

## I. Analytické aspekty některých technologicky významných komponent

Ing. JAN KUBÍČEK, CSc. - Ing. MIROSLAV VANČURA, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Do redakce došlo 15. 5. 1977

Teprve v období posledních 20 až 25 let se ukázalo, jak komplikovaná a rozsáhlá je chemie hořkých chmelových látek. Toto období zvýšeného zájmu chemiků o složení chmelových pryskyřic a jejich změny v průběhu pěstování a skladování chmele i v průběhu technologického procesu chmelovaru se datuje zhruba od konce čtyřicátých a počátku padesátých let. Za určitý mezník v daném smyslu lze považovat rok 1952, kdy *Rigby* a *Bethune* [1] za použití protiproudé analýzy prokázali, že izohumulon, tak jak je běžným preparačním postupem získán, není chemickým individuem, ale obsahuje ještě další složky. Byly prokázány analogy izokohumulonu a izoadhumulon, odpovídající analogům humulonů, kohumulonu a adhumulonů. Dnes je známo zatím sedm analogů humulonů a sedm lupulonů, které se liší vzájemně pouze postranním acylovým radikálem na druhém uhlíku cyklického jádra. Uvážíme-li, že vzhledem k izomerii jádra existují od každého analogu dva stereoizomery (izohumulon A a izohumulon B), skládají se z tohoto hlediska izohumulony ze 14 složek. V roce 1965 byl však objeven další typ izohumulonů, kde dvojná vazba v  $\alpha$  —  $\beta$  pozici v izohexenoylovém radikálu je přesunuta do pozice  $\beta$  —  $\gamma$ . Tyto nově charakterizované látky označil *Verzele et al.* [2] jako allo-izohumulony. Podobně jako izohumulony se tedy skládají ze 14 složek. Protože se však předpokládá, že přesunem dvojných vazby u nich vzniká další řada stereoizomerů, musí allo-izohumulony teoreticky obsahovat 28 složek. Z tohoto hlediska obsahuje skupina izohumulonů teoreticky 42 složek. Tento počet se ovšem mnohonásobně zvýší, uvážíme-li existenci allo-, cis- a trans-izomerů u skupin apo-, spiro- a nor-izohumulonů, které vznikají ze základních analogů během chmelovaru, event. při výrobě izomerovaných chmelových extraktů. Dalšími složkami resuponů, které sem lze zařadit, jsou produkty cyklizace: bicyklické pseudoizohumulony a tricyklické abeoizohumulony, popsané *Verzelem et al.* [3, 4].

Není samozřejmě smyslem tohoto pojednání vypočítávat a charakterizovat složky chmelových pryskyřic. To je velmi komplikovaný úkol pro početný tým pracovníků vysoce fundovaných v oboru syntézy a analytiky organických látek a strukturní analýzy a vybavených nejmodernější laboratorní technikou, včetně přístrojů pro IR- a NMR-spektroskopii. Stručným výčtem složek této jedné skupiny chmelových pryskyřic (izohumulonů) chceme jen naznačit, před jak obtížný úkol je postaven chemik, který má podrobněji analyzovat a charakterizovat složení chmelových pryskyřic, ať už v surovině (chmelu nebo chmelovém preparátu), nebo v mladině či hotovém pivu.

O analytických postupech pro stanovení hořkých chmelových látek už bylo napsáno velmi mnoho. Podstatná část navrhovaných metod se omezovala do nedávna na stanovení nejdůležitější složky chmelových pryskyřic — humulonů. Na bázi optické aktivity humulonů byla vypracována metoda polarimetrická [5]. *Alderton et al.* [6] vypracovali metodu spektroskopickou, která však nedává příliš spolehlivé výsledky vzhledem ke korekcím, které kolísají hlavně v závislosti na stáří analyzovaného chmele. Lze říci, že největšího uplatnění a rozšíření dosáhly metody využívající tvorby nerozpustných komplexů humulonů s ionty kovů — pře-

