

## STANOVENÍ FURFURALU V PIVU KONTINUÁLNÍ PRŮTOKOVOU ANALÝZOU

PETR KOŠIN<sup>a,b</sup>, JAN ŠAVEL<sup>a</sup>,  
KAREL PAZOUREK<sup>c</sup> a ADAM BROŽ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Budějovický Budvar, n. p., Karolíny Světlé 4, České Budějovice, <sup>b</sup> Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, Praha 6, <sup>c</sup> Carbon Instruments, spol. s r.o., Nademlejnská 600, Praha 9  
petr.kosin@budvar.cz

Došlo 29.4.11, přijato 15.6.11.

Klíčová slova: stárnutí piva, furfural, průtoková analýza

### Úvod

Podstatnou část skutečných znaků kvality piva posuzuje spotřebitel svými smysly. Zejména chuť a vůně, ale i pěnovitost nebo barva piva, se v čase po stočení do transportních a spotřebitelských obalů postupně mění. Tyto změny se souhrnně nazývají senzoričké stárnutí, chuť piva poškozeného senzoričkým stárnutím se nazývá stará, stařinová, oxidační nebo pasterační podle toho, za jakých podmínek komponenty staré chuti vznikly. Za počátek stárnutí piva lze považovat filtraci, kdy se odstraněním kvasinek z piva odstraní i ochrana před kyslíkem<sup>1</sup>.

Prekurzory komponent staré chuti jsou běžné složky piva jako aminokyseliny, produkty tepelného rozkladu sacharidů a hořkých látek, produkty Maillardovy reakce, alkoholy nebo mastné kyseliny. Většinu téžavých komponent staré chuti tvoří karbonylové látky, které vznikají většinou oxidačními reakcemi a jejich chuť se přirovnává například k chuti po hrozinkách, medu, lepence, kartonu, nebo kůži<sup>2</sup>.

Typický konečný produkt rozkladu sacharidů jsou např. furfural (furan-2-karbaldehyd), nebo hydroxymethylfurfural (5-hydroxymethylfuran-2-karbaldehyd)<sup>1</sup>. Tyto látky se v pivu sice obvykle vyskytují pod prahem senzoričké detekce, avšak jsou analyticky dobře stanovitelné a mohou proto sloužit jako ukazatele tepelného rozkladu sacharidů<sup>3</sup>.

Oba analyty lze stanovit chromatograficky<sup>4–6</sup>, průtokovou injekční analýzou<sup>7</sup>, nebo spektrofotometricky. Furfural se stanovuje barevnou reakcí s anilinem v kyselém prostředí<sup>8</sup>, hydroxymethylfurfural přímou spektrometrií v UV oblasti, nebo po barevné reakci s kyselinou barbiturovou a *p*-toluinidinem<sup>9</sup>. Stanovení lze automatizovat průtokovým analyzátozem<sup>9,10</sup>, jehož optimalizace pro pivovarskou aplikaci je předmětem tohoto sdělení.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Kyselina sírová, kyselina octová, anilin, chlorid sodný, kyselina šťavelová, furfural (vše p. a. čistoty, Sigma Aldrich, Praha, ČR), 96% ethanol (Lihovar Chrudim, ČR), detergent FFD 6 (Skalar Analytical B.V., Breda, Nizozemsko), dusík (Linde gas, Praha, ČR).

#### Pomocné roztoky analyzátoru

Destilační činidlo: 56 ml kyseliny sírové (96%) se přidalo do 944 ml destilované vody.

Barevné činidlo: Do 25 ml anilinu se přidalo 250 ml kyseliny octové (99,8%), 50 ml vodného roztoku chloridu sodného (20%) a 25 ml vodného roztoku kyseliny šťavelové (5%). Činidlo bylo uchováváno v tmavé láhvi a připravovalo se denně čerstvě.

Smáčecí činidlo: 4 ml FFD 6 (obchodní název detergentu doporučeného výrobcem analyzátoru) se přidalo do 1000 ml destilované vody.

Promývací kapalina: 50 ml ethanolu se v 1000ml odměrné baňce doplnilo po rysku destilovanou vodou.

