

### II. Příspěvek k analytice izomerovaných chmelových extraktů

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

V rámci výzkumného úkolu jsme byli v naší laboratoři postaveni před problém analytického hodnocení částečně, popř. zcela izomerovaných chmelových extraktů. Alkalickým, event. katalytickým působením za tepla byla připravena řada částečně izomerovaných extraktů, při jejichž výrobě se vycházelo většinou z běžného chmelového extraktu standardního typu. Tyto vzorky byly potom porovnány s belgickým průmyslovým preparátem „Isopal“, vyráběným firmou PRB.

Pro náš úkol — kontrolu složení připravených, částečně izomerovaných extraktů, vyplynul požadavek na metodu, která by umožnila stanovit izohumulony vedle dosud přítomného, event. i značnějšího množství humulonů, které z jakéhokoliv důvodu nedokonalé izomerace jsou dosud obsaženy v materiálu. Další, třetí složkou, která stojí v popředí zájmu při analýze a hodnocení izoextraktů, jsou kyseliny humulinové, které někteří autoři považují za ztrátové složky, jiní, se zřetelem na jejich údajně nepříznivé senzorké vlastnosti dokonce za škodlivé. Z posledních prací jsou to zejména *Difford et al.*; [22], kteří se zabývají podrobně vlastnostmi a podmínkami vzniku kyselin humulinových. Konstatují na základě ionexové chromatografie, že kyseliny humulinové jsou přítomny ve všech pivech, bez zřetele na způsob chmelení. Autoři se domnívají, že se tvoří vždy, když probíhá izomerace humulonů, bez zřetele na to, jde-li o přípravu izoextraktů v alkalickém prostředí, působením katalyzátorů, nebo o běžnou reakci v průběhu chmelovaru v mírně kyselém prostředí vroucí mraťadiny. Na základě experimentálních dat uvádějí, že kyseliny humulinové nepřispívají nijak významně k hořkosti piva a neovlivňují negativně jeho koloidní stabilitu.

Shrňme-li stručně předchozí fakta a úvahy, je zřejmé, že pro detailnější posouzení kvality a vydatnosti izoextraktu je nutno zvolit vhodnou metodu, která umožní stanovit alespoň zmíněné tři složky (humulony, izohu-

mulony a kyseliny humulinové) vedle sebe. Takových metod, které splňují uvedený požadavek, je řada, ovšem ne všechny jsou pro nás dostupné se zřetelem na předpokládané zařízení, adsorbenty, ionexy a chemikálie a také ne všechny jsou zřejmě (jak jsme se v některých případech přesvědčili), dosti seriózní. Jen stručně, ze známějších metod jsou to — papírová chromatografie [25], chromatografie v tenké vrstvě [40, 41] a protiproudá analýza — CCD [42–45], přičemž poslední jmenovaná CCD, je dnes uznávána většinou za metodu referenční, srovnávací. Zmiňujeme-li se již o této metodě v této souvislosti, je třeba připomenout, že jde o postup časově velmi náročný, vyžadující nákladné zařízení, při značné spotřebě drahých, spektrálně čistých rozpouštědel. Svého času byla dělana dosti velká reklama Verzeleho chromatografii na prouzcích chromatografického papíru [25] impregnovaného pufrů v pořadí pH 3,0; 5,0; 6,8; 10,0 a 11,0. Proužky papíru se po kondicionování a nanesení vzorku vyvíjely v izooktanu. Složky zachycené v jednotlivých pufrových zónách se detekují pod UV-lampou a po vystřížení a vymytí se stanoví kvantitativně proměřením na spektrofotometru. Ve skutečnosti je tato zdánlivě jednoduchá metoda značně náročná, zejména ve stádiu přípravy chromatografického papíru a úpravy pufrůvaných sektorů. Výsledky získané tímto postupem nevynikají obvykle zvlášť dobrou reprodukovatelností. Kromě toho je problematické dělení izohumulonů a humulinových kyselin, které obojí zůstávají v zóně pH 6,8. Rovněž pracovníci Výzkumné pivovarské stanice v Mnichově *Kleber, Hartl a Hums* [46–49] vyvinuli několik postupů, které umožňují stanovení humulonů a lupulonů, popř. vedle izohumulonů sloupcovou nebo deskovou chromatografií. První z nich byla před časem v ústavu odzkoušena [50] a bylo zjištěno, že za určitých podmínek dává vcelku dobře reprodukovatelné výsledky.

