Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie při stanovení sacharidů v pivovarských meziproduktech a v pivu

663.41.543 547.454
543.544.6 543.544.45

Ing. STANISLAV ONDROUŠEK, CSc., Prof. Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, DrSc., Katedra kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT Praha, Ing. HANA LOUKOVÁ, Severočeské pivovary, k. p. Louny

Klíčová slova: *pivo, sladina, mladina, sacharidy, kapalinová chromatografie, iontoměniče*

Úvod

Sacharidy jsou jednou z hlavních složek fermentačních médií, a to v celém spektru kvasných technologií, např. ve výrobě piva, lihu, droždí, antibiotik atd. Pro vlastní průběh kvašení je důležitý nejen celkový obsah cukrů v kvasném médiu, ale i poměr jednotlivých sacharidů, protože ne všechny mohou být kvasíci mikroorganismy stejnou mírou využívány. Jelikož jde v případě sacharidů o skupinu látek velice různorodých (monomery až polymery různých stupňů s rozličnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi), je jejich stanovení poměrně složité. Používá se při tom řada fyzikálních, fyzikálně chemických, biochemických a mikrobiologických metod. Starší metody stanovení cukrů spočívaly především v měření jejich redukční síly a optické otáčivosti. Nevýhodou reduktometrických metod však je, že lze jimi stanovit jako celek pouze redukující sacharidy, tj. ty, které mají volný poloacetátový hydroxyl, a na druhé straně stanovení zkrsluje přítomnost jiných redukujících látek nesacharidické povahy. Polarimetrické metody, založené na měření optické otáčivosti, jsou dosud použitelné prakticky pouze pro stanovení sacharózy v roztoku. V současné době se již sice objevily metody polarimetrických detektorů, kterých lze použít ke stanovení různých sacharidů při kapalinové chromatografii [1], jako např. model Polarimetry 241 firmy Bodenseewerk Perkin Elmer, avšak jejich dostupnost je vzhledem k ceně velmi malá.

Novější spektrofotometrické metody stanovení sacharidů jsou většinou založeny na měření absorpance barevných komplexů vzniklých reakcí derivátů furfuralu, na které se štěpí cukry v silně kyselém prostředí, a organických sloučenin, jakými jsou např. antron, orcin, ftalan

anilinu aj. Těchto metod lze úspěšně použít i k detekci sacharidů při kapalinové chromatografii, problémy však vznikají z hlediska instrumentálního, neboť ke kvantitativnímu průběhu těchto reakcí je třeba teploty kolem 100 °C a delšího času. Proto je nutné zařazovat do sestavy chromatografu reaktor s určenou dobou zdržení, což má za následek prodloužení vlastní analýzy a mimo to prostředí koncentrovaných kyselin způsobuje často poškození aparatury. Vytvořily se sloučeniny, které reagují se sacharidy za vyšších teplot bez přítomnosti koncentrovaných minerálních kyselin, ale tyto látky jsou buď méně dostupné (hydrazid kyseliny p-hydroxybenzoové), nebo jejich použití taktéž naráží na instrumentální potíže (kyselina dinitrosalicylová).

Z moderních instrumentálních metod lze k detekci sacharidů využít refraktometrie, popřípadě pulsní amperometrie [2]. Uvedené detekční metody jsou sice méně specifické než spektrofotometrické stanovení, avšak jejich použití je instrumentálně mnohem jednodušší. Jak již bylo poznamenáno, celkový obsah cukrů není často dostatečnou informací z hlediska složení sledovaného vzorku, neboť daleko podstatnější je vlastní zastoupení jednotlivých sacharidů. V tomto ohledu poskytly možnosti takového stanovení chromatografické metody. Nejprve to byla papírová, tenkovrstvá a sloupcová chromatografie na různých typech nosičů, později plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Zatímco papírová a tenkovrstvá chromatografie jsou časově náročné se současnou větší chybou stanovení, jsou plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie podstatně rychlejší a přesnější. Plynová chromatografie je však v tomto případě poměrně složitá, protože vyžaduje převedení sacharidů na dostatečně těkavé deriváty. Jako nejvhodnější se v současné době jeví vysokoúčinná kapalinová chromato-

