

УДК 615.074:543.426

Бельтюкова С.В.¹, д.х.н., проф.; Чередниченко Е.В.¹, асп.; Теслюк О.И.², к.х.н., доц.;
Ливенцова Е.О.¹, к.х.н., доц.

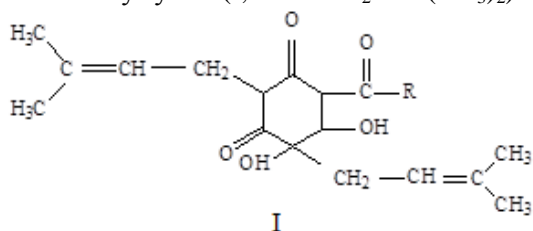
ТВЕРДОФАЗНОЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОРЬКИХ ВЕЩЕСТВ В ПИВЕ

¹Одесская национальная академия пищевых технологий, ул. Канатная, 112, Одесса, Украина, 65039; e-mail: cherednychenko.liza@gmail.com

²Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дорога, 86, Одесса, Украина, 65080

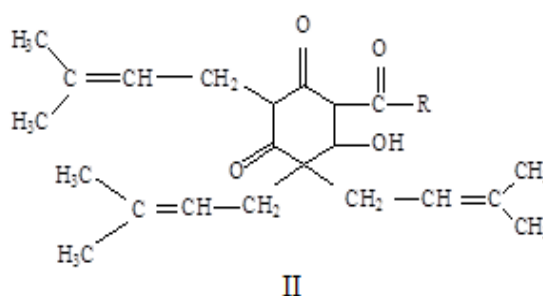
Одними из важных компонентов химического состава хмеля, существенно влияющих на технологический процесс приготовления пива и его качество, являются полифенольные соединения. Полифенолы солода и хмеля в значительной мере определяют вкус, цвет, пенные свойства пива, а также склонность готового напитка к помутнению.

Важнейшими для пивоварения группами веществ хмеля являются хмелевые смолы, полифенольные вещества и эфирные масла. С технологической точки зрения основным свойством всех многообразных хмелевых смол является горечь [1]. Согласно литературным данным [2-7] горькие вещества хмеля обусловлены наличием α - и β -горьких кислот и α - и β -горьких смол. α -Горькие кислоты представляют собой смесь производных, главной составной частью которых является гумулон (I, R = -CH₂-CH(CH₃)₂):

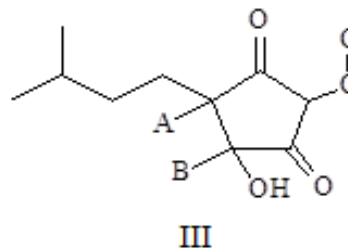


Остальные аналоги (когумулон, адгумулон, постгумулон) имеют в боковой цепи различные заместители (R) [1, 5].

β -Горькие кислоты (II) – смесь производных, главной составной частью которых является лупулон (R = -CH₂-CH(CH₃)₂). Остальные аналоги (колупулон, адлупулон, постлупулон) имеют в боковой цепи различные заместители (R) [1, 5]:



α - и β -Мягкие смолы (III) отличаются различными заместителями в положении 4 и 5 (A и B) в циклопентантрионовом ядре и имеют общее название резупоны [1, 5]:



Во время кипячения сула с хмелем происходят сложные физико-химические и химические превращения основных компонентов хмеля. При этом изменения горьких кислот очень сложны. α -Горькие кислоты сначала изомеризуются и переходят в раствор в виде соответствующих изо соединений, но при кипячении хмеля соотношение их горечи изменяется. Происходит разложение β -кислот до гулулонов, далее до лупутрионов и гулулоновой кислоты. В сусле около 1/3 горьких кислот превращается в соединения, обладающие горечью.

Общее содержание горьких веществ в пиве колеблется от 50 до 100 мг/л, а изогумулонов – от 10 до 35 мг/л. Сильно

охмеленное пиво содержит изогумулонов до 50 мг/л [8]. Изогумулон – основной компонент горьких веществ охмеленного сула, образующийся при изомеризации гумулона (α -горькой кислоты) хмеля при кипячении сула [7, 8].

