

Využití vysokotlaké chromatografie k stanovení některých složek extraktu piva

Ing. HELENA ŠEDO VÁ, Ing. MIROSLAV KAHLER, CSC., Ing. Jan VOBORSKÝ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Chromatografická technika je důležitá pro separaci, izolaci a identifikaci komplexních substrátů, jež obsahují různé složky ovlivňující senzorké vlastnosti nápojů nebo potravinářských výrobků. Rychlý vývoj uvedené techniky umožnil zlepšit účinnost klasické chromatografie, a tím poskytl široké uplatnění chromatografie i v dalších oborech. K novým technikám patří vysokotlaká kapalinová chromatografie. Článek pojednává o aplikaci vysokotlaké chromatografie k analýze některých sloučenin, jež se obtížně stanoví např. plynovou chromatografií, nebo nejsou vůbec stanovitelné uvedenou technikou.

Předpokládaným požadavkem uplatnění kapalinové chromatografie je rozpustnost analyzované látky v mobilní fázi. Zatímco u plynové chromatografie nemá tvar kolony vliv na dělicí účinnost, vyžaduje se u kapalinové chromatografie zachování přímých rovných kolon. K zajištění průtoku mobilní fáze kolonou se musí používat čerpadla, protože jemná zrnitost náplně (řádově desítky až jednotky mikrometrů) způsobuje značný odpor, který dosahuje hodnot někdy vyšších než 20 MPa. Lineární průtoková rychlost bývá okolo $1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Hlavní částí vysokotlaké kapalinové chromatografie jsou vysokotlaká čerpadla, kolona a detektor. Běžně se používá dvou typů čerpadel, a to mechanických nebo pneumatických. *Mechanická* čerpadla, u nichž se tok mobilní fáze ovládá pístem, umožňují dodávat trvale konstantní objem mobilní fáze bez ohledu na malé odchylky poklesu tlaku v systému. Nevýhodou těchto čerpadel je částečně pulsující tok, jenž může způsobovat periodický šum. *Pneumatická* čerpadla dopravují mobilní fázi tlakem na stlačitelný kontejner, ve kterém je obsažena. Průtok je zcela bezpulsní a relativně konstantní. Tato čerpadla mají však omezený objem mobilní fáze, a musí se proto často doplňovat. V systému nesmějí vzni-

kat tlakové ztráty, aby se zachovala konstantní rychlost průtoku.

Vnitřní průměr analytických kolon bývá 2 až 5 mm, délka se pohybuje od 250 do 1000 mm. Povrch uvnitř kolon musí být doknale hladký, aby se dosáhlo vysokého stupně homogenity náplně, neboť účinnost kolony úzce souvisí s uvedeným požadavkem. Při vysokotlaké chromatografii se vyžaduje vysoká mechanická odolnost náplně, protože vysokým tlakem se značně zvyšuje účinek viskózního působení mobilní fáze. U nosičů smočených stacionární fází může se snadno tato fáze vymývat vlivem viskózního působení, a proto k zamezení tohoto nežádoucího úkazu jsou stacionární kapaliny chemicky vázány na nosič.

Na rozdíl od plynové chromatografie nejsou u vysokotlaké chromatografie významné rozdíly mezi mobilní fází a vzorkem, a proto se musí při detekci eliminovat vliv rozpouštědla, nebo využít k detekci nějaké fyzikální vlastnosti analyzovaného vzorku, popřípadě změny celkové fyzikální vlastnosti mobilní fáze. Nejčastěji se používají detektory selektivní nebo univerzální. Nejběžnějším selektivním detektorem je detektor pro UV-absorpci. Tento detektor je nezávislý na změnách průtoku a teploty. Detegovat se mohou nanogramová množství v vzorku se střední absorptivitou (254 nm). Detektory s kontinuálně měnitelnou vlnovou délkou (200 až 800 nm) jsou citlivější, protože lze měřit v oblasti odpovídající absorpčnímu maximu.

