

STANOVENÍ 5-HYDROXYMETHYLFURFURALU (HMF) PRŮTOKOVÝM ANALYZÁTOREM

JAN ŠAVEL, Budějovický Budvar n.p., České Budějovice
KAREL PAZOUREK, Carbon Instruments s.r.o. (Skalar Group), Praha

Klíčová slova: pivo, průtokový analyzátor, 5-hydroxymethylfurfural

1 ÚVOD

Obsah 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF) a furfuralu se často používá jako analytický znak, vhodný k hodnocení následků teplotních změn při výrobě a skladování piva i jiných potravin. Vznik furfuralu a HMF se obvykle spojuje s tepelným rozkladem sacharidů v kyselém prostředí nebo s přeměnami meziproduktů Maillardovy reakce.

V klasické práci Winkler použil stanovení HMF k rozlišení původu medu, a proto spektrofotometrická metoda s kyselinou barbiturovou a p-toluidinem nese jeho jméno [1]. Stejně sdělení také popisuje přímé spektrofotometrické stanovení HMF, přičemž roztok HMF ($c = 10^{-4}$ mol.l⁻¹, 12,6 mg.l⁻¹) vykazoval výrazné absorpční maximum 1,57 AU při 282 nm.

V pivovarství se měření obsahu HMF v minulosti používalo pro hodnocení průběhu chmelovaru a chlazení mladiny [2]. Obsah HMF a furfuralu také vzrůstá při stárnutí piva, přičemž se obě sloučeniny pokládají za nepřímé indikátory stárnutí, neboť jejich koncentrace v starém pivu nedosahují senzoricky zjistitelných hodnot [3]. Významnou souvislost mezi obsahem HMF a barvou mladiny i piva našli Kieninger a Bikova [4].

Z této skutečnosti vyplývá, že stárnutí piva souvisí s neenzymovou přeměnou sacharidů. Přitom se množí důkazy o účasti sacharidů při tvorbě senzoricky významných sloučenin během stárnutí piva a také o radikálové povaze těchto reakcí [5, 6]. Této problematice se také věnovalo několik sdělení na posledním kongresu EBC v Budapešti v roce 2001.

K stanovení HMF se používají klasické i moderní analytické metody, většinou kapalinová chromatografie [3]. Pro

stanovení HMF ve víně se používá průtokový analyzátor SKALAR, uvedený rozsah 1–100 mg.l⁻¹ je však pro stanovení v pivu příliš vysoký. Tento článek se proto zabývá možností automatického stanovení HMF v pivu.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie

Kyselina barbiturová, p-toluidin a 5-hydroxymethylfurfural pocházely od firmy Sigma Aldrich. Kalibrační roztok obsahující HMF ($c = 10$ mg.l⁻¹) v deionizované vodě se připravoval ředěním základního roztoku ($c = 100$ mg.l⁻¹).

2.2 Přístroje

2.2.1 Průtokový analyzátor

Průtokový analyzátor SANplus se segmentovaným tokem, dialyzační jednotkou a fotometrickým detektorem (550 nm) firmy SKALAR Analytical b.v. Breda, Holandsko.

2.2.2 Spektrofotometr

Spektrofotometr CADAS 200 s křemennou kyvetou s optickou dráhou 10 mm od firmy Dr. Lange, Německo.

2.3 Postupy

2.3.1 Stanovení HMF

Stanovení HMF se zakládalo na klasické metodě podle Winklera s odstraněním vysokomolekulárních látek dialýzou v analyzátoru SKALAR. Čistota a koncentrace kalibračního roztoku HMF se ověřovala spektrofotometricky v UV oblasti [1].

2.3.2 Tvorba HMF při různých teplotách

Vzorky červeného vína a ovocných džusů z maloobchodu se plnily do

200 ml lahvíček s kloboučkovými uzávěry. Lahvičky se spolu s lahvemi 12% nepasterovaného piva skladovaly v termostatech při 6, 28, 37 a 45 °C. V pravidelných časových intervalech se stanovoval HMF.