Определение горечи в пиве является важным, так как этот показатель существенно влияет на органолептические показатели пива. Определение содержания горьких веществ в единицах горечи (BU – Bitter units) проводят спектрофотометрическим методом [7].

Определение горьких веществ по методу Клоппера предусматривает определение изогумулона и результат выражают в мг изогумулона в 1 литре пива [3]. Согласно решению Европейской Пивоваренной Конвенции (ЕВС) и Американской ассоциации химиков-пивоваров (ASBC) принцип метода был оставлен без изменений, были внесены изменения в формулу расчета, и содержание горьких веществ оценивается в единицах горечи (BU). По методике ЕВС (9.8.) [7] при определении горьких веществ в пиве в основном определяют изо- α -кислоту (изогумулон). Способ применим ко всем типам фильтрованного пива. Метод основан на экстракции изогумулона изооктаном и определении оптической плотности экстракта при длине волны 275 нм. Горечь вычисляют по формуле: $BU = 50 \times A_{275}$ (где A_{275} – оптическая плотность экстракта при $\lambda = 275$ нм относительно чистого изооктана).

Предложен [9] также метод определения горечи пива по сенсibilизированной люминесценции иона Eu(III), возникающей при взаимодействии иона лантанида с различными горькими веществами, находящимися в пиве. Метод требует специального спектроскопического оборудования, так как методика предусматривает регистрацию люминесценции Eu(III) с задержкой во времени 0,1 мс, со временем срабатывания 2,0 мс и полным временем распада 0,1 с.

В настоящей работе представлены результаты исследования по разработке методики твердофазного люминесцентного определения горьких веществ (ГВ) в пиве с использованием сенсibilизированной люминесценции иона Eu(III).

Материалы и методы исследования

Хлориды Eu(III) и Tb(III) готовили растворением их высококачественных оксидов (99.998%) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением ее избытка упариванием. Концентрацию устанавливали комплексонометрическим титрованием. Точные навески растворяли в бидистиллированной воде. Раствор 1,10-фенантролина готовили растворением точной навески (до четвертого знака после запятой) вещества в бидистиллированной воде с подкислением соляной кислотой до pH 5. Растворы других донорно-активных веществ (2,2'-дипиридила, трифенилфосфиноксида (ТФФО), триоктилфосфиноксида (ТОФО), β -циклодекстрина) готовили растворением их точных навесок в этаноле. В качестве стандарта использовали α -горькие кислоты, полученные из хмеля согласно известной методики [7].

α -Горькие кислоты экстрагировали из размолотого хмеля (3.75 г) смесью растворителей гексана и этилового спирта в соотношении 9:1 (22.5 мл гексана и 2.5 мл этанола) в течение 5 мин. Полученный экстракт фильтровали через складчатый бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 50 см³, остаток на фильтре несколько раз промывали той же смесью растворителей и доводили содержимое колбы до метки смесью растворителей.

Для получения раствора α -горьких кислот с точно известной концентрацией отбирали 20 см³ гексано-этанольного экстракта, удаляли растворители при комнатной температуре, осадок высушивали вакуумной сушкой до постоянной массы, взвешивали осадок, растворяли в гексано-этанольной смеси (9:1) и количественно переносили выделенные альфа-горькие кислоты в мерную колбу на 25 см³.

Спектры люминесценции ионов Eu(III) и Tb(III) регистрировали в области 560-650 и 450-570 нм с помощью спектрометра Cary Eclipse Varian (Австралия) с двойным источником света (ксеноновая лампа 150-W сплошного спектра и импульсная лампа). Значения энергии триплетных уровней горьких веществ определяли регистрацией спектров фосфоресценции их комплексов с иттрием при 77 К. Для изучения кинетики затухания люминесценции применяли осцил-

логографическую регистрацию. Люминесценцию возбуждали при этом импульсным азотным лазером с длиной волны излучения 337 нм. Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC Shimadzu (Япония). Значения pH растворов измеряли с помощью pH-метра ОР-211/1 Radelkis (Венгрия) со стеклянным электродом. Необходимые значения pH создавали в растворе с помощью уротропина.