Mezi univerzální detektory se zařazuje např. diferenciální refraktometr. Má menší citlivost (mikrogramová množství) a při analýze se musí udržovat konstantní teplota a průtok. Důležité je, aby analytický i referenční proud kapaliny měly stejnou teplotu. Z tohoto důvodu se zařazuje k detektoru dobře kontrolovatelné temperovací zařízení k udržení požadované teploty v rozsahu

Kolona	250 mm × 4,6 mm, vnitř. Ø 4,6 mm
Mobilní fáze	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($c \text{ NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 = 0,03$ mol/l) pH = 3,0
Průtok	3 ml · min ⁻¹
Tlak	11 MPa
Detektor	UV, 254 nm
Nástřik	25 µl
Posun papíru	10 mm · min ⁻¹

Na obrázku 3 a 4 jsou chromatografické záznamy čistých nukleotidů a nukleotidů izolovaných z piva. Určení purinových a pyrimidinových bází a nukleosidů vyžaduje dělení na kolonách s účinností iontoměničů.

3. Sacharidy

Hlavní část extraktu mladiny tvoří sacharidy. Obsah sacharidů kolísá podle druhu vyráběné mladiny, použité surogace a technologie rmutování. Kromě maltosy, jež tvoří asi tři čtvrtiny z celkového množství sacharidů, jsou v mladině přítomny ještě glukosa, fruktosa, sacharosa, isomaltosa, maltotriosa, maltotetraosa a další glukosové oligosacharidy a pentosy. Se zřetelem na důležitost sacharidů pro kvasný proces je věnována metodám jejich stanovení značná pozornost. Přehlednou práci o stanovení cukrů v mladině uveřejnily Basařová a Černá [21]. I když nové metody umožňují získat přesnější hodnoty zkvasitelných i celkových cukrů, neposkytují informace o kvantitativním zastoupení jednotlivých cukrů v mladině.

Chromatografické metody podstatně zlepšily podrobnější sledování změn koncentrace cukrů, např. při kvasných procesech. Aplikace plynové chromatografie vyžaduje derivatizaci zkoušeného vzorku. Kromě stanovení hexos jsou popsány také postupy k určení pentos a deoxyhexos [22, 23, 24]. Další úspěšnou metodou je chromatografie na tenké vrstvě, která je poměrně rychlá a umožňuje určit obsah jednotlivých zkvasitelných cukrů v sladidně, mladině nebo v pivu [25, 26]. V poslední době byly vypracovány metody dělení cukrů kapalinovou chromatografií [27, 28, 29, 30, 31]. Přehled dělení cukrů na iontoměničích uveřejnili Jandera a Churáček [32].

3.1 Chromatografické dělení

Před vlastním dělením je výhodné odstranit některé balastní látky, např. bílkoviny. S ohledem na nižší citlivost diferenciálního refraktometru, kterého se používá k detekci, je vhodné současně zkoncentrovat obsah cukrů. K 5 ml vzorku v 50 ml kuželové baňce se přidá 20 ml methanolu a roztok se důkladně protřepá. Potom se obsah přefiltruje přes filtr (bílá páska) a promyje 5 ml 80% methanolu. Filtrát se odpaří ve vakuu do sucha a výparek se rozpustí v 1 ml elučního roztoku. Takto upravený vzorek se použije k nástřiku.

Podmínky při chromatografii:

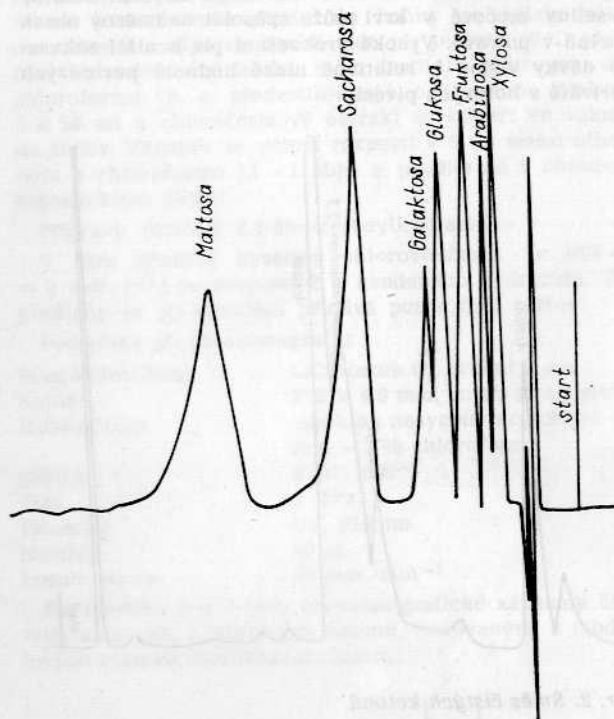
Stacionární fáze	LiChrosorb NH_2 , zrnění 10 mm
Kolona	250 mm × 4,6 mm, vnitř. Ø 0,46 mm
Mobilní fáze	acetonitril + voda (70 + 30 obj.)
Průtok	2 ml · min ⁻¹
Tlak	7 MPa
Detektor	RI (diferenciální refraktometr)
Nástřik	5 µl pro mladinu, 50 µl pro pivo
Posun papíru	10 mm · min ⁻¹

Na obrázku 5 a 6 jsou záznamy dělení modelové směsi cukrů sladiny.

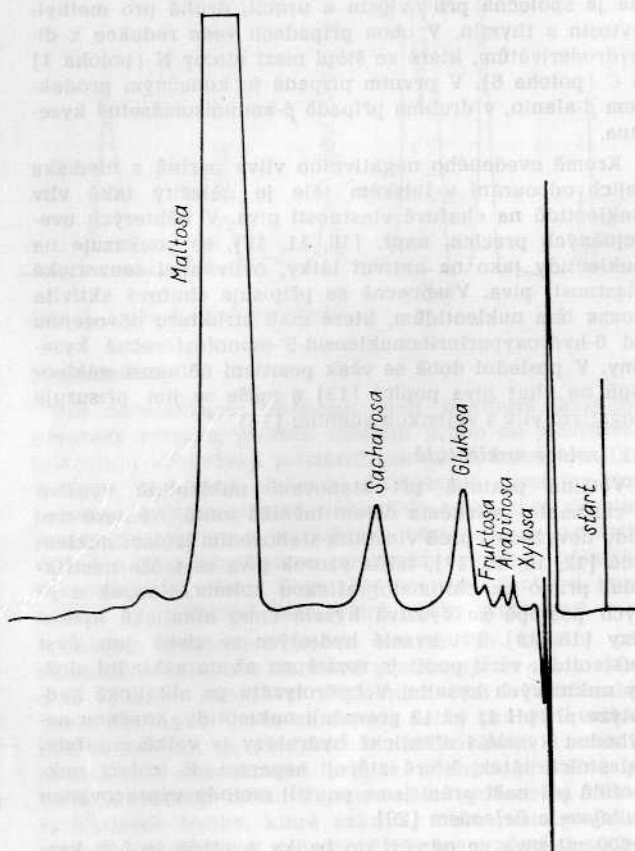
4. Závěr

Vysokotlaká kapalinová chromatografie umožňuje široké uplatnění v celé oblasti biochemie, chemie a po-

travinářství. Vývoj této chromatografické techniky není ukončen, neboť směřuje především ke zvýšení permeability kolon, která je v současné době s ohledem na malé průměry částic náplně a na vysokou viskozitu mobilní



Obr. 5. Směs čistých cukrů



Obr. 6. Zkvasitelné cukry v mladině

fáze velmi nízká. Také rozvoj detektorů s vyšší citlivostí rozšíří okruh použitelnosti kapalinové chromatografie.