3 VÝSLEDKY

3.1 Obsah HMF v kongresní sladince a mladině

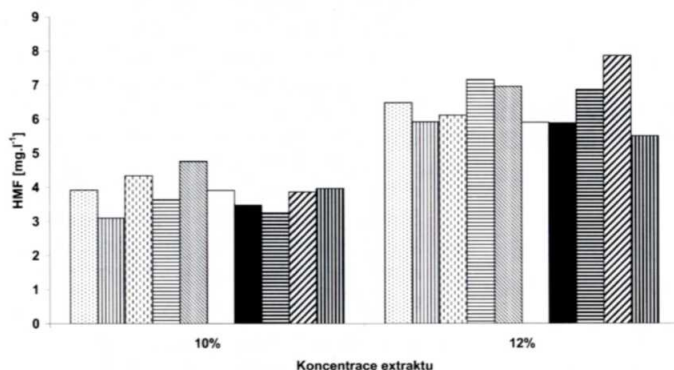
Obsah HMF v kongresních sladinách se u souboru 25 vzorků pohyboval v rozmezí 0,18 až 1,30 mg.l⁻¹ s průměrnou hodnotou 0,57 mg.l⁻¹. Obsah HMF ve vzorcích 10% a 12% mladiny, odebrané za chladičem u 10 várek, uvádí obr. 1. Koncentrace HMF v 10% mladínách se pohybovala okolo 3–5 mg.l⁻¹, u 12% mladiny kolísala mezi 5–8 mg.l⁻¹.

3.2 Obsah HMF v průběhu hlavního kvašení

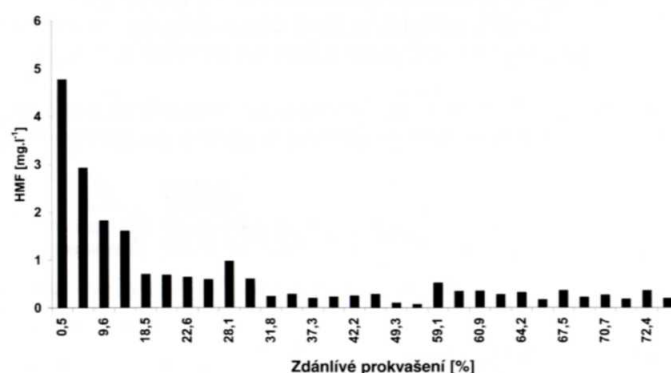
Obsah HMF v kvasící 12% mladince v závislosti na stupni zdánlivého prokvašení uvádí obr. 2. Původní vysoký obsah HMF v mladínách se v počátku kvašení rychle snížil na hodnoty, blízké se koncentracím HMF v hotovém pivu.

3.3 Obsah HMF během stárnutí piva při 20 °C

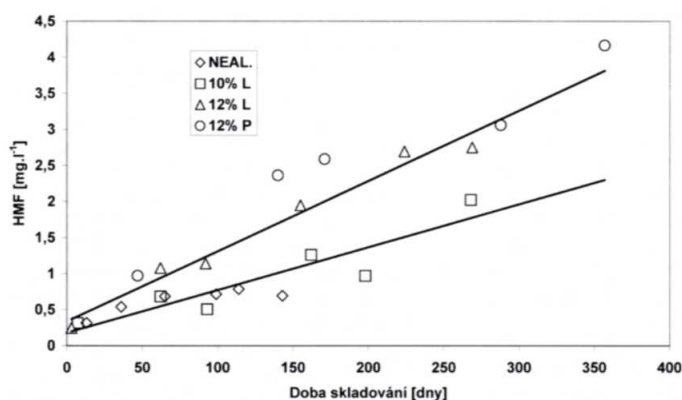
V různě starých vzorcích nealkoholického piva, výčepního piva a ležáku se stanovil obsah HMF v závislosti na době po stočení při 20 °C (obr. 3). Tvorba HMF během stárnutí piva závisela na koncentraci původního extraktu, což znázorňují dva přímkové trendy pro 10% a 12% lahvové pivo. Zbývající závislosti obsahu HMF na době stárnutí pro nealkoholické pivo nebo 12% pivo v plechovkách se znázorněným trendům blí-



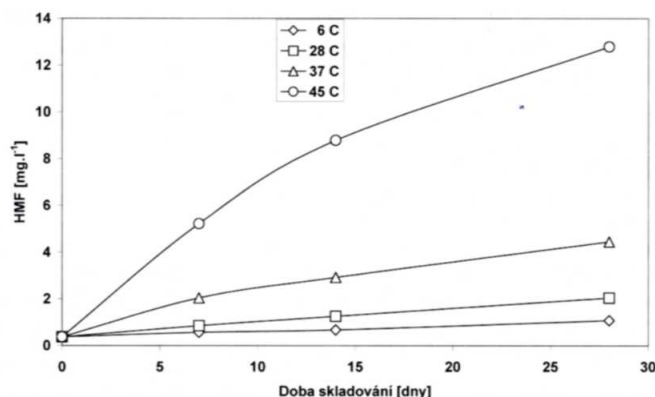
Obr. 1 Obsah HMF v 10% a 12% studené mladině v průběhu 10 várek



Obr. 2 Obsah HMF v průběhu hlavního kvašení 12% piva



Obr. 3 Stárnutí nealkoholického (NEAL., v lahvích), 10 a 12% piva v lahvích (L, znázorněné trendy) a plechovkách (P) při 20 °C



Obr. 4 Tvorba HMF při stárnutí 12% piva při 6, 28, 37 a 45 °C

žily, a proto se pro přehlednost neuvádějí.