Během práce na uvedeném výzkumném úkolu jsme



měli možnost ověřit si několik metod, které by připadaly v úvahu pro analytické sledování a posouzení částečně i zcela izomerovaných chmelových extraktů. V přehledu je uveden stručný popis a zhodnocení čtyř analytických metod, které se nám zdály pro hodnocení izoextraktů nejvíce perspektivní.

#### Metoda Woodova-Lloydova-Whitearova [51]

Roztok izoextraktu v metanolu se zředí destilovanou vodou (2:250). Metoda vychází v podstatě z původní metody *Rigbyho-Bethuneovy* [9] a je použitelná pouze pro izoextrakty zcela izomerované, používané pro studené chmelení, to znamená pro preparáty obsahující prakticky čisté izohumulony, vedle zcela nepatrných množství ostatních pryskyřičných komponent.

#### Metoda Musscheho-Franianova [52]

Odvážené množství vzorku se rozpustí v metanolu a alikvotní podíl se smísí s 0,5 M fosfátovým pufrům pH 7,45. Pro odstranění vlivu iontů železa se přidává malé množství silné kyselého katechu v síranové formě. Tato soustava se potom extrahuje izooktanem. Pro oddělení fází se zpracovává spodní pufrová vrstva podobně jako v popsané metodě, tj. po okyselení se extrahuje izooktanem a po přetřepání s kyselým metanolem se proměří spektrofotometricky.

V popsané metodě Wooda et al., je izoextrakt rozpuštěn ve směsi metanolu a vody. Po okyselení se roztok extrahuje izooktanem a tento izooktanový roztok se ještě dále přečistí kyselým metanolem. Tato poslední operace však těžko může odstranit zbytky humulonů, lupulonů, chlorofylu, popř. dalších složek, které interferují při měření extinkce v předepsané vlnové délce. V novém postupu proto navrhli Mussche a Franianu smístit metanolový roztok izoextraktu s pufrům pH 7,45. Tento roztok je potom extrahován izooktanem. Chlorofyl, humulony a lupulony přecházejí do organické fáze a pufrový podíl, obsahující již značně přečištěné izohumulony se po okyselení zpracovává v podstatě dále podle metody Wooda et al. Postup je tedy použitelný pro stanovení izohumulonů v preparátech obsahujících popřípadě i určité množství humulonů a lupulonů, event. chlorofylu.