Zatím se ověřila možnost stanovení tří důležitých skupin látek, které mají z hlediska kvasného procesu a sensorických vlastností pív velký význam. Hlavní výhodou kapalinové chromatografie, např. při stanovení karbonylových látek, je přímé dělení izolovaných hydrazonů, takže odpadá regenerace na původní látku jako u plynové chromatografie. Také stanovení nukleotidů, jejichž koncentrace se při dokvašování v pívě zvyšuje a stanovení zkvasitelných cukrů je poměrně jednoduché. Získané výsledky ukázaly, že kapalinovou chromatografií lze využít pro stanovení některých důležitých složek extraktu piva a mladiny. Mimo to se může kapalinová chromatografie aplikovat při analýze tříslovin, hořkých látek a organických kyselin.

Literatura

Literatura

- [1] PAPA, L. J., TURNER, L. P.: J. Chromatog. Sci., **10**, 1972, s. 747
- [2] SIEBERT, K. J.: Techn. Quart. MBAA, **9**, 1972, s. 205
- [3] WANG, P. S., SIEBERT, K. J.: Techn. Quart. MBAA, **11**, 1974, s. 110
- [4] DREWS, B. et al.: Monschr. Brauerei, **19**, 1966, s. 145
- [5] WHEELER, R. E. et al.: Proc. EBC, 1971, s. 423
- [6] MEILGAARD, M. et al.: Proc. ASBC, 1971, s. 219
- [7] PIENDL, A. et al.: Brauwissenschaft, **34**, 1981, s. 361
- [8] PIENDL, A. et al.: Brauwissenschaft, **34**, 1981, s. 159
- [9] TRIPP, R. C. et al.: Proc. ASBC, 1968, s. 65
- [10] CLAPPERTON, J. F.: Proc. EBC, 1971, s. 232
- [11] STEINER, K.: Schweiz. Brauerei Rdsch., **85**, 1974, s. 109
- [12] PICKET, J. A.: J. Inst. Brew., **80**, 1974, s. 42
- [13] MASSCHELEIN, C. A.: Brauwelt, **115**, 1975, s. 437
- [14] WAGNER, D.: Proc. EBC, 1979, s. 737
- [15] CHARALAMBOUS, G. et al.: Techn. Quart. MBAA, **11**, 1974, s. 150, 193
- [16] PICKETT, J. A.: J. Chromatog., **81**, 1973, s. 153
- [17] BOECK, D., KIENINGER, H.: Brauwissenschaft, **32**, 1979, s. 160
- [18] BELLEAU, G., BUDAY, A. Z.: Proc. ASBC, 1968, s. 214
- [19] KIENINGER, H. et al.: Brauwissenschaft, **20**, 1976, s. 71
- [20] BUDAY, A. Z., BELLEAU, G.: Proc. ASBC, 1969, s. 97
- [21] BASAŘOVÁ, G., ČERNÁ, I.: Kvasný průmysl, **23**, 1977, s. 145
- [22] SHAW, D. H., MOSS, G. W.: J. Chromatog., **41**, 1939, s. 350
- [23] BIRCH, G. G.: J. Food. Technol., **8**, 1973, s. 229
- [24] DRAWERT, F. et al.: Proc. EBC, 1975, s. 791
- [25] SCHUR, F. et al.: Schweiz. Brauerei Rdsch., **84**, 1973, s. 93
- [26] BACVAROV, V. Ch., MOŠTEK, J.: Kvasný průmysl, **23**, 1977, s. 121
- [27] RAPP, A. et al.: Dtsch. Lebensm. Rdsch., **71**, 1975, s. 345
- [28] LINDEN, J. C., LAWHEAD, C. L.: J. Chromatog., **105**, 1975, s. 125
- [29] GOULDING, R. W.: J. Chromat., **103**, 1975, s. 229
- [30] ANGER, H. M., WACKERBAUER, K.: Monschr. Brauerei, **34**, 1981, s. 244
- [31] SCHMIDT, J. et al.: Brauwissenschaft, **34**, 1981, s. 144
- [32] JANDERA, P., CHURÁČEK, J.: Chromatog., **98**, 1975, s. 55