Результаты исследования

Образующиеся при кипячении сула изосоединения горьких веществ содержат дикарбонильный фрагмент и подобно β -дикетонам, очевидно, проявляют в растворах кето-енольную таутомерию и могут образовывать с ионами двух- и трехзарядных катионов прочные комплексные соединения. Эта группа лигандов вызывает определенный интерес благодаря наличию в их структуре подвижной π -электронной системы, сопряженной с хелатным циклом, что может благоприятствовать появлению сенсibilизированной люминесценции лантанидов.

Возможность координации иона Eu^{+3} с β -дикарбонильной группировкой циклопентантрионового ядра показана ранее [9].

Горькие вещества имеют в ультрафиолетовой области спектра полосы поглощения с максимумами 244,2 нм и 270 нм, что обуславливает эффективное поглощение световой энергии лигандами.

Энергия триплетного уровня лигандов (20500 см^{-1}), найденная из спектра фосфоресценции, равна или выше энергии возбужденных уровней ионов Eu(III) (17300 см^{-1}) и Tb(III) (20500 см^{-1}), что делает возможным эффективное поглощение и последующий перенос энергии возбуждения от лигандов на резонансные уровни этих ионов. В присутствии ГВ указанные ионы проявляют интенсивную люминесценцию.

Наиболее интенсивная люминесценция наблюдается для иона Tb(III) . Резонансный уровень иона Tb(III) расположен ближе к триплетному уровню лигандов, поэтому в процессе передачи энергии возбуждения от лигандов к иону лантанида снижается степень безизлучательных потерь. В случае Eu(III) интенсивность люминесценции значительно слабее. Вероятно, в этом случае

происходит передача энергии возбуждения на энергетический уровень Eu(III) $^5\text{D}_1$ (19000 см^{-1}) с последующей безизлучательной дезактивацией до первого возбужденного состояния $^5\text{D}_0$ (17300 см^{-1}), что приводит к значительным потерям энергии возбуждения.

Для определения горьких веществ в пиве в качестве люминесцентного маркера нами выбран ион Eu(III) . Этот выбор обусловлен тем, что в пиве помимо горьких веществ содержатся кислоты бензойного и оксикоричного ряда, катехины и другие полифенольные соединения [10], которые образуют люминесцирующие соединения с ионами Tb(III) , что будет искажать результаты по содержанию горьких веществ. Ион Eu(III) благодаря более низкому энергетическому уровню в комплексах с этими соединениями практически не люминесцирует.

Спектр возбуждения иона Eu(III) в водно-этанольном растворе комплексов с горькими веществами для различных сортов пива (светлого «Перша приватна browарня» (а) и темного «Starogramen» (б)) различен (рис. 1).

Различие в спектрах возбуждения светлого (а) и темного (б) пива может быть свидетельством того, что состав горьких веществ для этих образцов различен.

Интенсивность люминесценции комплексов возрастает на сорбентах. В связи с этим была изучена $I_{\text{люм.}}$ комплексов на сорбентах различной природы: фосфате алюминия, силикагелях, ксерогеле, пенополиуретане, цеолитах, сефадексах. Наибольшее увеличение $I_{\text{люм.}}$ обнаружено на силикагеле Merk в 2,5 раза для образца светлого пива и в 4,1 раза для образца темного. Люминесценция не обнаруживается на фосфате алюминия, пенополиуретане, цеолитах. Сорбция комплексов Eu(III) на силикагеле проходит в области pH 4,0 до 9,0, наибольшая $I_{\text{люм.}}$ наблюдается при pH 5,8-6,1. Для создания оптимального значения pH применяли раствор уротропина 40 %-ного.

