

ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH SLOUČENIN VE SLADECH JEČNÉHO A PŠENIČNÉHO PŮVODU

Karolína Adámková, Martin Adam a Karel Ventura

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573, 532 10 Pardubice*

Abstract

This study deals with the brewer's malts, their aromaprofiles and their mutual comparison based on the contents of aromatic substances. It is focused on the headspace solid phase microextraction method (HS-SPME) as a suitable procedure for the volatile compounds isolation from brewer's malts and their subsequent separation and detection by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) method. The practical part deals with the optimization of the whole process including both the extraction and the separation/detection conditions. HS-SPME approach based on the combination of two sorption temperatures provides a sufficient response to larger amount of volatile substances in malt samples, where more volatile components were detected together with less volatile substances. HS-SPME sampling efficiency was significantly affected, except extraction temperature (combination of temperatures), just by extraction time, temperature of incubation and pH adjustment. Their significance was determined using Plackett-Burman proposal design of experiment and optimal values were evaluated on the basis of central composite design (CCD). Optimal experimental conditions were as follows: 3 g of crushed malt sample was placed into glass vial and 5 mL of sulfuric acid solution at pH 2.5 was added. The suspension was incubated in a hot-air oven at 90 °C for 15 min. Thereafter the sample was put into a water bath where HS-SPME procedure in combination of two extraction temperatures (90 and 10 °C) for total time 40 min was realised. The desorption of analytes from the fiber was carried out in the injection port of gas chromatograph at 250 °C for 1 min. Based on the obtained aromaprofiles all tested malt samples were compared in terms of their origin and production way.

Souhrn

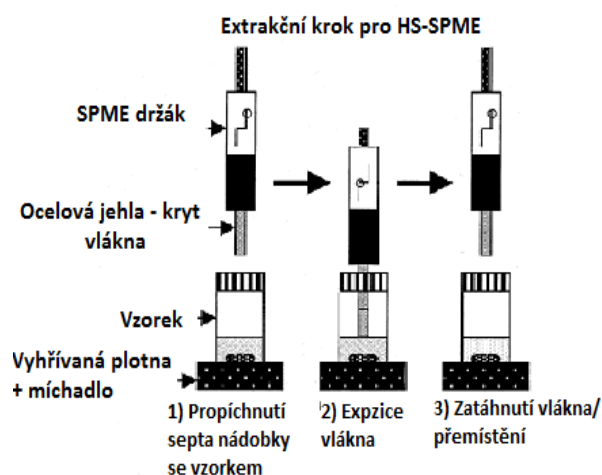
Cílem této práce byla aplikace metody mikroextrakce tuhou fází z headspace prostoru (HS-SPME) pro analýzu aromaprofilu u různých druhů sladů a obilnin. Optimalizace podmínek extrakce byla vyhodnocena ze dvou hledisek, a to s ohledem na velikost odezvy pro 10 vybraných sloučenin a na celkový počet detekovaných píků. Celá optimalizace měla dvoustupňové provedení. Nejprve byly Plackett-Burmanova návrhu experimentu vyhodnoceny statisticky významné faktory a tyto byly následně detailněji optimalizovány dle principů Centrálně kompozitního plánu (CCD). V rámci optimalizace byla dále zkoumána možnost využití kombinace dvou extrakčních teplot s cílem identifikovat maximální množství sloučenin podílejících se na celkovém aromaprofilu. Jako vhodné byly vyhodnoceny tyto parametry: úprava pH na hodnotu 2,5, doba extrakce 40 min, extrakční teplota 90 a 10 °C (20 + 20 min) a teplota inkubace 90 °C. Hodnoty zbylých méně významných faktorů byly voleny na základě zkušeností z předchozích měření (objem kapalné fáze 5 ml, třepání 5 s, doba inkubace 15 min, bez úpravy iontové síly, doba desorpce 1 min při 250 °C a navážka 3 g vzorku. Za uvedených podmínek byly analyzovány 2 druhy sladů ze dvou lokalit a zároveň i vzorky stejného druhu i původu, ovšem různého stáří.

1. Úvod

Slad patří společně s vodou, chmelem a pivovarskými kvasinkami mezi základní suroviny pro výrobu piva. Vyrábí se ve sladovnách humnových nebo modernějších skříňových. V obou případech je princip výroby stejný. Určitá obilnina se máčí do různých tzv. stupňů domočení, pak se nechává klíčit. Následují teplotní úpravy, kterým se říká hvozdění.