3.4 Obsah HMF v nápojích při různých teplotách stárnutí

Obsah HMF v průběhu stárnutí piva při různých teplotách uvádí obr. 4. Poměrně výrazný trend nárůstu HMF pro jednotlivé teploty byl zaznamenán u 12% piva, přičemž pro teplotu 45 °C již neplatila přímková závislost nárůstu HMF s časem ohřevu.

U ovocných džusů nebyly výsledky jednoznačné, a zahrnovaly větší kolísání hodnot obsahu HMF při 45 °C i občasné poklesy hodnot při 28 °C, což pravděpodobně souviselo s redukcí HMF pomnoženou kontaminací. Počáteční hodnoty HMF v červeném víně (7,5 mg.l⁻¹) se během skladování při všech teplotách výrazně nezvýšily.

4 DISKUSE

Obsah HMF v pivovarské výrobě se v současnosti považuje za vhodný indikátor stárnutí piva i průběhu technologických operací při jeho výrobě [3, 5, 6]. Radikálovou teorií vzniku HMF ze sacharidů, navrženou v roce 1999, se znovu nyní podařilo potvrdit poklesem rychlosti tvorby HMF po přidavku činidla, používaného jinak pro záchyt radikálů kyslíku technikou elektronové spinové rezonanční spektroskopie (ESR) [5, 6].

Naměřené hodnoty (obr. 1–3) v podstatě odpovídají hodnotám, uváděným v literatuře. Shimizu et al. [6] našli obsahy HMF v zchlazené mladině v roz-

mezí asi 4 – 7 mg.l⁻¹ podle způsobu její přípravy za přístupu nebo nepřístupu vzduchu. Sladina obsahovala méně než 1 mg.l⁻¹ HMF, podobně jako stočené pivo. Těmto hodnotám obsahu HMF v mladině odpovídají i nálezy Huga, zatímco Kieninger a Bikova naopak našli vyšší hodnoty [2,4].

Obsah HMF v ležácích kolísá mezi 0,7–1,8 mg.l⁻¹ s rychlostí tvorby 0,06 – 0,19 mg.l⁻¹ HMF za týden, obsah HMF v nealkoholickém pivu byl 0,9 mg.l⁻¹ [3]. Po 3 měsících skladování ležáků při 30 °C vzrostl obsah HMF na hodnoty 4–7 mg.l⁻¹ [6]. Podobná závislost byla nalezena u furfuralu nebo furfuralového ekvivalentu FE [5, 7, 8].

Změny obsahu HMF nebo furfuralu během výroby piva opět odpovídaly obecně uváděným trendům, přičemž jejich koncentrace stoupala od rmutování až po chlazení mladiny, potom opět po zakvašení poklesla redukcí kvasničními buňkami a nakonec opět stoupala po stočení piva během jeho stárnutí [7,8].

Při stárnutí piva výrazně závisí nárůst HMF na koncentraci původního extraktu, což opět souhlasí s dříve pozorovaným trendem u furfuralu [8]. Se znalostí data stočení a druhu piva je obsah HMF, furfuralu nebo furfuralového ekvivalentu dobrým ukazatelem ošetření piva a teploty skladování.

Pro automatické stanovení obsahu furfuralového ekvivalentu i HMF jsou nyní k dispozici dva automatické postupy, oba s použitím analyzátoru SKALAR. Stanovení tzv. furfuralového ekvivalentu (FE) se zakládá na izolaci

těkavých látek automatickou destilační jednotkou a měření absorbance destilátu při 275 nm [8]. Narozdíl od stanovení HMF není přitom nutné použít chemikálie, analytický postup je proto vysoce ekologický a náklady na chemikálie prakticky nulové.

Narozdíl od všeobecně uznávané teorie, podle které se smyslové stárnutí piva spojuje s oxidačními změnami nenasycených mastných kyselin, se nyní zdá, že neméně významné jsou změny sacharidických složek, spojené se vznikem furfuralu a HMF. Stanovení HMF i FE v průtokovém analyzátoru proto umožňuje zavést tyto analýzy do rutinní průmyslové kontroly s vysokou účinností i výkonem (25 vzorků za 1 h).