Sedová, H. - Kahler, M. - Voborský, J.: Využití vysokotlaké chromatografie k stanovení některých složek extraktu piva. Kvas. prům. **28**, 1982, č. 9, s. 193—197

V článku je popsán stručný princip vysokotlaké ka-

palinové chromatografie a některé metody stanovení karbonylových látek, nukleotidů a sacharidů v pívě. Výhodou vysokotlaké kapalinové chromatografie je možnost rozlišení látek i s nepatrnými rozdíly ve struktuře. Kromě uvedených postupů lze analyzovat kapalinovou chromatografií ještě tříslovinu, hořké látky, organické kyseliny a další složky piva.

Шедова, Е., Калер, М., Воборски, И.: Использование хроматографии с высоким давлением для определения некоторых составных частей экстракта пива. Квас. прум. **28**, 1982, № 9, стр. 193—197.

V статье описан краткий принцип жидкостной хроматографии с высоким давлением и некоторые методы установления карбонильных веществ, нуклеотидов и сахаридов в пиве. Выгодой жидкостной хроматографии с высоким давлением является возможность различить вещества с ничтожными отличиями структуры. Кроме приведенных способов при помощи жидкостной хроматографии можно анализировать танины, горькие вещества, органические кислоты и другие компоненты пива.

Sedová, A. - Kahler, M. - Voborský, J.: Application of High-Pressure Chromatography to the Estimation of Some Compounds of Beer Extract. Kvas. prům. **28**, 1982, No. 9, p. 193—197

A brief principle of high-pressure liquid chromatography (HPLC) and some methods for an estimation of carbonyl compounds, nucleotides and saccharides in beer are described. An advantage of the HPLC is in the ability of the distinction between compounds with a slight difference in the structure. In addition to these procedures, the HPLC can be also used to the detection of tannins, bitter substances, organic acids and other compounds of beer.

Sedová, H. - Kahler, M. - Voborský, J.: Anwendung der Hochdruck-Chromatographie zur Bestimmung einiger Bestandteile des Bierextrakts. Kvas. prům. **28**, 1982, Nr. 9, S. 193—197

In dem Artikel wird das Prinzip der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie zusammenfassend erklärt und einige Methoden zur Bestimmung der Karbonylstoffe, Nukleotide und Saccharide im Bier beschrieben. Der wichtige Vorteil der Hochdruckchromatographie besteht in der Möglichkeit der Unterscheidung von Substanzen, die nur sehr geringe Unterschiede in der Struktur aufweisen. Neben den angeführten Methoden können mittels der Flüssigkeitschromatographie auch Gerbstoffe, Bitterstoffe, organische Säuren und weitere Bierbestandteile erfaßt werden.

Posúdenie kyseliny vínnej v ovocných šťavách a vínach

Autori popisujú jednoduchú metódu stanovenia nízkych koncentrácií kyseliny vínnej plynovou chromatografiou ($< 0,3 \text{ g.l}^{-1}$) v ovocných šťavách a vínach. Organické kyseliny sa zo vzoriek napred izolujú pomocou vymieňača iónov (anexu) a stanovujú po silylácii.

V autentických ovocných šťavách (napr. malinovej, jahodovej, čerešňovej, višňovej, jablkovej, ríbezľovej atp.)

nemožno kyselinu vínnu prakticky dokázať (obsah $< 0,02 \text{ g.l}^{-1}$). Len v marhuľovej šťave dokázali $\leq 0,05 \text{ g.l}^{-1}$ kyseliny vínnej. Dôkaz kyseliny vínnej v týchto ovocných nealkoholických a alkoholických nápojoch treba považovať za významný ukazovateľ možnosti prímеси produktov hrozna. Podrobný popis metódy sa uvádza.

BANDION, F. - VALENTA M.: Zur Beurteilung von Weinsäure in Fruchtsäften und Fruchtweinen. Mitt. Klosterneuburg **31**, 1981, č. 5, s. 200—203.