V České republice, jakožto pivovarské zemi specializující se zejména na tradiční světlé ležáky plzeňského typu, se vyrábí slady především ječné, pšeničných se vyrábí daleko méně. Tyto slady se liší nejen stavbou zrna a technologií zpracování pro sladařské a pivovarské účely, ale bezpochyby i svými senzoričnými vlastnostmi [1].

Sestavení celkového aromaprofilu znamená identifikovat co největší množství látek po jejich předchozí izolaci a zakoncentrování. Jako vhodná metoda byla vybrána mikroextrakce tuhou fází z „headspace“ prostoru (HS-SPME). Jedná se o způsob extrakce bez použití rozpouštědel. Základním principem je rozdělení analytu mezi vzorek v tuhé nebo kapalné fázi a stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které je umístěno v prostoru nad vzorkem [2]. Schéma tohoto extrakčního procesu viz obr. 1. Organické analyty přecházejí při extrakci do extrakční fáze na vláknech, odkud jsou následně tepelně desorbovány v nástřikovém prostoru plynového chromatografu nebo pomocí rozpouštědla v SPME-HPLC adaptéru.



Obrázek 1: Proces mikroextrakce tuhou fází z headspace prostoru [3]

2. Experimentální část

Pro celou analýzu bylo zvoleno SPME vlákno 50/30 μm DVB/CAR/PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Ke každému měření byly do skleněné nádoby o objemu 20 ml naváženy 3 g čerstvě rozdrceného sladu. Vzorky ječných a pšeničných sladů poskytla humnová sladovna v Záhlinicích na Kroměřížsku a náhodský pivovar Primátor, který ječné

slady nakupuje ve sladovnách Nymburk a Hodonice, pšeničný slad pak odebírá ze sladovny v Litovli. Dále bylo přidáno 5 ml vodného roztoku kyseliny sírové (96% p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR), jehož pH bylo 2,5. Promícháním na třepačce (Yellow line TTS 2; 2500 ot. / min) byla v lahvičce vytvořena suspenze, která byla podrobena inkubaci při 90 °C po dobu 15 min v horkovzdušné sušárně (Memmert UM 300, Schwabach, Německo). Po přemístění do termostatu na bázi vodní lázně (Julabo 5, Seelbach, Německo) byla provedena extrakce při teplotě 90 °C po dobu 20 min a následně ve druhé vodní lázni (Julabo F12, Seelbach, Německo) o teplotě 10 °C probíhala druhá část extrakce po dobu dalších 20 minut. Po celou dobu extrakce bylo SPME vlákno umístěno cca 1 cm nad suspenzí vzorku. Po skončení extrakce následovala desorpce v nástřikovém prostoru GC-MS přístroje při 250 °C po dobu 1 minuty. Nakonec bylo vlákno dočištěno v čističi stříkaček Hamilton Syringe Cleaner (Reno, NV, USA).

Všechny vzorky sladů byly analyzovány pomocí plynového chromatografu GC 17A s hmotnostním detektorem QP 5050A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Jako nosný plyn bylo použito helium 5.0 s lineární rychlostí 30 cm/s. Dávkování vzorku probíhalo při splitovacím poměru 1:6 nebo 1:3. Pro separaci byla použita kapilární kolona DB-5MS (30 m; 0,25 mm, 0,25 µm film; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Teplotní program byl následující: 35 °C (2 min) a lineární nárůst na 270 °C (6 °C/min).

Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu elektronové ionizace při 70 eV v rozsahu skenování 40 – 400 m/z. Iontový zdroj byl po celou dobu analýzy udržován při teplotě 250 °C. Takto byla získaná MS data, jež byla porovnávána s knihovny MS spekter NIST, WILEY a FFNSC. Chromatografická data, především retenční časy, pak sloužila k výpočtům lineárních retenčních indexů získaných s pomocí homologické řady n-alkanů, které pak byly srovnány s on-line databázemi NIST a VCF a s údaji v MS knihovnách.

3. Výsledky a diskuze

Pro Plackett-Burmanův návrh experimentu bylo zvoleno celkem 11 faktorů, jejichž dolní (-1) a horní (+1) úrovně byly uspořádány do 12 experimentů (viz Tab. I a Tab. II). Tři experimenty s největším počtem detekovaných píků byly vybrány pro opakované analýzy, sloužící k výpočtu směrodatné odchylky a určení pravděpodobnosti výskytu chyby, která je pak srovnána s hladinou významnosti (α , $p = 0,05$).