Literatura

- [1] WINKLER, O.: Z. Lebensmittel-Unters. U. – Forsch. **102**, 1955, č. 3, s. 161
- [2] HUG, H.: Brauerei Getränke Rdsch. **103**, 1992, č. 1/2, s. 1
- [3] MADIGAN, D., CLEMENTS, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **56**, 1998, č. 4, s. 146
- [4] KIENINGER, H., BIKOVA, V.: Brauwelt **115**, 1975, č. 38, s. 1250
- [5] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVA, D.: Proc. EBC 27th Congr., Cannes 1999, s. 267
- [6] SHIMIZU, C., Y. et al.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **59**, 2001, č. 2, s. 51
- [7] THALACKER, R., BÖBENDORFER, G., BIRKENSTOCK, B.: Brauwelt **138**, 1998, č. 10/11, s. 421
- [8] ŠAVEL, J., PAZOUŘEK, K.: Stanovení furfuralového ekvivalentu (FE) v pivovarství (dosud nepublikováno)

Lektorovala Ing. D. Hašková
Do redakce došlo 30. 7. 2001

Šavel, J. – Pazourek, K.: Stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF) průtokovým analyzátozem. Kvasny Prum. **47**, 2001, č. 11–12, s. 314–316.

Článek pojednává o stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu průtokovým analyzátozem SKALAR v meziproduktech a pivu při jeho výrobě a skladování. Stanovení se zakládá na klasické Winklerově metodě s kyselinou barbiturovou a p-toluidinem po předchozí separaci HMF v dialyzační jednotce. V práci se sle-

dovaly obsahy HMF v laboratorní sladně, mladině, kvasící mladině a v stočeném pivu během jeho stárnutí. V průběhu skladování stočeného piva obsah HMF vzrůstal, přičemž také záviselo na druhu piva. Nalezené změny obsahu HMF souhlasily s literárními údaji, a měření lze zavést do běžné kontrolní praxe k sledování průběhu rmutování, vaření a chlazení mladiny, kvašení a stárnutí piva. Postup umožňuje zpracovávat až 25 vzorků za 1 hodinu.

Šavel, J. – Pazourek, K.: Determination of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by Means of Flow-Through Analyzer. Kvasny Prum. **47**, 2001, No. 11–12, pp. 314–316.

The article deals with the determination of 5-hydroxymethylfurfural in intermediates and beer during its production and storage by means of a SKALAR flow-through analyzer. The determination is based on the classic Winkler's method with barbituric acid and p-toluidine after previous separation of HMF

in a dialyzer unit. In the work, HMF contents were monitored in laboratory wort, hopped wort, hopped wort under fermentation and ready bottled beer in the course of its aging. The content of HMF in bottled beer was increasing in the course of storage, this was also dependent on the type of beer. The changes in HMF content that were found were in agreement with literary data and the measurement can be used for current control applications to monitor the course of mashing, boiling and hopped wort cooling, fermentation and aging of beer. The method enables handling up to 25 samples in one hour.

Šavel, J.–Pazourek, K.: Bestimmung des 5-Hydroxymethylfurfurals (HMF) mittels Durchfluss-Analysator. Kvasny Prum. 47, 2001, Nr. 11–12, S. 314–316.

Der Artikel behandelt die Bestimmung des 5-Hydromethylfurfurals in Zwischenprodukten und Bier im Verlauf der Produktion und Lagerung bei Applikation des Durchfluss-Analysators SKALAR. Die Bestimmung ba-

siert auf der klassischen Winkler-Methode mit Barbitursäure und p-Toluidin nach vorherigen Separation des HMF in der Dialyseeinheit. In der Arbeit wurde der HMF-Gehalt in Laborsüßwürze, Würze, gärender Würze und in dem abgefüllten Bier im Verlauf seiner Alterung verfolgt. Während der Lagerung des abgefüllten Bieres stieg der HMF-Gehalt an, und zwar auch differenziert je nach Biersorte. Die festgestellten Veränderungen des HMF-Gehalts stimmten mit den Literaturangaben überein und die Messung kann zur Einführung in die laufende Kontrollpraxis zur Verfolgung des Maischens, Kochens und Kühlung der Würze, Gärung und Alterung des Bieres empfohlen werden. Das vorgeschlagene Verfahren ermöglicht die Verarbeitung bis 25 Proben pro Stunde.

Шавел, Й.–Пазоурек, К.: Определение 5-гидроксиметилфурфурала (HMF) при помощи проточного анализатора. Kvasny Prum. 47, 2001, Nr. 11–12, стр. 314–316.

В статье описывается определение 5-оксиметилфурфурала в промежуточных продуктах и пиве при его производстве и хранении при помощи проточного анализатора SKALAR. Определение основано на классическом методе Винклера с барбитуровой кислотой и п-толуидином после предыдущего сепарирования HMF диализатором. Приводится исследование содержаний HMF в лабораторном сусле, в охмеленном сусле, в течение брожения и в готовом пиве в течение его старения. При хранении готового пива повышалось содержание HMF в зависимости от сорта пива. Обнаруженные изменения содержания HMF соответствовали теоретическим данным, причем измерение можно ввести на контрольную практику для исследования процесса затираания, кипячения и охлаждения, брожения и старения пива. Метод позволяет обработать до 25 образцов в час.