#### Standardní roztoky furfuralu

Zásobní roztok furfuralu (50 mg l<sup>-1</sup>): 50 mg furfuralu (čerstvě destilovaný minidestilačním přístrojem) se v 1000ml odměrné baňce přidalo do 500 ml ethanolu a baňka se doplnila po rysku destilovanou vodou. Roztok byl stabilní 6 měsíců.

Pracovní roztok furfuralu (5 mg l<sup>-1</sup>): 10 ml zásobního roztoku furfuralu se ve 100ml odměrné baňce doplnilo po rysku promývací kapalinou. Roztok byl stabilní týden.

Kalibrační roztoky furfuralu (50, 100, 200, 300 a 500 µg l<sup>-1</sup>): 1, 2, 4, 6 nebo 10 ml pracovního roztoku furfuralu se ve 100ml odměrné baňce doplnilo po rysku promývací kapalinou. Roztoky byly stabilní týden.

#### Automatický analyzátor

Kontinuální průtokový analyzátor San Plus System (Skalar Analytical B.V., Breda, Nizozemsko) vybavený dávkovačem vzorků, peristaltickým čerpadlem, analytickým modulem s průtokovou destilační jednotkou, digitálním fotometrickým detektorem s interferenčním filtrem 520 nm a osobním počítačem s programem FlowAccess pro zpracování dat a řízení analyzátoru. Součástí analyzátoru jsou shodné s vybavením automatického průtokového analyzátoru pro stanovení diacetylu v pivu, který bývá obvyklým vybavením moderní pivovarské laboratoře<sup>11</sup>.

Při analýze se proud kapaliny procházející destilační jednotkou (96 °C) rozmýval proudem dusíku, který nahrazoval vodní páru užívanou při manuálním stanovení furfuralu. Analytický modul pro barevnou reakci byl kvůli citlivosti barevného činidla na světlo sestavený se součástí zakrytých tmavou fólií.

## Pracovní postup

Oxid uhličitý se ze vzorků piva odstraní 10minutovým třepáním. Vzorky mladín a nealkoholických piv se pro standardizaci výtěžku destilace doplnily ethanolom na výslednou koncentraci 5 obj.%. Takto připravené vzorky byly převedeny do nádobek dávkovače analyzátoru.

Při měření se tok vzorku střídá s promývací kapalinou v taktu 60 s vzorek, 100 s promývací kapalinou. Do toku promývací kapaliny nebo vzorku ( $2,5 \text{ ml min}^{-1}$ ) se přimíchá plynný dusík ( $500 \text{ ml min}^{-1}$ ) a destilační činidlo ( $0,23 \text{ ml min}^{-1}$ ) a směs se vedla do průtokového destilátoru o teplotě  $96 \text{ }^\circ\text{C}$ . Do destilátu se přimíchá barevné činidlo ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) a smáčecí činidlo ( $0,1 \text{ ml min}^{-1}$ ) a po reakci se měřila absorbance při  $520 \text{ nm}$  (obr. 1).

## Výsledky a diskuse

## Kalibrace metody

Odezva analyzátoru na obsah furfuralu v 5% ethanolu byla lineární s koeficientem regrese  $R^2 = 0,9968$  přibližně do  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ , při dalším zvyšování koncentrace se odezva snižovala (obr. 2).

## Stabilita kalibračních roztoků furfuralu

Kalibrační roztoky furfuralu v 5% ethanolu byly stabilní přibližně týden, po delší době začala koncentrace furfuralu klesat (obr. 3).