devším humulonátu olovnatého. Jde o metodu gravimetrickou, která je součástí klasické Wöllmerovy metody analýzy chmele (přímé vážení odfiltrované, promyté a vysušené sedimenty humulonátu olovnatého) a dále o dnes nejvýznamnější z těchto postupů — metodu konduktometrické titrace. Skutečností zůstává, že i konduktometrická titrace dává výsledky, které se vzájemně více či méně liší podle toho, která z řady modifikací této metody je použita. Vedle koncentrace použitého titračního činidla (metanolvý roztok octanu olovnatého) má např. vliv rychlost titrace. Příliš pomalá titrace vede k vyšším výsledkům, podobně jako titrace rychlá, kdy často snímané hodnoty vodivosti neodpovídají skutečnému stavu roztoku a odečítaným hodnotám spotřeby titračního činidla. Je třeba si také uvědomit, že s použitým octanem olovnatým reagují i další složky pryskyřic, rozpustné v použitém metanolu, zejména izohumulony, které ve srovnání s humulony spotřebují pouze poloviční množství octanu a dále i některé oxidační produkty  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin, které jsou snad již součástí tvrdých pryskyřic. *Verzele* a *van Dyck* [7] zjistili, že optimální, pro relativně čistou separaci a vytitrování humulonů, je vytřepání materiálu (chmel, chmelový extrakt) směsí toluenu a pufru pH 7,0. Tak se všechny kyseléjší složky, jako např. izohumulony a zmíněné oxidované podíly odstraní z organické fáze a přejdou do pufru. Dnes je známa řada modifikací konduktometrického stanovení obsahu humulonů, nicméně všechny tyto metody ve větší či menší míře titrují spolu s humulony i další pryskyřičné složky. Zvláště u starších chmelů jsou výsledky konduktometrické analýzy již značněji rozdílné od skutečného obsahu humulonů. V praxi se obvykle dnes už neuvádějí takto získané výsledky jako obsah humulonů, ale jako tzv. konduktometrická hodnota chmele nebo extraktu, bez bližšího označení. Tato hodnota, získávaná dnes už většinou na automatických titračních zařízeních (firma Metrohm), charakterizuje z hlediska praxe pivovarskou hodnotu relativně čerstvých, sušením nepoškozených chmelů právě tak dobře, jako přesnější údaje o obsahu humulonů, získané daleko komplikovanějšími a náročnějšími separačními metodami. Je třeba zdůraznit, že podle výsledků konduktometrické metody je možno posuzovat pouze chmely čerstvé, nepoškozené nevhodným zpracováním nebo skladováním. U starších chmelů není již pivovarská hodnota závislá tak výrazně na obsahu humulonů a lépe ji vystihuje obsah měkkých pryskyřic.

Podobná jako u humulonů je do jisté míry situace při zjišťování obsahu izohumulonů, jak v surovinách (chmel, chmelové extrakty), tak v mladinách nebo hotových pivech. V roce 1955 navrhl *Klopper* [8] známou extrakční metodu pro stanovení izohumulonů v pivu, event. v mladině. Podstatou je extrakce nepolárním rozpouštědlem — izooktanem z okyseleného vzorku mladiny nebo piva. Obsah „izohumulonů“ se stanoví spektrofotometricky proti použitému, spektrálně čistému izooktanu při 275 nm. Na stejném principu s většími nebo menšími odchylkami se zakládají i metody *Rigbyho-Bethuneova* [9], *Moltkeho-Meigaardova* [10] a *Brennerova* [11]. Podobná situace jako při stanovení humulonů se vyskytla i zde, když bylo zjištěno, že do izooktanové fáze nepřecházejí zdaleka jenom izohumulony, ale celé spektrum dalších složek,