$I_{\text{люм.}}$ сорбатов увеличивается с увеличением концентрации иона металла в растворе, из которого ведется сорбция. Для дальнейших исследований нами выбрана концентрация европия (III) – 0,08 моль/л, при которой наблюдается максимальная $I_{\text{люм.}}$. Исследование кинетики сорбции горьких

веществ из растворов показало, что максимальная $I_{\text{люм. сорбата}}$ достигается за 15 мин. встряхивания (рис. 2). При более длительном встряхивании $I_{\text{люм. сорбата}}$ комплекса на сорбенте остается практически неизменной.

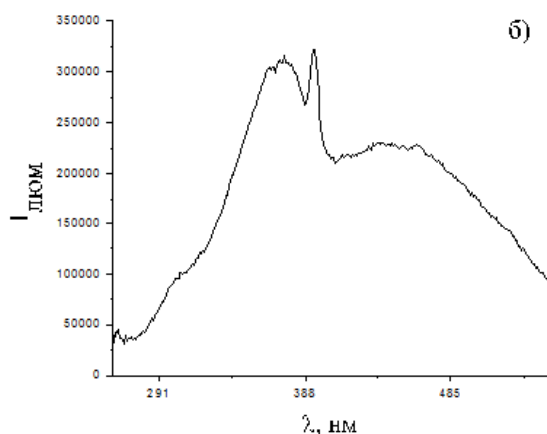
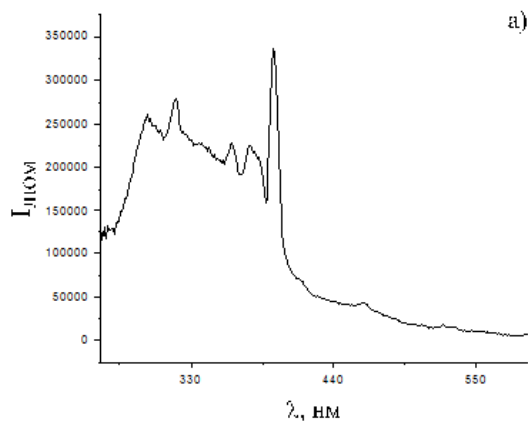


Рис. 1. Спектры возбуждения иона Eu(III) в комплексах с горькими веществами в образце светлого (а) и темного (б) пива.

На интенсивность люминесценции сорбатов значительно влияют количество сорбента, температура и время высушивания сорбента. Масса сорбента, необходимая для полной сорбции горьких веществ составляет 70 мг. Для достижения оптимальной $I_{\text{люм. сорбата}}$ комплексов достаточно высушивания в течении 20 мин. при температуре 90°C (рис. 3).

Интенсивность люминесценции сорбатов комплексов не изменяется в течении нескольких месяцев и остается постоянной в течении 20 минут облучения УФ-светом, что свидетельствует об их фотостабильности. Найдено, что $I_{\text{люм. сорбата}}$

сорбатов комплексов максимальна при сорбции из водных растворов.

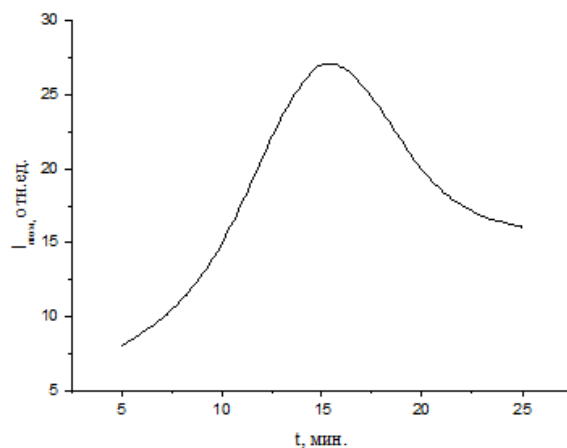


Рис. 2. Зависимость $I_{\text{люм. сорбата}}$ от времени сорбции.