Pro statistické vyhodnocení jednotlivých návrhů experimentu byl použit program Statistica 12 (Dell Inc., Round Rock, TX, USA), kde byly z výsledků sestaveny Paretovy diagramy. První Paretův diagram (obr. 2) zobrazuje významnost jednotlivých faktorů

Tabulka I: Návrh jedenáctifaktorového třídícího experimentu dle Plackett-Burmana

Pokus	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
3	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

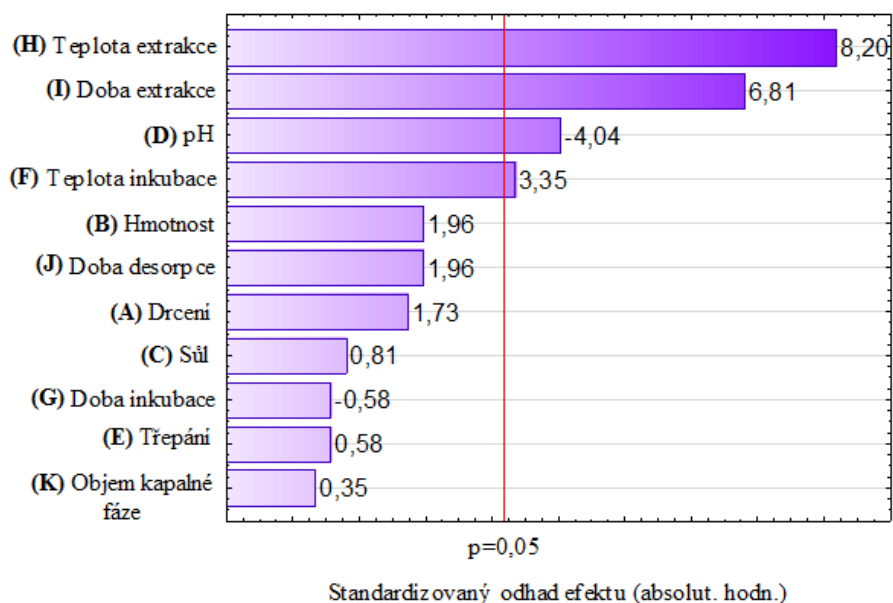
Tabulka II: Zvolené faktory a jejich úrovně pro Plackett-Burmanův návrh experimentu

Faktor	-1	+1
A	drcení	NE
B	hmotnost vzorku	1 g
C	přídavek soli	30 g/100 ml
D	úprava pH	bez soli
E	třepání	bez úpravy pH
F	teplota inkubace	0 s
G	dobu inkubace	10 s
H	teplota extrakce	30 °C
I	dobu extrakce	80 °C
J	dobu desorpce	5 min
K	objem kapalné fáze*	15 s
		30 min
		1 min
		6 ml

