

Odrůdy českého chmele a jejich biochemická charakteristika pomocí techniky HPLC

Ing. FRANTIŠEK KROUPA, Výzkumný a šlechtitelský ústav chmelařský, Žatec

Klíčová slova: chmel (*Humulus lupulus* L.), α - hořké kyseliny, β - hořké kyseliny, odrůdy českého chmele, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

663.423

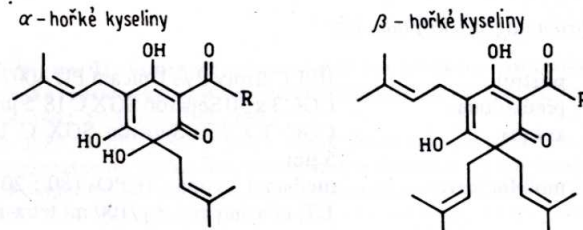
1. ÚVOD

Na kvalitu chmele, jako na jednu z nejdůležitějších pivovarských surovin, je kladen velký důraz. V minulosti se hodnocení kvality chmele provádělo převážně subjektivními metodami, tj. na základě jeho morfologické charakteristiky a arómatu. To však nelze například použít u chmelových pelet nebo extraktů. Dnes se využívají i metody objektivní, které zjišťují chemické složení chmele. Z pivovarského hlediska jsou hlavní složkou ve chmelových hlávkách chmelové pryskyřice a chmelové silice. Chmelové pryskyřice lze rozdělit do dvou základních frakcí, z nichž frakce měkkých pryskyřic je nejcennější. Ve frakci měkkých pryskyřic mají největší význam α -hořké kyseliny (jedná se o směs několika analogů, z nichž tři nejvýznamnější jsou kohumulon, humulon a adhumulon) a β -hořké kyseliny (směs několika analogů, nejvýznamnější jsou kolupulon, lupulon a adlupulon). Strukturní vzorce uvedených látek jsou na obrázku 1 a 1a.

Pro jejich měření byla, nebo je používána řada metod:

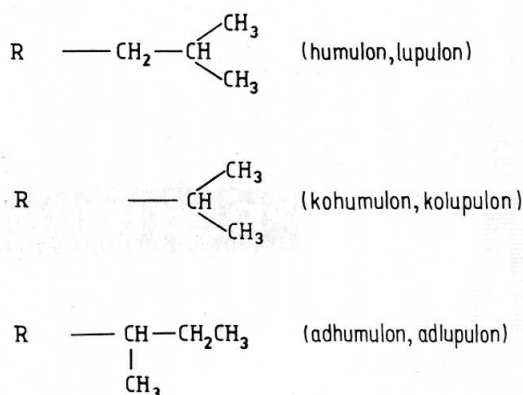
gravimetrická podle Wöllmera (1), polarimetrická (2), spektrofotometrická (3) a konduktometrická (4). Teprve s rozvojem techniky plynové chromatografie a zejména vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) však bylo možno měřit

současně α - a β -hořké kyseliny a stanovit i jejich jednotlivé analogy [5, 6, 7]. V dalších pracích se uvádí, že procentní zastoupení jednotlivých analogů (zejména u α -hořkých kyselin) je závislé na zrání chmele a vlivu přírodních podmínek daného roku.



Obr. 1. Strukturní vzorce α - a β -hořkých kyselin

Jelich podíly z celkových kyselin (hlavně je sledován podíl kohumulonu a kolupulonu) jsou však pro každou odrůdu nebo alespoň skupinu odrůd charakteristické [8, 9, 10, 11].



Obr. 1 a Význam R v obrázku 1

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Materiál

Všechny analyzované chmele pocházely z lokality Kněžves (1988, 1990 a 1991), kde jsou pěstovány všechny u nás povolené odrůdy chmele, a ze základní školky povolených odrůd a světového sortimentu odrůd v areálu VŠÚCH v Žatci (1987 a 1988). Do pokusu bylo zahrnuto všech 10 běžně pěstovaných odrůd (Klony 31, 72 a 114, Aromat, Blato, Lučan, Podlešák, Siřem, Universal a Zlatan) a dvě speciální odrůdy (VÚCH 70 a VÚCH 71) netradičního charakteru, které je možno pěstovat pouze na zvláštní povolení MZe ČR. Vzorky byly sklizeny při dosažení technologické zralosti a ihned analyzovány.