kteří rovněž absorbují při použité vlnové délce (275 nm) a ovlivňují tak měřenou extinkci. Postupně se proto přecházelo na blíže nevymezený pojem „izosloženiny“, „izosložky“ jako látky stanovené za podmínek té které metody. Dnes se už všeobecně vyjadřuje hořkost piva, popř. mladiny v uzančních evropských, popř. mezinárodních jednotkách hořkosti. Evropské jednotky hořkosti (EBU) se počítají jako 50násobek extinkce naměřené při 275 nm, mezinárodní jednotky (IBU) se odečítají podle změřené extinkce z tabulek [Analytika EBC]. Z uvedených důvodů nelze použít těchto metod pro stanovení izohumulonů v mladínách či v částečně izomerovaných extraktech, které z jakéhokoli důvodu obsahují větší množství dosud nepozměněných původních humulonů a izohumulonů vedle sebe. Určitou šanci v tomto směru dává metoda *Rigbyho-Barsova* [12], která umožňuje alespoň orientační stanovení humulonů a izohumulonů vedle sebe. V podstatě se postupuje podobně jako u popsaných metod, ale izooktanový extrakt se protřepe navíc s kyselým metanolem. Po oddělení se izooktanový podíl smísí s alkalickým metanolem a měří se extinkce při 255 a 360 nm. Výpočtem se potom stanoví obsah obou složek.

Otázkou, jakým množstvím se podílí na hořkosti piva tzv. „izohumulonová skupina“ a jakým zbývajícím hořké látky neizohumulonového charakteru, se zabývali japonští autoři *Kuroiwa* a *Kokubo* [13]. Konstatují na uvedených příkladech, že z 25 jednotek hořkosti (EBU) je 23 jednotek odvozeno z izohumulonové skupiny a pouze zbývajících dvě jednotky z látek neizohumulonového charakteru, pokud je pivo vyráběno z čerstvého chmele. Naproti tomu hořkost piva z chmele starého, do jisté míry znehodnoceného, byla (při stejném chmelení) 22 EBU, přičemž podíl izohumulonové hořkosti byl pouze 8 EBU a neizohumulonové 14 EBU. Je obecně známo, že hořčící schopnost látek neizohumulonového charakteru se zvyšuje úměrně s rostoucím stupněm oxidace. Složení této skupiny látek není srovnání s izohumulonovou frakcí zdaleka tak dobře prozkoumáno. Dřívější studie ukázaly, že neizohumulonové složky obsahují především xantohumol [14], lupulony [15, 16] a 5-izopentylhumulinovou kyselinu [17] — odvozené z lupulonů, dihydroxyizohumulony [18] odvozené z humulonů, dále se skládají z tzv. druhého oxidačního produktu zjištěného *Ashurstem et al.* [19] sedmi druhů oxidačních produktů izohumulonů zjištěných *Vanhoeyem et al.* [20] a ze zbývajících humulonů samotných [21]. *Kuroiwa* a *Kokubo* [13] zjistili pět dalších nových složek odvozených z lupulonů v neizohumulonové frakci a nazvali je lupoxes a, b, c a lupdoxes a, b. Krátce na to byly nalezeny další dvě složky — lupdep a lupdol [22]. Zatím se tedy rozeznává 20 složek této neizohumulonové frakce. Protože všechny tyto komponenty mohou (s výjimkou xantohumolu) existovat podle druhu acylového radikálu na druhém uhlíku jádra jako 7 analogů, lze z 19 z nich odvodit 133 teoretických derivátů. Počet se ovšem znova mnohonásobně zvětší, zahrneme-li i jejich stereoizomery. Kromě toho je nutno uvažovat, že známé složky reprezentují bezpochyby jen část látek neizohumulonové frakce, a že se předpokládá existence většího počtu dosud neidentifikovaných látek. Hlavní důvod, proč mnoho těchto komponent dosud není identifikováno, je ovšem relativní nedostatek vhodných, citlivých metod pro systematickou separaci látek tak podobného charakteru a strukturního uspořádání. V poslední době se dosahuje nejúspěšnější separace jednak deskovou chromatografií, jednak chromatografií na iontoměničích. *Kokubo et al.* [23] rozdělili chromatografií již 90 složek chmelových pryskyřic. Jeden z úseků tohoto postupu jsme po úpravě použili v naší laboratoři pro hodnocení preizomerovaných extraktů, o čemž bude pojednáno v dalším článku.