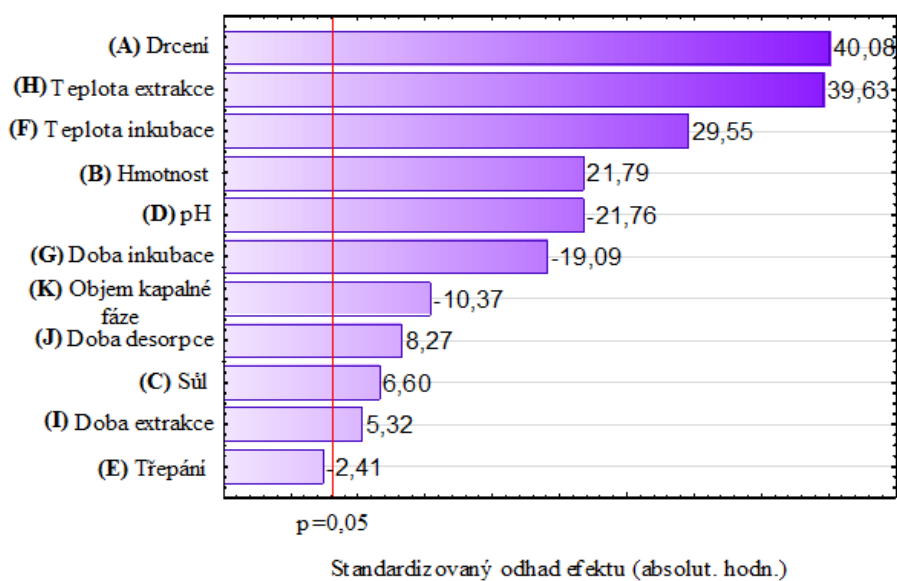
* objem C + objem D

z hlediska počtu detekovaných látek. Mezi statisticky významné faktory patří teplota extrakce, doba extrakce, úprava pH a teplota inkubace. Ostatní faktory byly shledány jako méně významné. Druhý Paretův diagram (obr. 3) je zaměřen na hodnocení významnosti faktorů z hlediska celkové odezvové plochy. Je patrné, že všechny faktory s výjimkou třepání se objevily nad hladinou významnosti. Třídící experiment z hlediska vyhodnocení celkové plochy píků je považován za nesměrodatný. Jediné co si lze z tohoto třídícího experimentu odnést je fakt, že drcení poměrně zvyšuje odezvu analyzovaných látek. Společně s teplotou extrakce, dobou extrakce, úpravou pH a teplotou inkubace, bylo i drcení zařazeno mezi významné faktory, které byly dále optimalizovány pomocí CCD plánu.

Na základě CCD návrhu byly vyhodnoceny příslušné odezvové plochy, které představovaly vzájemnou interakci jednotlivých faktorů a generovaly vhodnost pro 10 sledovaných sloučenin. Z těchto ploch byly odvozeny tzv. vhodnostní profily. I zde bylo



Obrázek 2: Paretův diagram s vyznačenou hladinou významnosti ($p = 0,05$) pro celk. počet látek



Obrázek 3: Paretův diagram s vyznačenou hladinou významnosti ($p = 0,05$) pro celk. plochu

Tabulka IV. Optimální podmínky jako výsledek hodnocení CCD plánu experimentu

Optimální podmínky pro	Úprava pH	Teplota extrakce	Doba extrakce	Teplota inkubace
odezvu 10 vybraných sloučenin	2	70 °C	40 min	30 °C
detekci co největšího počtu píků	4	90 °C	30 min	90 °C
kompromis mezi počtem píků a celkovou plochou	2,5	90 °C	40 min	90 °C

nutné najít v hodnotách faktorů určitý kompromis pro získání co největšího počtu piků, ale zároveň o adekvátní odezvě (viz Tab. IV).

Nakonec byla k optimalizaci zařazena ještě kombinace dvou extrakčních teplot, jelikož optimalizací zvolená teplota 90 °C je teplotou relativně vysokou, což není vhodné pro těkavější látky, které by se jejím vlivem mohly desorbovat z vlákna zpět do headspace prostoru. Byla tedy zařazena druhá extrakční teplota, a sice 10 °C. Jelikož se jedná o kombinaci dvou teplot v jednom extrakčním kroku, musí být striktně dodrženo jejich pořadí. Nejprve musí extrakce proběhnout při teplotě vyšší, kdy jsou sorbovány látky méně těkavé, poté následuje zařazení teploty nižší, kdy dochází k extrakci látek těkavějších.

Otázkou pak zůstalo, jak mezi tyto dvě extrakční teploty rozdělit již optimalizovanou dobu extrakce 40 minut. Po sérii pokusů vyšla jako nejvhodnější varianta rozdělení extrakční doby přesně na půl, tedy 20 a 20 min.

Na základě optimalizace byly nastaveny podmínky experimentu a proměřeny všechny vzorky sladů. Počty detekovaných a identifikovaných sloučenin u jednotlivých vzorků jsou uvedeny v Tab. V.

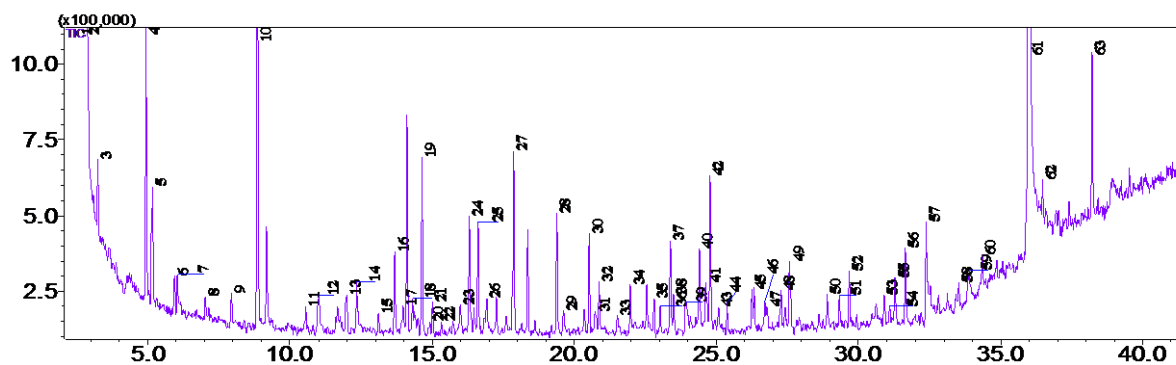
Při porovnání chromatogramů sladů různého druhu (viz. obr. 4), pak ječný a pšeničný slad (Záhlinice) se shodovaly ve 33 sloučeninách, ječný slad pak obsahoval 11 jiných sloučenin a pšeničný se od něj lišil 15 sloučeninami (viz Tab VI.).

