Hodnoty takto stanovených jednotlivých zkvasitelných sacharidů jsou zatíženy chybou relativně malého podílu (± 0,1—0,5 %) ostatních monosacharidů a oligosacharidů (převážně nezkvasitelných), které jsou součástí extraktu sladin, mladín a piv — blíže viz cit. [21, 22].

Rychlost, vyhovující přesnost, jednoduchost provedení a přístrojová nenáročnost popsané metodiky jsou jejími hlavními přednostmi. Lze jí např. dobře studovat vývoj obsahu zkvasitelných sacharidů v celém pivovarském procesu. Umožňuje sledovat obsah jednotlivých sacharidů z hlediska významu pro zdárný technologický proces — blíže viz cit. [23].

Literatura

- [1] ISMAILOV, N. A., SCHREIBER, M. S.: Farmatziya 3, 1938, 1
- [2] STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie, 2. Auflage. Springer, Berlin, 1967
- [3] LÄBLER, L. a spol.: Chromatografie na tenké vrstvě. Academia, Praha, 1965
- [4] SHELLARD, J.: Količestvennaja chromatografija na bumage i v tonkom sloje, Mir, Moskva, 1971
- [5] STAHL, E. KALTENBACH, U.: J. Chromatog. 5, 1961, s. 351
- [6] HUBER, C. N., SCOBELL, H., HAN TAI.: Cer. Chem. 43, 1966, s. 342
- [7] PREY, H., BERBALK, H., KRUSZ, M.: Microchim. Acta 1961, s. 968
- [8] WALDI, D., STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer, Berlin, 1962, s. 473
- [9] DAMONTE, A et al.: J. Chromatog. 60, 1971, s. 203
- [10] HOTON-DORGE, N.: J. Chromatog. 116, 1976, s. 203
- [11] DUCKWORTH, M., YAPHE, W.: J. Chromatog. 49, 1970, s. 335
- [12] STOCKER, H. H.: Schweiz. Brau. Rdsch. 74, 1963, s. 231
- [13] BRACHER, C. G., BANLY, L. E.: Brew. Guild J. 51, 1965, s. 67
- [14] FRANKEN-LUYKX, J. M. M., KLOPPER, N. J.: Brauwiss. 20, 1967, s. 173
- [15] KLEBER, W., KLOEFFER, J.: Brauwiss. 21, 1968, s. 81
- [16] SCHUR, F., PFENNINGER, H., NARZIŠ, L.: Schweiz. Brau. Rdsch. 84, 1973, s. 93
- [17] BUCHAN, J. L., SAVAGE, R. L.: The Analyst 77, 1952, s. 401
- [18] YADAV, K., WEISSLER, H., GARZA, A and GURLEY, J.: A. S. B. G. Proceedings, 1969, s. 59
- [19] MOŠTEK, J.: Analytické metody ke cvičení z kvasné chemie a technologie, I. Sladářství a pivovarství (Skripta VŠCHT Praha). SNTL Praha, 1973
- [20] REISENAUER, R.: Metody matematické statistiky. SNTL-Práce, Praha, 1965
- [21] DYR, J., MOŠTEK, J.: Kvas. prům. 4, 1958, s. 121
- [22] DYR, J., MOŠTEK, J.: Kvas. prům. 4, 1958, s. 169
- [23] BAČVAROV, V. Ch., MOŠTEK, J.: Sborník VŠCHT Praha, Potravinářství, E 49, 1977 (v tisku)

Bačvarov, V. Ch., Mošek, J.: Využití chromatografie na tenké vrstvě v pivovarské analytice ke stanovení zkvasitelných a jiných sacharidů

Kvas. prům. 23, 1977, č. 6, s. 121—124.