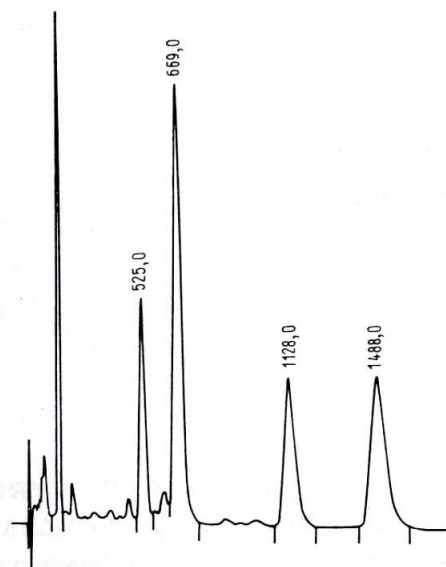
Příprava vzorků

K 5,0 g usušeného chmele bylo přidáno 50 ml toluenu a vzorek se nechal 30 minut extrahovat třepáním. Potom byl přefiltrován přes papírový filtr střední pórovitosti do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku. Z tohoto základního roztoku byly odpipetovány 4 ml do zábrusové baňky (srdcovky), odpařeny na rotační vakuové odparce (teplota vodní lázně 40 °C). Zbytek byl rozpuštěn ve 12,5 ml methanolu a přefiltrován do zkumavky. Takto připravený vzorek byl ředěn podle potřeby a analyzován technikou HPLC.

Chromatografické podmínky

přístroj:	HPLC firmy Pye Unicam PU 4002
předkolona:	CGC 3 x 30 Separon SGX C 18 5 μm
kolona:	CGC 3 x 150 Separon SGX C 18 5 μm
mobilní fáze:	methanol : voda : H ₃ PO ₄ (80 : 20 : 1,7) obsahující 1,3 g/100 ml tetra-n-butyl-amoniumhydroxid
průtok:	0,8 ml/min
teplota kolony:	40 °C
detekce:	UV při 270 nm
citlivost detekce:	0,16 AUFS
dávkování vzorku:	10 μl

Kvantifikace byla prováděna metodou vnějšího standardu. Na obr. 2 je znázorněn typický chromatogram klasického žateckého poloraného červeňáku (Klon 72).



SAMPLE A004 Klon 72 1117 090192
Method :

Table No. 1

RETH TIME	PEAK HT	PEAK AREA	CONC	%CONC	PEAK NAME
525.0	357.622	8951.879	1.893	18.047	Kohumulon
669.0	714.110	26667.791	3.304	30.376	H+Adhumulon
1128.0	240.882	12436.838	1.893	17.493	Kolupulon
1488.0	240.749	16251.918	4.587	42.173	L+Adlupulon

Obr. 2. HPLC-chromatogram analogů α- a β- hořkých kyselin u českého chmele (Klon 72)

3. VÝSLEDEK A DISKUSE

Ze sklizně 1987 bylo analyzováno 7 odrůd, v roce 1988 4 odrůdy, v roce 1990 11 a v roce 1991 všech 12 povolených odrůd. Získané výsledky jsou shrnuty do tabulek 1, 2, a 3. Variabilita výsledků (podíl kohumulonu, kolupulonu a poměr

Tab.1. Zastoupení kohumulonu u odrůd českého chmele v letech 1987 - 1991

Odrůda	kohumulon (rel. %)				Aritmetický průměr (%)	Směrodatná odchylka (%)
	1987	1988	1990	1991		
Klon 31	25,3		25,1	23,5	24,63	0,99
Klon 72	27,3	23,9	25,3	24,3	25,20	1,52
Klon 114	29,7		25,7	24,4	26,60	2,76
Aromat				25,8		
Blato			25,5	24,8	25,15	0,49
Lučan			24,2	24,0	24,10	0,14
Podlešák	26,9	23,0	23,7	26,1	24,93	1,87
Siřem	28,7		23,7	23,4	25,27	2,98
Universal			25,1	26,9	26,00	1,27
Zlatan	27,0		26,6	25,6	26,67	1,10
VÚCH 70	27,9	28,7	23,5	26,5	26,65	2,29
VÚCH 71		26,9	24,7	25,1	25,57	1,17

Tab.2. Zastoupení kolupulonu u odrůd českého chmele v letech 1987 - 1991

Odrůda	Kolupulon (rel. %)				Aritmetický průměr (%)	Směrodatná odchylka(%)
	1987	1988	1990	1991		
Klon 31	40,4		38,7	40,8	39,97	1,12
Klon 72	40,6	40,7	40,5	41,9	40,93	0,66
Klon 114	43,0		39,0	42,0	41,33	2,08
Aromat				42,4		
Blato			40,8	42,4	41,60	1,13
Lučan			39,2	43,7	41,45	3,18
Podlešák	42,0	38,1	38,3	43,7	40,53	2,77
Siřem	43,8		38,7	42,1	41,53	2,60
Universal			39,4	41,3	40,35	1,34
Zlatan	42,3		39,4	42,3	41,33	1,67
VÚCH 70	42,5	40,5	42,7	40,5	41,55	1,22
VÚCH 71		42,1	45,0	46,7	44,60	2,33