Při porovnání sladů stejného druhu vyrobených jinou sladařskou technikou bylo zjištěno, že slad humnový ječný (Záhlinice) se se skříňovým sladem (Primátor) shodoval ve 29 sloučeninách. Oba slady pak obsahovaly po 15 jiných sloučeninách (viz Tab. VII).

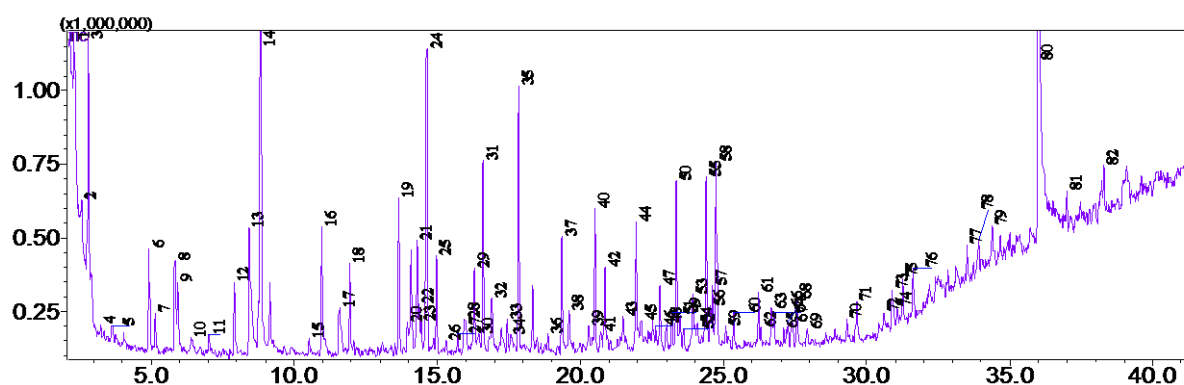
Dále byly srovnány slady různého stáří: Záhlinické slady ze tří období (podzim 2013, léto 2014, jaro 2015). V tabulce VIII. je uveden přehled o úbytku detekovaných a identifikovaných látek napříč těmito třemi obdobími. Je patrné, že k úbytku těkavých látek během stárnutí vzorků opravdu dochází, u ječného sladu ovšem v menší míře, oproti sladu pšeničnému.

Tabulka V. Počty detekovaných a identifikovaných látek u reálných vzorků sladů

Druh sladu	Počet detekovaných látek	Počet identifikovaných látek
Ječný slad - pivovar Primátor	51	44
Pšeničný slad - pivovar Primátor	57	41
Ječný slad - sladovna v Záhlinicích	63	44
Pšeničný slad - sladovna v Záhlinicích	82	48



Obrázek 4 A Chromatogram sladu ječného dodaného humnovou sladovnou v Záhlinicích



Obrázek 4 B Chromatogram sladu pšeničného dodaného humnovou sladovnou v Záhlinicích

Tabulka VI. Rozdíly v aromaprofilu ječného a pšeničného sladu ze sladovny v Záhlinicích

Číslo píku	Látky pouze ve sladu ječném	Číslo píku	Látky pouze ve sladu pšeničném
7	Thioethanol	1	Ethanol
14	n-Hexyl methanoát	5	Vinyl acetát
22	Dec-1-in	10	Acetoin
34	(E)-Dec-2-en-1-al	13	Butan-2,3-diol
41	Undec-2-en-1-ol	17	Heptan-2-on
49	Tridekan-1-al	23	6-Methylhept-5-en-2-on
56	Dodekan-1,12-diol	27	2-Ethylhexan-1-ol
57	1-Methylpropyl ester dodekanové kyseliny	34	n-Pentyl butanoát
59	6,10,14-Trimethylpentadekan-2-on	43	Dec-3-en-2-on
62	Ethyl ester n-hexadekanové kyseliny	45	n-Dekán-1-ol
63	9-Hexylheptadekan	46	Undekán-2-on
		47	Undec-10-en-1-al
		54	Oktán-1,8-diol
		65	n-Dodekán-1-ol
		78	Oktadekan