#### Grantova metoda postupné pufrové extrakce (Sequential buffer extraction) [53]

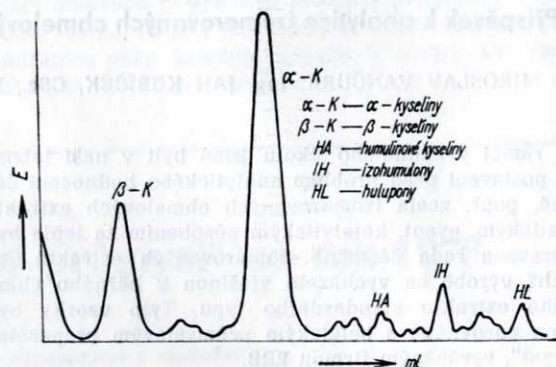
Princip metody záleží v tom, že hořké látky z metanolového roztoku extraktu se po okyselení přetřepou do izooktanu a z takto získaného základního izooktanového roztoku pryskyřic se postupně, pufrů o zvyšujícím se pH, izolují jednotlivé komponenty. Nejprve pufrům pH 3,5 se vytřepou ze základního roztoku kyseliny humulinové. Z pufru se potom opět přetřepou do izooktanu a spektrofotometricky proměří při 280 nm. Podobně pufrům pH 7,6 se oddělí izohumulony, pufrům pH 10 humulony a ve zbytku po extrakci všemi pufrů se stanoví lupulony. Podle údajů autorů byla účinnost separace za daných podmínek sledována deskovou chromatografií a konstatováno, že oddělení jmenovaných hlavních komponent chmelových pryskyřic je velmi dobré. Frakce kyselin humulinových obsahuje údajně „...několik podružných oxidačních produktů, ale tak je tomu i tehdy, je-li separována protiproudou extrakcí nebo jinou přesnější separační technikou“.

V daném případě (kontrola složení izoextraktů) byly výsledky získané tímto postupem poměrně dobře reprodukovatelné a dobře se shodovaly s hodnotami získanými ionexovou chromatografií. Metoda je poměrně rychlá a celkem jednoduchá, ovšem podstatnou její nevýhodou

je vysoká spotřeba drahého, spektrálně čistého izooktanu (asi 600 ml na jedno stanovení u izomerovaných extraktů).

#### Ionexová chromatografie [54]

Bylo použito Dowexu 1 X 4 (200/400 mesh), silně bazického anexu s kvartérními aminoskupinami v Cl<sup>-</sup> formě. Ionex byl plněn do chromatografické kolony o průměru 7 mm do výše asi 10 cm a převeden přes OH<sup>-</sup> formu do acetátové formy. Po promytí sloupce 80% metanolem se na kolonu nanese metanolový roztok analyzovaného vzorku pryskyřic a jednotlivé frakce (lupulony, humulony, kyseliny humulinové, izohumulony a lupulony) se postupně vymývají kyselinou octovou, rostoucí koncentrací v 80% metanolu. Vzhledem k tomu, že ionex má velmi jemné zrnění, neprotékají eluční roztoky kolonou samospádem. Autoři doporučují přivádět roztoky pod tlakem asi 0,05 MPa, čímž se dosáhne předepsaného průtoku kolonou 2 až 3 ml/min. Pokud není k dispozici čerpadlo osazené těsněním z naprosto inertního materiálu, lze event. použít stlačeného plynu z ocelové láhve, který se přivádí nad kapalinu do hlavy kolony. Eluáty na výtok z kolony byly jímány v automatickém sběrači frakcí do zkumavek po 5 ml. Získané eluční křivky ukázaly, že doporučené objemy promývacích a elučních roztoků kyseliny octové vcelku vyhovují, ovšem za předpokladu dodržení předepsaných parametrů kolony a jistých limitních hodnot koncentrací jednotlivých pryskyřičných komponent.



Obr. 1. Chromatogram pryskyřičného koncentráту

Pro ilustraci uvádíme tabulku porovnání výsledků ionexové chromatografie standardního extraktu, pokusného alkalického izomerátu a průmyslově vyráběného izoextraktu (Isopal, PRB Belgie).

	Standardní extrakt	Pokusný izomerát	Isopal (PRB, Belgie)
Humulony	6,8	1,3	stopa
Kyseliny humulinové	0,3	0,5	0,7
Izohumulony	2,4	8,6	19,7
Lupulony	0,3	0,9	1,1

Porovnáme-li výsledky uvedené v tabulce, je zřejmé, že účinkem alkalického zásahu při izomeraci se zvýšil obsah kyselin humulinových, z 0,3 na 0,5 %. U Isopalu bylo nalezeno dokonce 0,7 % kyselin humulinových, ovšem je třeba si uvědomit, že jde o značně zkoncentrovaný preparát, obsahující téměř 20 % izohumulonů. Vztáhneme-li potom obsah kyselin humulinových na obsah izohumulonů, dostaneme u Isopalu asi 4 % a u pokusného alkalického izomerátu 5,5 %. Přestože rozdíl není značný, je obsah kyselin humulinových u Isopalu nižší. Poloha křivek kyselin humulinových a izohumu-



lonů na chromatogramech a kvalita jejich dělení na sloupce byla ověřena použitím standardů obou složek.