grafie, již lze poměrně rychle a dostatečně specificky stanovovat sacharidy různých materiálů. Jako chromatografických nosičů se v těchto případech nejčastěji používá modifikovaných silikagelů se zakotvenou reverzní fází nebo iontoměničů. Z první skupiny jsou to především preparáty s vázanými fázemi NH_2 a C_{18} . Modifikované silikagely se zakotvenou NH_2 skupinou jsou pro stanovení sacharidů velmi vhodné [3] a lze na nich dobře a v krátké době stanovit spektrum nejběžnějších sacharidů. Jako elučního činidla se v tomto případě používá 30 % vodný roztok acetonitrilu, což však vzhledem k vysoké toxicitě této látky komplikuje vlastní instrumentální provedení a omezuje širší využití přímo v provozní praxi.

V případě modifikovaných silikagelů se zakotvenou fází C_{18} je situace v tomto směru jednodušší, neboť lze k dělení sacharidů využít prosté izokratické eluce vodou, přičemž je možno úspěšně dělit maltodextrinové a celodextrinové řady (12 až 14 členů řady lze rozdělit během 30 minut).

Podstatně většího rozšíření v chromatografii sacharidů doznalo použití iontoměničů. Většinou jde o pryskyřice na bázi styren-divinylbenzenového kopolymeru, na jehož aromatických jádrech jsou např. funkční skupiny sulfonové u silně kyselých katexů nebo benzytrimethylamoniové u silně zásadických anexů. Před vlastní chromatografií se většinou funkční skupiny iontoměniče obsadí příslušným protiontem, u katexů obvykle Na^+ , K^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Pb^{2+} nebo Ba^{2+} , u anexů Cl^- nebo HSO_3^- . V některých případech se používají i katexy v H^+ cyklu [5]. V případě katexů je nejčastějším elučním činidlem voda, směs vody a ethanolu nebo vody a acetonitrilu, dále pak slabé roztoky kyseliny sírové a u anexů směsí voda a ethanol, borátových pufrů, popřípadě u specifických anexů (firma Dionex) roztoků NaOH [2].

Velká část publikovaných prací týkajících se analytiky sacharidů, které se provedly v poslední době, využívala katexů vyráběných firmou Bio-Rad pod značkou Aminex. Jde o speciálně vybraný, čištěný a tříděný Dowex 50 W. Firma Bio-Rad vyvinula dva katexy zvláště vhodné pro analýzu cukrů, Aminex Carbohydrate HPX-87, vhodný pro analýzu monosacharidů, disacharidů a trisacharidů a Aminex Carbohydrate HPX-42 doporučený pro analýzu mono- a oligosacharidů. Velkou výhodou těchto katexů, na rozdíl od sorbentů s vázanou fází, je jednoduchá volba eluentu [4]. Protože selektivita pro cukry není ovlivněna rozpouštědlem, naprosto potlačuje eluce deionizovanou vodou.

Vrátů [6] dělil sacharidy na silně kyselých sférických katezech Ostion LG KS 0802 a Ostion LG KS 0803 určených pro analýzu aminokyselin. Redukující cukry detekoval pomocí hydrazidu p-hydroxybenzové kyseliny, když před tím neredukující sacharidy invertoval na jednodušší cukry na koloně naplněné silně kyselým katexem v H^+ formě. Tato metoda sloužila jako výchozí pro naši práci při stanovení sacharidů v pivovarských meziproduktech a v pivu. Současně jsme ověřili možnost stanovení sacharidů uvedených vzorků na koloně plněné Separonem SI C_{18} .

MATERIÁL A POUŽITÉ METODY

Při stanovení sacharidů sladiny, mladiny a piva bylo použito těchto zařízení, přístrojů a materiálů.