Tab.3. Poměr α - a β - hořkých kyselin (AHK: BHK) u odrůd českého chmele v letech 1987 - 1991

Odrůda	AHK : BHK				Aritmetický průměr (%)	Směrodatná odchylka(%)
	1987	1988	1990	1991		
Klon 31	0,39	0,50	0,66	0,67	0,56	0,13
Klon 72	0,48	0,60	0,71	0,62	0,60	0,09
Klon 114	0,54	-	0,69	0,70	0,64	0,09
Aromat	0,68	0,68	-	0,67	0,68	0,01
Blato	0,55	0,42	0,72	0,56	0,56	0,12
Lučan	0,40	-	0,77	0,59	0,59	0,19
Podlešák	-	0,69	0,74	0,70	0,71	0,03
Siřem	0,48	0,50	0,71	0,75	0,61	0,14
Universal	0,54	-	0,69	0,57	0,60	0,08
Zlatan	0,52	0,49	0,52	0,64	0,54	0,07
VÚCH 70	1,30	1,49	1,10	1,34	1,31	0,16
VÚCH 71	0,78	0,89	0,85	0,85	0,84	0,05

obsahu α - a β - hořkých kyselin je geneticky determinován) u stejné odrůdy v jednotlivých letech je způsobena různými klimatickými podmínkami daného roku.

Naměřené hodnoty odpovídají předpokladu, že české odrůdy (Klon 31, 72 a 114, Aromat, Blato, Lučan, Podlešák, Siřem, Universal, Zlatan) nelze na základě stanovení podílů ko-složek technikou HPLC mezi sebou prakticky rozlišit. Nejde totiž o odrůdy vzniklé křížením, ale o odrůdy, které byly získány klonovým výběrem (tj. o rostliny se stejným genetickým základem). Z toho důvodu jsou si hodnoty všech tří sledovaných parametrů u jmenovaných odrůd velmi podobné a lze jich použít pro biochemickou charakterizaci českého chmele. Český chmel (žatecký poloraný červeňák) je pak možno charakterizovat těmito průměrnými hodnotami: podílem kohumulonu 25,44 \pm 0,59 % rel., kolupulonu 41,14 \pm 0,51 % rel. a poměrem α - / β - hořkých kyselin 0,61 \pm 0,05.

Jiným případem jsou nové povolené odrůdy VÚCH 70 a VÚCH 71, které byly získány křížením. Odrůda VÚCH 70 byla získána z hybridního potomstva odrůdy Northern Brewer ozařované na Gama-poli a opylené komponenty české provenience. Obsahuje 8 až 11 % α - hořkých kyselin a 8 až 10 % β - hořkých kyselin. Podíl kohumulonu a kolupulonu je sice podobný českému chmelu, ale poměr α - / β - je více než dvojnásobný (vyšší obsah α - hořkých kyselin). Tímto parametrem je tedy velmi snadno odlišitelná od ostatních odrůd českého chmele.

Odrůda VÚCH 71 byla získána z hybridního potomstva kombinačního křížení odrůd Osvaldova klonu 126, Northern Brewer a komponentů české provenience. Obsahuje 7 až 9 %

α - hořkých kyselin a 10 až 12% β - hořkých kyselin. Obsah kohumulonu má podobný českému chmelu, ale odlišuje se zvýšeným obsahem kolupulonu a poměrem α - / β - hořkých kyselin.

Poděkování

Děkuji za technickou spolupráci a asistenci p. M. Jakubkové.

LITERATURA

- [1] WÖLLMER W.: Woch. Brau., 47, 1930, s. 1
- [2] GOUGH W.: J. Inst. Brew., 62, 1956, s. 9
- [3] ALDERTON G. et al.: Anal. Chem., 26, 1954, s. 983
- [4] HOWARD G. A.: J. Inst. Brew., 77, 1971, s. 18
- [5] ONO M. et al.: J. Am. Soc. Brew. Chem., 41, 1983
- [6] SANDRA P. et al.: J. High Res. Chromatogr. 1990, s. 527
- [7] FORSTER A., KOBERLEIN A.: Mschr. Brauwiss., 36, 1983, 6, s. 248
- [8] KENNY S. T.: J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 1990, s. 3
- [9] NICKERSON G. B., WILLIAMS P. A., HAUNOLD A.: J. Am. Soc. Brew. Chem., 44, 1986, s. 91
- [10] HAUTKE P., KROUPA, F.: Dílčí závěrečná zpráva DÚ 04, VŠÚCH Žatec, 1987, s. 17
- [11] WACKERBAUER K., BALZER U.: Mschr. Brauwiss., 41, 1988, s. 252

Lektoroval doc. Ing. Jaroslav Čepička, CSc.