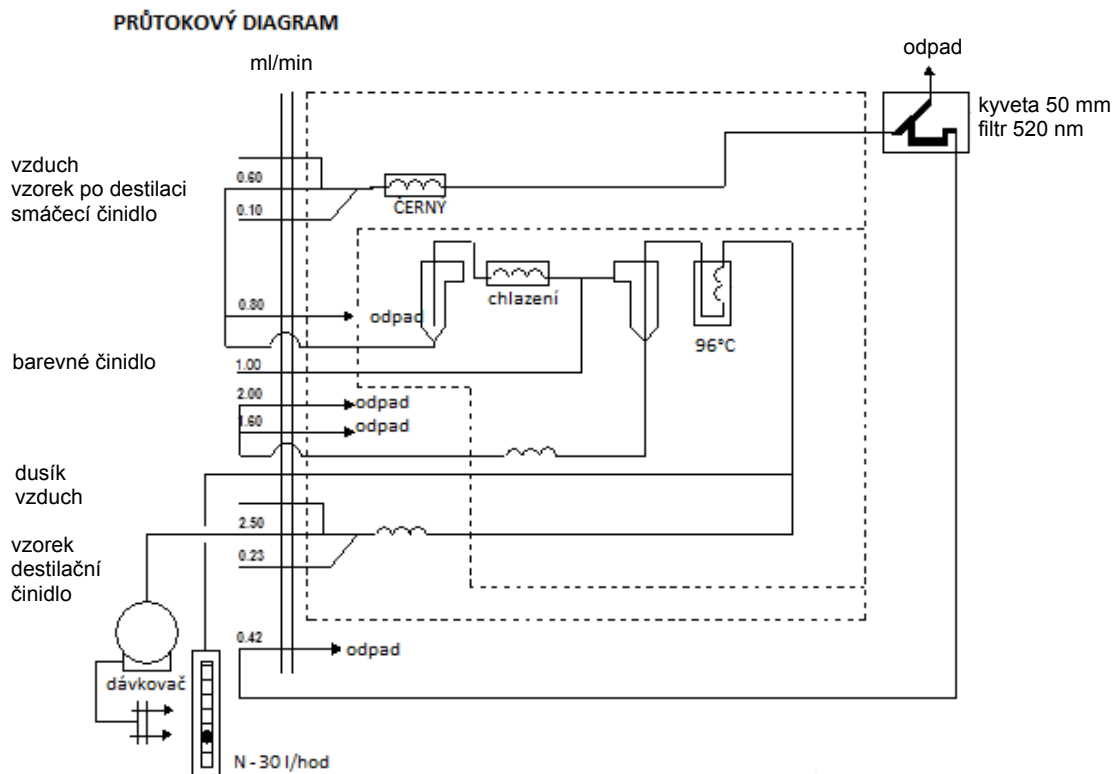
## Interference významných karbonylových látek piva

Z významných karbonylových sloučenin obsažených v pivu se benzaldehyd ani diacetyl nebarvily barevným činidlem. Přebytek acetaldehydu (bod varu  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a *trans*-2-nonenal (bod varu  $205 \text{ }^\circ\text{C}$ ) poskytoval s barevným činidlem barevný produkt a proto se ověřila odezva

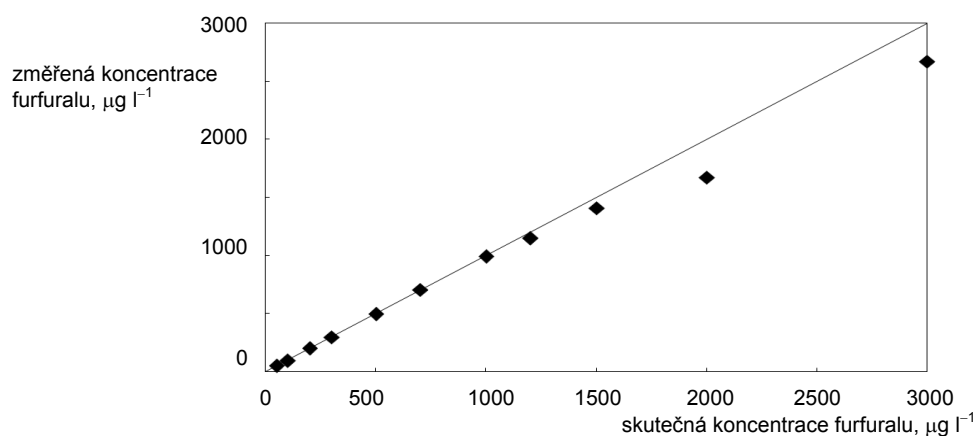
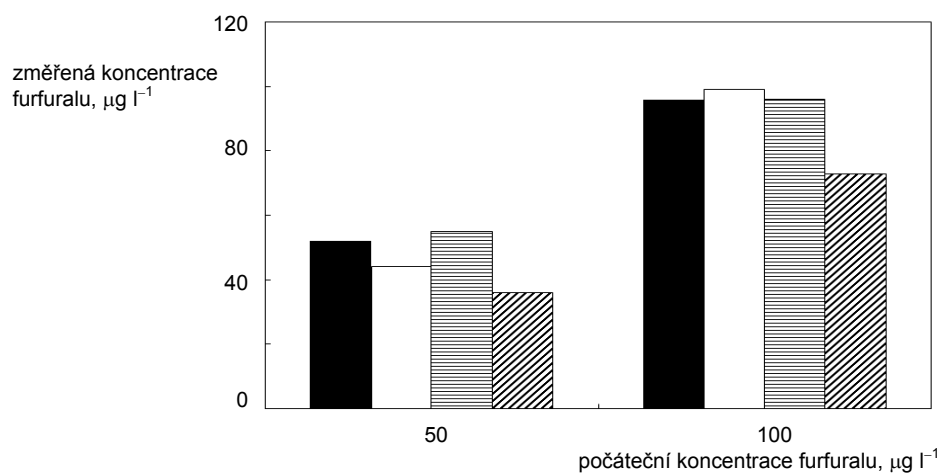
Tabulka I