Membránové čerpadlo MP 2501	Laboratorní přístroje, Praha
Membránové čerpadlo VCM 300	Vývojové dílny ČSAV
Diferenciální refraktometr RIDK 101	Laboratorní přístroje, Praha

Dvouliniový zapisovač
TZ 4221
Integrátor CI 100
Ultratermostat U 7

Dávkovací ventil
Kolona skleněná s ter-
mopláštěm 62×0,8 cm
Kolona ocelová
25×0,6 cm plněná Sepa-
ronem SI C_{18}

Ionexy:
Ostion LG KS 0803
15–20 μm
Ostion LG KS 0802
12–15 μm
Ostion LG KS 0800
7–11 μm

Laboratorní přístroje, Praha
Laboratorní přístroje, Praha
Prüfgeräte Werk, Medingen,
NDR

Mikrotechna, Praha

Mikrotechna, Praha

Laboratorní přístroje, Praha

Spolek pro chemickou a
hutní výrobu, Ústí nad
Labem

Obr. 1 Analýza vzorku standardní směsi sacharidů na Ostionu LG KS 0800

Podmínky: kolona skleněná 62×0,8 cm, eluent — H_2O , průtok — 0,8 ml/min, teplota — 85 °C, detekce — refraktometricky 16×

1. rafinóza, 2. maltóza + sacharóza, 3. glukóza 4. fruktóza

V první části práce jsme nejprve sledovali kvalitu dělení standardní směsi sacharidů [glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza a rafinóza] na ionexech Ostion LG KS 0800 a Ostion LG KS 0803 v různých iontových formách. Oba ionexy jsme převedli do Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , L^{2+} a Ag^+ forem a zjistili jsme, že nejlepší dělení výše uvedené standardní směsi na Ca^{2+} formě obou ionexů je při teplotě 85 °C a průtoku 0,8 ml destilované vody za minutu. V případě použití Ostionu LG KS 0800 se ostřeji rozdělí rafinóza od sacharózy a maltózy, avšak za cenu vyšších protitlaků. Na obr. 1 je uveden chromatografický záznam získaný analýzou standardní směsi cukrů na koloně 62×0,8 cm naplněné ionexem Ostion LG KS 0800. Stejnou standardní směs sacharidů, kterou jsme použili při testování Ostionů jsme poté dělili na koloně plněné

Tabulka 1. Stanovení obsahu sacharidů ve standardní směsi (rafinóza — 0,5 g/l, maltóza + sacharóza — 1,0 g/l, fruktóza — 1,0 g/l)

Sacharid	Číslo stanovení								
	1	2	3	4	5	6	7	Ø	v
	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	%
rafinóza	0,51	0,51	0,49	0,50	0,50	0,51	0,50	0,50	1,6
maltóza + sacharóza	1,00	1,00	0,97	1,03	1,01	1,02	1,03	1,01	2,0
glukóza	1,00	0,99	0,98	1,04	1,00	1,01	1,00	1,00	2,0
fruktóza	1,01	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,01	1,00	0,9

v je variační koeficient

Tabulka 2. Analýza sacharidů předku provozní sládky (17 %) ze závodu Smíchov

Číslo analýzy	1	2	3	4	5	Ø
Sacharid	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
trisacharidy	18,9	18,7	18,6	18,2	18,6	18,6
disacharidy	59,1	60,1	58,1	58,1	60,6	59,2
glukóza	14,1	14,2	14,3	14,0	13,6	14,0
fruktóza	2,3	2,4	2,1	2,2	2,3	2,3
sacharidy celkem	94,4	95,4	93,1	92,5	95,1	94,1

variační koeficient pro celkové sacharidy v = 1,3 %

Tabulka 3. Analýza sacharidů 10% mladiny připravené na čtvrtprovozním zařízení VŠCHT