Tabulka VII. Rozdíly v aromaprofilu sladů ječných vyrobených různou technologií na dvou různých místech

Látky pouze ve sladů ječném (Záhlinice)	Látky pouze ve sladů ječném (Primátor)
Thioethanol	Ethanol
n-Hexyl methanoát	Furfural
Okt-1-en-3-ol	Heptan-2-on
Dec-1-in	4-Methyloktanová kyselina
Nonan-1-ol	(E,E)-Deka-2,4-dien-1-al
(E)-Dec-2-en-1-al	Dodekan-3-on
Undekan-1-al	Dec-2-en-1-ol acetát
Undeka-2,4-dien-1-al	(E)-6,10-Dimethylundeka-5,9-dien-2-on
Undec-2-en-1-ol	Tridekan-1-ol
Dodekan-1-al	Tetradekan-1-al
(E)-Dodec-2-en-1-al	Methyl-dihydroepijasmonát
Dodec-11-en-1-ol acetát	(E)-2-tetradecen-1-al
Dodekan-1,12-diol	Pentadekan-1-al
1-Methylpropyl ester dodekanové kyseliny	n-Tetradekanová kyselina
9-Hexylheptadekan	Pentadekan-1-ol

Tabulka VIII. Srovnání vzorků sladů různého stáří

Druh sladů	ječný slad			pšeničný slad		
	podzim 2013	léto 2014	jaro 2015	podzim 2013	léto 2014	jaro 2015
Období						
Detekovaných	31	34	63	29	60	82
Identifikovaných	24	20	44	22	39	48

Poslední součástí této práce bylo stejným způsobem zanalyzovat surové obilniny a porovnat je s těmi již sladovanými. Jak ječný tak i pšeničný slad jsou bohatší na těkavější složky aroma oproti původní surovině (dimethylsulfid, kyselina octová, pentan-1-al, ...).

Nesladované obilniny pak obsahují větší množství méně těkavých aromatických sloučenin, jako jsou 2-pentylfuran a kyselina fenyloctová. Obě tyto sloučeniny jsou označovány za původce nepříjemného aroma.

4. Závěr

Byly zjištěny optimální podmínky extrakce těkavých látek sladů pro sestavení celkového aromaprofilu metodou HS-SPME. Pro optimalizaci bylo zvoleno 10 aromatických látek vyskytujících se ve všech druzích sladů. Uspořádání této metody se zavedením kombinace 2 extrakčních teplot zajistilo dostatečnou odezvu pro větší množství těkavých látek ve vzorcích sladů. Takto bylo možné úspěšně detekovat jak látky těkavější, tak i méně těkavé. Kromě extrakční teploty ovlivňovaly HS-SPME i doba extrakce, teplota inkubace a úprava pH. Jejich významnost byla určena z Plackett-Burmanova návrhu uspořádání experimentu a optimální hodnoty byly následně vyhodnoceny na základě CCD plánu.

Za optimalizovaných podmínek byly změřeny všechny vzorky sladů i obilnin a následně byly sestaveny jejich aromaprofily.

HS-SPME s kombinací dvou sorpčních teplot se ukázala být jako velmi účinná metoda pro zakoncentrování velkého počtu těkavějších i méně těkavých látek u analyzovaných vzorků sladů a obilnin. Tato metoda spojená s GC-MS analýzou se projevila jako velmi vhodná pro separaci a identifikaci těkavých látek tvořících aromaprofil sladu s možností porovnání sladů ječných a pšeničných, sladů vyrobených různou technologií, sladů různého stáří a také obilovin.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Studentské grantové soutěže Univerzity Pardubice, projekt č. SGS_2016_001.

Literatura

1. Basařová G., Šavel J., Basař P.: *Pivovarství, teorie a praxe výroby piva*. VŠCHT, Praha, 2010.
2. Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J.: *J. Chromatogr. A* **880** (2000) 35-62.
3. Tankiewicz M., Morrison C., Biziuk M.: *Microchem. J.* **108** (2013) 117-123.