Ověření interference karbonylových sloučenin, které v přebytku reagují s barevným činidlem

Karbonylová sloučenina	Odezva analyzátoru [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]
Acetaldehyd $10 \text{ mg l}^{-1}$	0
Acetaldehyd $20 \text{ mg l}^{-1}$	-3
Trans-2-nonenal $0,5 \text{ ng l}^{-1}$	-1
Trans-2-nonenal $1,0 \text{ ng l}^{-1}$	0



Obr. 1. Schéma analytického modulu pro stanovení furfuralu

Obr. 2. Ověření linearity kalibrace;  $\blacklozenge$  koncentrace furfuralu ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), — osa kvadrantůObr. 3. Stabilita kalibračních roztoků;  $\blacksquare$  čerstvý,  $\square$  2 dny starý,  $\equiv$  7 dní starý,  $\text{▨}$  10 dní starý

metody na přidavek těchto karbonylů do 5% ethanolu v koncentracích běžně se vyskytujících ve starém pivo. Analyzátor nereagoval ani na acetaldehyd ani *trans*-2-nonenal významně zvýšeným signálem (tab. I).

#### Správnost metody

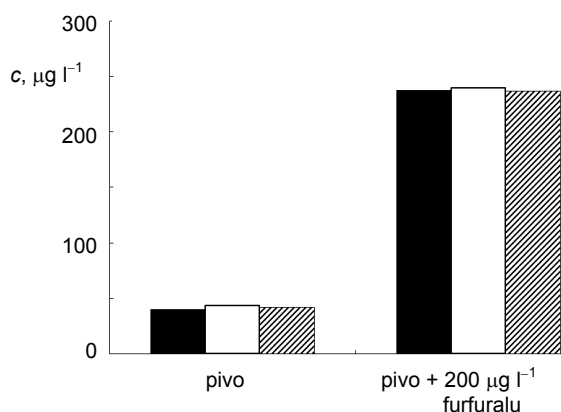
Správnost se ověřovala metodou vnitřního přidavku furfuralu ke vzorkům piva starým tři měsíce. U třech vzorků piva se přidavek standardního roztoku furfuralu na konečnou koncentraci  $200 \mu\text{g l}^{-1}$  se projevil průměrným zvýšením odezvy o  $196 \mu\text{g l}^{-1}$  (obr. 4).

#### Statistické parametry metody

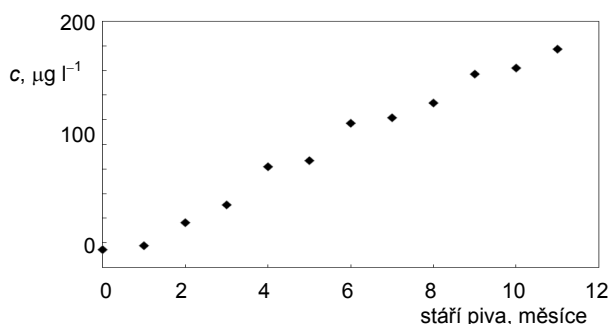
Výběrová směrodatná odchylka stanovená na souboru pěti standardních roztoků furfuralu o koncentraci  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  měřených v různé měřicí dny byla  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ .

#### Obsah furfuralu v pivo v průběhu skladování

Vzorkování pro měření závislosti obsahu furfuralu na stáří piva odpovídalo horizontální studii, při které se v jednom čase analyzují vzorky různého stáří. Oproti vertikální studii (jedna šarže piva měřená v postupujícím čase) má horizontální nevýhodu v porovnávání různých šarží piva, kterou však lze eliminovat statistickými



Obr. 4. Ověření správnosti metody vnitřním přídatkem furfuralu k pivo



Obr. 5. Nárůst obsahu furfuralu ve skladovaném pivo

metodami. Výhodou je naopak okamžitá dostupnost výsledků a vyšší pravděpodobnost eliminace nestandardnosti jedné šarže.

Studované pivo byl světlý ležák českého typu vyráběný tradiční technologií pouze z vody, světlého sladu a hlávkového Žateckého poloraného červeňáku stočený do půllitrových láhví opatřených korunkovým uzávěrem. Láhve byly skladované bez pohybu při 20 °C a za tmy. Obsah furfuralu se vyjádřil jako průměr ze tří různých šarží od každého stáří piva. Furfural v pivo v čase po stočení lineárně rostl (obr. 5).

## Závěr

Metoda stanovení furfuralu automatickým průtokovým analyzátozem je dostatečně přesná, správná a selektivní pro analýzu piva a meziproduktů jeho výroby. Oproti chromatografickým či ručním metodám má výhodu vysoké rychlosti stanovení, kdy lze za hodinu analyzovat přibližně 30 neznámých vzorků. Výhodou metody je, že přístrojové vybavení automatického průtokového analyzátozem je totožné s vybavením pro stanovení diacetylů, které bývá obvyklou součástí moderní pivovarské laboratoře.

## LITERATURA

1. Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T.: *Pivovarství - teorie a praxe výroby piva*. VŠCHT, Praha 2010.
2. Vanderhaegen B., Neven H., Verachtert H., Derdenlinckx G.: *Food Chem.* 95, 357 (2006).
3. Šavel J., Zdvihalová D., Prokopová M.: *Kvasny Prum.* 43, 233 (1997).
4. Hawthorne D. B., Kavanagh T. E., Clarke B. J.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 45, 23 (1987).
5. Li M., Yang Z., Yang M., Shan L., Dong J.: *J. Inst. Brew.* 115, 226 (2009).
6. Madigan D.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56, 146 (1998).
7. Iglesia F., Lázaro F., Puchades R., Maquieira A.: *Food Chem.* 60, 245 (1997).
8. Šavel J., Zdvihalová D.: *Kvasny Prum.* 24, 30 (1978).
9. Šavel J., Pazourek K.: *Kvasny Prum.* 47, 314 (2001).
10. Lopez-Nieves M., Wentzell P. D., Crouch S. R.: *Anal. Chim. Acta* 258, 253 (1992).
11. Buijten J. C., Holm B.: *J. Autom. Chem.* 1, 91 (1979).

**P. Košin<sup>a,b</sup>, J. Šavel<sup>a</sup>, K. Pazourek<sup>c</sup>, and A. Brož<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup>*Budějovický Budvar Co., České Budějovice,* <sup>b</sup>*Institute of Chemical Technology, Prague,* <sup>c</sup>*Carbon Instruments Ltd., Prague): Determination of Fural in Beer by Continuous Flow Analysis*

The title method was optimized for the determination of fural in beer and intermediates in beer production. This method is robust and selective enough to serve for evaluation of the degree of beer ageing. Contrary to chromatographic or classic methods the above method has an advantage of high throughput; ca. 30 samples can be measured in an hour. Another advantage is that the hardware needed for fural determination is the same as that for biacetyl analysis, common equipment of modern brewery laboratories.