Popsanou metodikou lze stanovit zkvasitelné sacharidy sladin, mladín a piv pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Obsah jednotlivých sacharidů se vyhodnocuje spektrofotometricky za použití antrónového činidla. Metodika je poměrně rychlá, rozdělení zkvasitelných sacharidů fruktózy, glukózy, sacharózy, maltózy a maltotriózy trvá přibližně 2 h. Přitom byly stanoveny tyto variační koeficienty: fruktóza ± 6,50 %, glukóza ± 4,27 %, sacharóza ± 5,68 %, maltóza ± 1,68 %, maltotrióza ± 2,73 %. Metodika umožňuje také stanovit glukózové oligosacharidy s polymeračním stupněm 4 až 6 a soubor vyšších oligosacharidů, resp. dextrinů; její využití je obecné.

Ба́чваров, В. Х. — Мо́шек, И.: Применение тонкослойной хроматографии в лабораториях пивоваренной промышленности для определения содержания ферментирующихся и других сахаридов. Квас. прум. 23, 1977, № 6, стр. 121—124.

В статье приведен метод определения содержания сбраживающихся сахаридов в сусле, охмеленом сусле и пиве с помощью тонкослойной хроматографии. Содержание отдельных сахаридов определяется спектрофотометрически посредством применения антронового реактива. Анализ требует сравнительно мало времени и определение сбраживающихся сахаридов фруктозы, глюкозы, сахарозы, мальтозы и мальтотриозы занимает примерно 2 часа. Из результатов экспериментов были выведены следующие коэффициенты вариации: фруктоза ± 6,50 %; глюкоза ± 4,27 %; сахароза ± 5,68 %; мальтоза ± 1,68 %; мальтотриоза ± 2,73 %. Метод дает также возможность определения глюкозных олигосахаридов со степенью полимеризации от 4 до 6 а также группы высших олигосахаридов и декстринов. Метод, следовательно, отличается значительной универсальностью.

Bačvarov, V. Ch. - Moštek, J.: Application of Thin-layer Chromatography in the Laboratories of Brewing Industry for the Determination of Fermentable and Other Saccharides. Kvas. prům., 23, 1977, No. 6, pp. 121—124.

The thin-layer chromatography can be applied to advantage to the determination of fermentable saccharides in sweet wort hopped, wort, and beer. The percentage of individual saccharides is found by using spectrophotometry and anthrone reagent. The described method saves time, since the determination of fructose, glucose, saccharose, maltose and maltotriose takes roughly 2 hours. The variation coefficients were as follows: fructose $\pm 6,50\%$; glucose $\pm 4,27\%$; saccharose $\pm 5,68\%$; maltose $\pm 1,68\%$; maltotriose $\pm 2,73\%$. The method can be applied also for the determination of glucose oligosaccharides with polymerization degree from 4 to 6 and higher oligosaccharides or dextrans. Its application field is therefore very wide.

Bačvarov, V. Ch. - Moštek, J.: Anwendung der Dünnschichtchromatographie in der Brauereianalytik zur Bestimmung der vergärbaren und anderen Saccharide. Kvas. prům. 23, 1977, No. 6, S. 121—124.

Die beschriebene Methodik ermöglicht die Bestimmung der vergärbaren Saccharide in ungehopften Würzen, Würzen und Bieren bei Applikation der Dünnschichtchromatographie. Der Gehalt der einzelnen Saccharide wird spektrophotometrisch bei Anwendung des Anthron-Reagens ausgewertet. Die Methodik ist verhältnismäßig schnell, die Aufteilung der vergärbaren Saccharide Fruktose, Glukose, Saccharose, Maltose und Maltotriose dauert ungefähr 2 Stunden. Dabei wurden die folgenden Variationskoeffizienten ermittelt: Fruktose $\pm 6,50\%$, Glukose $\pm 4,27\%$, Saccharose $\pm 5,68\%$, Maltose $\pm 1,68\%$, Maltotriose $\pm 2,73\%$. Die Methodik ermöglicht weiter auch die Bestimmung der Glukose-Oligosaccharide mit dem Polymerisationsgrad 4 bis 6, und des Komplexes der höheren Oligosaccharide, bzw. Dextrine; die Anwendung der Methode ist also allgemein.