Z našeho hlediska je snad zajímavé i porovnání výsledků získaných u téhož vzorku pokusného alkalického izomerátu Grantovou metodou a ionexovou chromatografií.

Výsledky podle Granta (metoda SBE):

humulony . . . . .	2,0 %
izohumulony . . . . .	8,7 %
kyseliny humulinové . . . . .	1,0 %

Z porovnání obou metod vyplývá (podle očekávání), že hrubší metoda Grantova dává v porovnání s ionexovou chromatografií vyšší výsledky u méně zastoupených složek (humulony, kyseliny humulinové), do jejichž frakci (pufrů pH 3,5 a 10,0) přecházejí nepochybně některé další pryskyřičné komponenty, které vlastně Grantovo schéma nerespektuje. Obsah izohumulonů podle obou metod je téměř stejný a řada výsledků potvrdila, že pro tento účel (analýza izoextraktů) je Grantova metoda zcela postačující.

#### Literatura

- [1] RIGBY, F. - BETHUNE, L.: Proc. ASBC Congr., 1952, s. 98
- [2] VERZELE, M. - ANTEUNIS, M. - ALDERWEIRELDT, F.: J. Inst. Brew., 71, 1965, s. 232
- [3] VERZELE, M. - VANHOEY, M.: J. Inst. Brew., 73, 1967, s. 451
- [4] VERZELE, M. - KHOKHER, A.: J. Inst. Brew., 73, 1967, s. 255
- [5] RIGBY, F. L. - STOFFER, J.: Proc. ASBC, 1967, s. 110
- [6] ALDERTON, C.: Analyt. Chem., 26, 1954 s. 983
- [7] VERZELE, M. - VAN DYCK, J.: J. Inst. Brew., 77, 1971, s. 529
- [8] KLOPPER, W. J.: Brauwiss., 8, 1955, s. 101
- [9] RIGBY, F. L. - BETHUNE, J. L.: J. Inst. Brew., 1955, s. 332
- [10] MOLTKE, A. B. - MEILGAARD, M.: Brygemestern, 12, 1955, s. 16, 37, 65
- [11] BRENNER, M. V. - VIGILANTE, C. OWADES, J. L.: Proc. ASBC, 1956, s. 48
- [12] RIGBY, F. L. - BARS, A.: Proc. ASBC, 1961, s. 46
- [13] KUROIWA, Y. - KOKUBO, E.: Brew. Digest, 48, 1973, s. 52
- [14] POWER, F. B. - TUTIN, F. - ROGERSON, H.: J. Chem. Soc., 1913, s. 1287
- [15] SPETSIG, L. O. - STENINGER, M. - BROHULT, S.: Proc. EBC, 1957, s. 22
- [16] BROHULT, S. - RYHAGE, R. - SPETSIG, L. O. - STENHAGEN, E.: Proc. EBC, 1959, s. 121
- [17] REGEN, J. P.: Proc. EBC, 1969, s. 471
- [18] SHAW, S. J. - MILLES, A. K.: Proc. ASBC, 1967, s. 45
- [19] ASHURST, P. L. - ELVIDGE, J. A.: J. Chem. Soc., 1966, s. 675
- [20] VANHOEY, M. - VANDEWALLE, M. VERZELE, M.: J. Inst. Brew., 76, 1970, s. 372
- [21] HASHIMOTO, H. - KUROIWA, Y.: Hakko Kagaku Zasshi (jap.), 39, 1961, s. 554
- [22] DIFFOR, D. W. - RAMOS, E. - HANSEN, G. L.: Proc. ASBC, 1973, s. 109
- [23] KOKUBO, E. - KUROIWA, Y. - KOWAKA, M.: Proc. ASBC, 1971, s. 265
- [24] KOKUBO, E. - KUROIWA, Y.: Brochure of Abstracts of Technical Papers presented at the „Hop Chemistry Colloquium“ in London, oct. 1965
- [25] VERZELE, M. - CLAUS, H. - VAN DYCK, J.: J. Inst. Brew., 73, 1967, s. 298
- [26] AITKEN, R. A. - BRUCE, A. - HARRIS, J. O. - SEATON, J. C.: J. Inst. Brew., 73, 1967, s. 528
- [27] AITKEN, R. A. - BRUCE, A. - HARRIS, J. O. - SEATON, J. C.: J. Inst. Brew., 76, 1970, s. 395
- [28] FRANIAU, R. - MUSSCHE, R.: J. Inst. Brew., 80, 1974, s. 59
- [29] HOWARD, G. A.: J. Inst. Brew., 76, 1970, s. 132, 386
- [30] HUDSON, J. R.: J. Inst. Brew., 71, 1965, s. 482
- [31] GRANT, H. L.: Proc. ASBC, 1966, s. 145
- [32] KLEBER, W. - HUMS, N.: Brauwelt, 20, 1972, s. 374, 384
- [33] RIGBY, F. L. - BETHUNE, J. L.: J. Inst. Brew., 61, 1955, s. 325
- [34] SCHUR, F. - PFENNINGER, H.: Brauwiss., 24, 1971, s. 151
- [35] VERZELE, M. - CLAUS, H. - VAN DYCK, J.: J. Inst. Brew., 73, 1967, s. 39
- [36] AITKEN, R. A. - BRUCE, A. - HARRIS, J. O. - SEATON, J. C.: J. Inst. Brew., 74, 1968, s. 436
- [37] KOKUBO, E. - KUROIWA, Y. - ODA, K.: Proc. ASBC, 1968, s. 94
- [38] MOLL, M. - FLAYEUX, R. - NOEL, J. P.: Bios, 1972, s. 119
- [39] OTTER, G. E. - SILVESTER, D. J. - TAYLOR, L.: J. Inst. Brew., 78, 1972, s. 57
- [40] VERZELE, M.: Chem. Weekblad, 68, 1972, /28/, 6