Kroupa, F.: Odrůdy českého chmele a jejich biochemická charakteristika pomocí techniky HPLC. Kvas. prům., 38, 1992, č. 5, s. 129 - 132

V letech 1987, 1988, 1990 a 1991 byly provedeny analýzy zastoupení jednotlivých analogů α - a β - hořkých kyselin ve všech 12 povolených českých odrůdách. Každá odrůda tak byla charakterizována podílem kohumulonu, kolupulonu a poměrem obsahu α - a β - hořkých kyselin. Potvrdilo se, že odrůdy stejného genetického základu, získané klonovým výběrem, nelze od sebe odlišit. Dobře lze odlišit odrůdy VÚCH 70 a VÚCH 71 získané křížením. Při identifikaci odrůd však nelze spoléhat jen na jeden zjištěný parametr. Příčinou je určitá variabilita hodnot obsahu analogů hořkých kyselin vlivem přírodních podmínek, ale i podobnost některých odrůd v určitých znacích. Dalším důležitým kritériem, které by potvrdilo uvedené poznatky a závěry, je stanovení složení chmelových silic.

Круппа, Ф.: Сорта чешского хмеля и их биохимическая характеристика при помощи техники HPLC. Квас. прум., 38, 1992, № 5, стр. 129 - 132

В 1987, 1988, 1990 и 1991 годах были проведены анализы представления отдельных аналогов α - и β -горьких кислот во всех 12 разрешенных чешских сортах. Каждый из сортов, таким образом был характеризован долей когумулону, колупулону и соотношением содержания α - и β - горьких кислот. Было подтверждено, что сорта одинаковой генетической базы, полученные клонным выбором, нельзя отличить друг от друга. Хорошо отличить можно сорта ВУХ 70 и ВУХ 71, полученные путем скрещивания. При идентификации сортов однако нельзя надеяться на один только установленный параметр. Причиной является определенная вариабильность величин содержания аналогов горьких кислот под влиянием природных условий, а также и подобные некоторых сортов в определенных знаках. Следующим важным критерием, который подтвердил бы приведенные сведения и выводы, является определение состава эфирного хмелевого масла.

Kroupa, F.: Czech Hop Varieties and Their Biochemical Characteristics Determined by HPLC. Kvas. prům. 38. 1992, No. 5, pp 129 - 132

Analyses of the individual analogs of α - and β - bitter acids from all the 12 allowed Czech hop varieties were performed during 1987, 1988, 1990 and 1991. Each variety has been characterized by the level of cohumulone, colupulone and by the ratio of α - and β - bitter acids. It was proved that the varieties with the same genetic basis, obtained by cloning, cannot be distinguished. The varieties VUCH 70 and VUCH 71 obtained by crossing can distinguish quite well. The variety identification cannot be made on a base of one parameter only. It follows from the fact that some variability in levels of the bitter acid analogs results from different nature conditions and some similarities of varieties in the special characteristics. Further significant criterion which proves the above mentioned facts is the determination of the hop-oil composition.

Kroupa, F.: Die böhmischen Hopfensorten und ihre biochemische Charakteristik mittels der HPLC- Technik. Kvas. prům. 38, 1992, Nr. 5, S. 129 - 132

In den Jahren 1987, 1988, 1990 und 1991 wurden Analysen der Vertretung der einzelnen Analogen der α - und β - Bittersäuren in allen 12 genehmigten böhmischen Hopfensorten durchgeführt. Jede Sorte wurde auf diese Art durch den Anteil des Kohumulons sowie Kolupulons und durch das Verhältnis des Gehalts der α - und β - Bittersäuren charakterisiert. Es wurde bestätigt, daß die Sorten der gleichen genetischen Basis, die durch Klonenauswahl gewonnen wurden, nicht gegenseitig voneinander unterschieden werden können. Die durch Kreuzung gewonnene Sorten VUCH 70 und VUCH 71 kann man gut auseinanderkennen. Bei der Sortenidentifikation sollte man sich jedoch nie nur auf einen einzigen festgestellten Parameter verlassen. Dies ist durch eine bestimmte Variabilität der Werte des Gehalts der Bittersäuren-Analoga unter dem Einfluß der Naturbedingungen begründet; eine Rolle spielt hier jedoch auch die Ähnlichkeit einiger Sorten in bestimmten Merkmalen. Ein weiteres Kriterium, das die erörterten Erkenntnisse und Schlüsse bestätigen könnte, stellt die Bestimmung der Hopfenöle dar.