Uvedené pojednání si samozřejmě zdaleka nedělá nárok na úplnost ve smyslu charakteristiky skupin chmelových pryskyřic nebo přehledu analytických metod používaných pro jejich stanovení. To nebylo ani jeho smyslem.

Snahou bylo podat stručný nástin vývoje představ a poznatků v oblasti hořkých chmelových látek, zejména humulonů a izohumulonů v posledních letech, v návaznosti na možnosti analytického stanovení a s přihlédnutím k jednoduchým analytickým metodám používaným i v praxi při hodnocení chmele a chmelových výrobků, popř. mladiny a piva.

**Kubíček J. - Vančura M.: Chmelové pryskyřice. I. Analytické aspekty některých technologicky významných komponent.** Kvas. prům. 23, 1977, č. 10, s. 226—232.

Stručnou formou jsou nastíněny problémy spojené s analytickým stanovením některých technologicky významných složek chmelových pryskyřic, event. jejich transformačních produktů, zejména humulonů a izohumulonů. Pozornost je věnována zejména stanovení konduktometrické hodnoty chmele a chmelových výrobků a spektrofotometrickému stanovení izosložek mladiny a piva. Jsou uvedeny vlastní zkušenosti i názory autorů na oblast použití a specifičnost metod a na podíl některých komponent na hořkosti piva. Stručně jsou vyčísleny složky izohumulonové a neizohumulonové hořčící frakce.

**Кубичек, Я. — Ванчура, М.: Смолы хмеля. 1-ая часть. Аналитическое определение некоторых составляющих, имеющих значение в производственной технологии.** Кvas. прум. 23, 1977, № 10, стр. 226—232.

Авторы отмечают проблемы, связанные с аналитическим определением некоторых составляющих, входящих в смолы хмеля и продуктов их преобразования, главным образом гумулонов и изогумулонов. Уделяется внимание определению кондуктометрических свойств хмеля и изделений из него а также спектрофотометрическому определению изосоставляющих суслу и пива. Авторы статьи сравнивают свой опыт с взглядами других авторов на разные аналитические методы, область их рационального применения и на влияние некоторых составляющих хмеля на горький вкус пива. Приведено содержание изогумулоновой и не-изогумулоновой группы в горьком веществе хмеля.

**Kubíček J. - Vančura M.: Hop Resins. Part I. Analytic Determination of Some Components Important in Brewing Technology.** Kvas. prům. 23, 1977, No. 10, pp. 226—232.

The authors outline briefly a number of problems connected with the analytic determination of some components of hop resins and of their transformation products, especially of humulones and isohumulones. All these components play an important role in brewing processes. A special attention is paid to the determination of conductometric properties of hops and hop products, as well as to spectrophotometric determination of isocomponents of wort and beer. Opinion of several other authors on the effects of some hop components upon the taste of beer, on analytic methods and conditions under which they should be used, is confronted with the experience of authors. Shares of isohumulone and non-isohumulone components of hop bitter substances are specified.

**Kubíček J. - Vančura M.: Hopfenharze. I. Die analytischen Aspekte einiger technologisch wichtiger Komponenten.** Kvas. prům. 23, 1977, No. 10, S. 226—232.



Zusammenfassend werden die Probleme behandelt, die mit der analytischen Bestimmung einiger technologisch wichtiger Bestandteile der Hopfenharze, bzw. ihrer Transformationsprodukte, insb. der Humulone und Isohumulone zusammenhängen. Die Aufmerksamkeit wird vor allem der konduktometrischen Bestimmung des Hopfenwertes bei Hopfen und Hopfenerzeugnissen und der spektrofotometrischen Bestimmung der Iso-

komponenten der Würzen und Biere gewidmet. In dem Artikel sind weiter auch die eigenen Erfahrungen und Ansichten der Autoren auf dem Gebiet der Applikation und Spezifität der Methoden angeführt, sowie auch zu der Frage des Anteils der einzelnen Komponenten an der Bitterkeit des Bieres. Zusammenfassend werden auch die Bestandteile der Isohumulone- und Nichtisohumulone-Bitterfraktion angeführt.