- [41] VERZELE, M. - VAN LUCHENE, E. - VAN DYCK, J.: J. Inst. Brew., 71, 1965 s. 232
- [42] HUMPHREY, A. M.: Chem. and Ind., 1969, 1235
- [43] VERZELE, M. - CLAUS, H. - VAN DYCK, J.: J. Inst. Brew., 73, 1967, s. 39
- [44] RIGBY, F. L. - BETHUNE, J. L.: J. Inst. Brew., 61, 1955, s. 325
- [45] RIGBY, F. L. - BETHUNE, J. L.: Proc. ASBC, 1952, s. 98, Proc. ASBC, 1953, s. 119
- [46] KLEBER, W. - HARTL, A.: Brauwiss., 16, 1963, s. 261
- [47] KLEBER, W. - HUMS, N.: Brauwiss., 25, 1972, s. 225
- [48] KLEBER, W. - HUMS, N.: Brauwelt, 112, 1972, s. 1099
- [49] KLEBER, W. - HUMS, N.: Brauwelt, 112, 1972, s. 374, 384
- [50] KUBÍČEK, J.: Dizertační kandidát. práce, VÚPS, 1972
- [51] WOOD, S. A. - LLOYD, R. O. - WHITEAR, A. L.: J. Inst. Brew., 74, 1968, s. 510
- [52] MUSSCHE, R. - FRANIAU, R.: J. Inst. Brew., 80, 1974, s. 201
- [53] GRANT, H. L.: Proc. ASBC, 1973, s. 82
- [54] KOKUBO, E. - KUROIWA, Y. - ODA, K.: Rept. Res. Lab. Kirin. Brew. Co. Ltd., 1968, s. 25

**Kubíček, J. - Vančura, M.: Chmelová pryskyřice. II. Příspěvek k analytice izomerovaných chmelových extraktů.** Kvas. prům. 24, 1978, č. 1, s. 3—6.