Číslo analýzy	1	2	3	4	5	Ø
Sacharid	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
trisacharidy	15,3	14,5	16,1	16,5	14,6	15,4
disacharidy	48,7	49,8	49,7	48,3	52,8	49,8
glukóza	12,1	11,4	11,9	12,4	11,0	11,8
fruktóza	2,4	2,1	2,5	2,2	2,7	2,4
sacharidy celkem	78,5	77,8	80,2	79,4	81,1	79,4

variační koeficient pro celkové sacharidy v = 1,7 %

Tabulka 4. Analýza sacharidů vzorku piva Budvar 12%

Číslo analýzy	1	2	3	4	5	g/l
Sacharid	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	Ø
trisacharidy	14,9	15,4	15,3	16,1	15,1	15,4
disacharidy	2,7	3,1	2,6	2,8	2,9	2,8
glukóza	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9
fruktóza	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
sacharidy celkem	20,1	21,1	20,4	21,5	20,6	20,7

variační koeficient pro celkové sacharidy v = 2,7 %

Separonem SI C₁₈. Obr. 2 znázorňuje získaný chromatografický záznam.

Pro další stanovení sacharidů ve sladině, mladině a v pívu jsme se rozhodli použít ionexu Ostion LG KS 0803.

Obr. 2 Analýza vzorku standardní směsi sacharidů na Separonu SI C₁₈Podmínky: kolona ocelová 25 X 0,6 cm, eluent — H₂O, průtok 0,8 ml/min, teplota — 25 °C, detekce — refraktometricky 8 X

1. monosacharidy, 2. disacharidy, 3. trisacharidy

Obr. 3 Analýza vzorku mladiny 12% na Ostionu LG KS 0803

Podmínky: viz obr. 1

1. neurčen, 2. trisacharidy, 3. maltóza + sacharóza, 4. glukóza, 5. fruktóza

Úprava vzorku

Vzorky sladiny, mladiny a piva jsme nejprve upravili za účelem odstranění především bílkovin, jejichž přítomnost může způsobovat zanášení kolon a současnou interferenci při refraktometrické detekci. Všechny vzorky se smíchaly v poměru 2 : 3 s methanolem a ochladily na -18°C . Po třech hodinách se co nejrychleji zfiltraly přes filtrační papír (bílá páska) a filtrát se odpařil v kuželové baňce na vakuové odparce do sucha. Získaný odparek jsme rozpustili v odpovídajícím množství destilované vody, a to tak, aby celková koncentrace sacharidů odpovídala koncentraci standardního roztoku cukrů. Takto upravené vzorky se dávkovaly na kolonu. Vzhledem k tomu, že při chromatografii na ionexech Ostion v Ca^{2+} formě a za použití destilované vody jako elučního činidla se nedělí maltóza a sacharóza, byla u sladiny, mladiny a piva část vzorků invertována na koloně naplněné Ostionem LG KS 0802 při teplotě 85°C a poté znovu stanoven obsah sacharidů. Z rozdílu stanovení před a po inverzi jsme početně zjistili obsah sacharózy.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V tabulkách 1 až 4 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu sacharidů ve standardní směsi, sladině, mladině a pivu, současně jsou uvedeny záznamy chromatogramů získaných při těchto analýzách (obr. 3 a 4). Hodnoty získané analýzou vzorků po provedené inverzi neuvádíme, neboť se nedosáhly uspokojivé výsledky, které by statisticky potvrdily použitelnost tohoto postupu.

V rámci experimentálních pokusů s dělením vzorků na koloně naplněné Separonem SI C_{18} jsme nezískali ani v jednom případě reprodukovatelné výsledky a je tedy zřejmé, že Separon SI C_{18} nelze použít za těchto podmí-

nek k dělení přírodních materiálů. Je vhodný pouze k testování čistých směsí sacharidů nebo minimálně znečištěných vzorků jako jsou např. hydrolyzáty škrobu.

Lze tedy konstatovat, že chromatografií na ionexech Ostion LG KS v Ca^{2+} cyklu lze v poměrně krátké době (25 minut) a s chybou menší než 3 % dělit základní sacharidy pivovarských meziproduktů a piva. Nespornou výhodou této metody je možnost použití izokratické eluce destilovanou vodou a dále skutečnost, že použité ionexy jsou domácího původu, jejich cena je však dosud dosti vysoká. Nároky na instrumentální vybavení u této metody jsou značné a nelze tedy předpokládat její využití v běžné praxi. Domníváme se však, že lze tuto metodu úspěšně modifikovat a použít při řešení některých úkolů souvisejících se zajišťováním obsahu a změn sacharidů v různých potravinářských surovinách a výrobcích.