Alkalickým, event. katalytickým působením jsou z chmelových pryskyřic připravovány v poslední době už i v průmyslovém měřítku izomerované chmelové extrakty, určené pro tzv. „studené chmelení“ v posledních fázích (filtrace, stáčení) výroby piva. Současně s tím vypsal problém spolehlivého analytického hodnocení těchto preparátů. Na vzorcích pokusných alkalických izomerátů (částečná izomerace) a belgického preparátu Isopal (PRB) byly ověřeny čtyři vybrané analytické metody. Jsou uvedeny přednosti event. nedostatky jednotlivých metod, s přihlédnutím k možnostem jejich použití pro různé druhy extraktů.

**Кубичек, Я. — Ванчур, М.: Смолы хмеля. 2-ая часть. К аналитике изомеризованных хмелевых экстрактов.** Квас. прум. 24, 1978, № 1, стр. 3—6.

Посредством щелочного или каталитического методов из хмелевых смол изготавливаются в последнее время уже в промышленном масштабе изомеризованные хмелевые экстракты, предназначенные для называемого холодного охмеления, т. е. охмеления, имеющего место в последних фазах процесса пивоварения (при фильтрации или разливке). В связи с этим приобрела актуальность проблема точного аналитического определения качеств таких экстрактов. Авторы сравнивали четыре разных метода, пользуясь образцами нескольких щелочных изомератов, полученных экспериментально путем частичной изомеризации, а также бельгийским препаратом ИЗОПАЛ. Авторы оценивают преимущества и недостатки отдельных методов и намечают области их применения для анализа экстрактов.

**Kubíček, J. - Vančura, M.: Hop Resins. Part II. Analytic Methods Applicable to Isomerized Hop Extracts.** Kvas. prům., 24, 1978, No. 1, pp. 3—6.

New methods have recently been elaborated how — by using alkaline or catalytic process — to prepare on an industrial scale isomerized hop extracts from hop resins. Such extracts are used for the so-called cold hopping carried out in the finishing stages of the brewing process, i. e. during filtering or racking operations. One of the outstanding problems is now therefore reliable analytic determination of the properties of new extracts. The authors have compared four analytic methods using as samples a number of alkaline isomerates (after partial isomerization) and a Belgian preparation called Isopal. Advantages and disadvantages of the methods in question are evaluated and kinds of extracts indicated, to the analyses of which individual methods can be applied.



**Kubíček, J. - Vančura, M.: Hopfenharze II. Beitrag zur Analytik der isomerisierten Hopfenextrakte.** Kvas. prům. 24, 1978, No. 1, S. 3—6.

Durch alkalische, bzw. katalytische Wirkung werden aus Hopfenharzen — neuerdings bereits industriell — die isomerisierten Hopfenextrakte erzeugt, die zu der sog. „Kalthopfung“ in den letzten Phasen der Bierherstellung (Filtration, Abfüllung) bestimmt sind. Zugleich

ist auch die verlässliche analytische Beurteilung dieser Präparate zu einem aktuellen Problem geworden. Es wurden vier ausgewählte analytische Methoden erprobt, und zwar auf Proben von alkalischen Versuchsisomeren (Teilsisomerisierung) und dem belgischen Präparat Isopal (PRB). Es werden die Vorzüge, bzw. Nachteile der einzelnen geprüften Methoden vom Standpunkt der Möglichkeit ihrer Anwendung für verschiedene Extraktarten angeführt.