Literatura

- [1] BOEHME, W., STENZ, H., BONSIGNORI, O.: Principles and applications of an LC polarimetric detector. *International Laboratory*, 15, 1983, č. 5, s. 28–35
- [2] EDWARDS, P., HAAK, K. K.: A pulsed amperometric detector for ion chromatography. *International Laboratory*, 15, 1983, č. 5, s. 38–44
- [3] ŠEDOVÁ, H., KAHLER, M., VOBORSKÝ, J.: Využití vysokotlaké chromatografie k stanovení některých složek extraktu piva. *Kvas. prům.* 28, 1982, č. 9, s. 193–197
- [4] The Liquid Chromatographer (Published by Bio-Rad Laboratories): An update on HPLC columns for carbohydrate analysis. 1979, č. 2EG, s. 4–5
- [5] The Liquid Chromatographer (Published by Bio-Rad Laboratories): Fermentation monitoring with HPLC. 1981, č. 7EG, s. 4
- [6] VRÁTNÝ, P., OUHRABKOVÁ, J., ČOPIKOVÁ, J.: Liquid chromatography of non-reducing oligosaccharides: a new detection principle. *J. Chromatog.*, č. 191, 1980 s. 313–317

Ondroušek, S. - Basařová, G. - Louková, H.: Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie při stanovení sacharidů v pivovarských meziproduktech a v pivu. *Kvas. prům.* 30, 1984, č. 5, s. 98–102.

V článku je popsána možnost kvantitativního stanovení sacharidů v pivovarských meziproduktech a v pivu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na iontoměničích československého původu Ostion LG KS. Současně se zjistilo, že k dělení sacharidů těchto vzorků nelze použít chromatografie na silikagelech se zakotvenou reverzní fází C_{18} .

Ондрoушек, С., Басаржова, Г., Лоукова, Г.: Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии при установлении сахаридов в пивоваренных промежуточных продуктах и в пиве. *Квас. прум.* 30, 1984, № 5, стр. 98–102.

В статье описана возможность количественного установления сахаридов в пивоваренных промежуточных продуктах и в пиве при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на ионексах чехословацкого происхождения Остион ЛГ КС. Одновременно было найдено, что для разделения сахаридов этих проб нельзя применить хроматографию на силикагелях с неподвижной реверсивной фазой C_{18} .

Ondroušek, S. - Basařová, G. - Louková, H.: Application of HPLC for Determination of Saccharides in Brewing Intermediates and in Beer. *Kvas. prům.* 30, 1984, No. 5, pp. 98–102.

The article describes the quantitative determination of saccharides in brewing intermediates and in beer using high pressure liquid chromatography on Czechoslovak ion exchanger Ostion LG KS. It has been found that chromatography on silicagels with the stationary reverse phase of C_{18} cannot be used for the separation of saccharides.

Obr. 4 Analýza vzorku piva Budvar 12% na Ostionu LG KS 0803

Podmínky: viz obr. 1

1. neurčen, 2. trisacharidy, 3. maltóza + sacharóza, 4. glukóza, 5. fruktóza

Ondroušek, S. - Basařová, G. - Louková, H.: Anwendung hochwirksamer Flüssigkeitschromatographie bei der Bestimmung der Saccharide in den Brauerei-Zwischenprodukten und im Bier. Kvas. prům. **30**, 1984, Nr. 5, S. 98—102.

In dem Artikel wird die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der Saccharide in Brauerei-Zwischenproduk-

ten und Bier durch hochwirksame Flüssigkeitschromatographie auf den Ionenaustauschern tschechoslowakischer Herkunft Ostion LG KS beschrieben. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit hat sich weiter erwiesen, daß zur Auftrennung der Saccharide dieser Proben die Chromatographie auf Silikagel mit verankerter Reversionsphase C_{18} nicht geeignet ist.