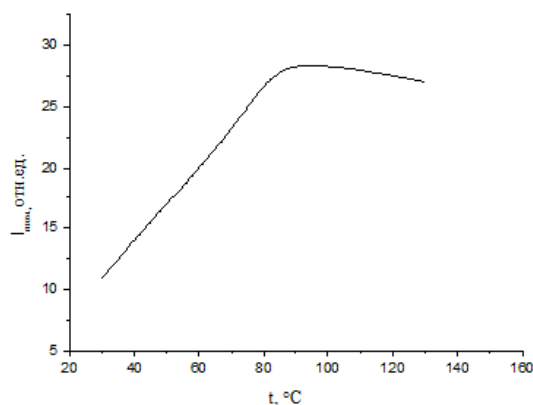


Рис. 3. Зависимость $I_{\text{люм. сорбата}}$ от температуры высушивания.

Поверхностно-активные вещества практически во всех случаях уменьшают интенсивность люминесценции сорбатов, что может быть связано с сольбилизацией комплексов в растворе и уменьшением за счет этого степени их сорбции. Увеличение $I_{\text{люм. сорбата}}$ в 1,3 и 1,6 раза наблюдается в присутствии триоктилфосфиноксида и трифенилфосфиноксида, что может быть обусловлено образованием разнолигандного комплекса на поверхности сорбента и вытеснением молекул воды из внутренней сферы комплекса. Это способствует снижению безизлучательных потерь энергии возбуждения за счет колебаний ОН-связей молекул воды, что и обуславливает более высокую интенсивность люминесценции.

На основании полученных результатов разработана методика сорбционно-люминесцентного определения горьких веществ в пиве.

Перед анализом образец пива разбавляли в 5 раз водой. В четыре пробирки помещали по 0,5 мл разбавленного пива, в три из них добавляли стандартный раствор α -горьких кислот в таком количестве, чтобы $I_{\text{люм.}}$ пробы выросла в 2 и 3-4 раза соответственно. Затем во все пробирки добавляли по 0,1 мл хлорида европия 0,08 моль/л, 0,1 мл раствора уротропина 40%-го, дистиллированную воду до 5 мл и 70 мг силикагеля. Сорбцию проводили при встряхивании в течении 15 мин, сорбат отфильтровывали, высушивали при температуре 90°C в течение 20 мин. Интенсивность люминесценции Eu(III) измеряли при $\lambda = 612$ нм.

Количественное определение горьких веществ в пиве проводили методом добавок, используя в качестве стандарта раствор α -горьких кислот с точно известным содержанием. На основании разработанной методики определено содержание горьких веществ в образцах пива различных производителей (табл. 1).

Точность и достоверность определения горьких веществ в пиве проверена методом статистической обработки результатов определения. При $n=5$, $P=0,95$ величина

относительного стандартного отклонения S_r составляет 6-7%.

Предложенная методика может быть использована для экспрессной тестовой оценки содержания горьких веществ в пиве, солоде и в ходе технологического процесса производства пива. В этом случае интенсивность люминесценции сорбатов сравнивают с эталонными образцами, приготовленными предварительно. Интенсивность люминесценции таких образцов сохраняется в течении 3-4 месяцев.

Выводы

Разработана методика люминесцентного определения горьких веществ в пиве, основанная на использовании твердофазной сенсibilизованной люминесценции иона Eu(III) в комплексе с горькими веществами. С помощью разработанной методики определено содержание горьких веществ в нескольких образцах пива.

Сочетание концентрирования на сорбенте со спектроскопическим детектированием $I_{\text{люм.}}$ иона Eu(III) непосредственно в фазе сорбента открывает возможность тест-контроля горьких веществ во время технологического процесса производства пива.

Таблица 1. Результаты определения горьких веществ в пиве ($n=5$, $P=0,95$)

№ образца	Пиво (вид, производитель)	Найдено горьких веществ, мг/мл	S_r , %
1	Темное («Перша приватна броварня»)	0,442 ± 0,027	0,06
2	Темное («Staropramen»)	0,560 ± 0,032	0,06
3	Светлое («Перша приватна броварня»)	0,451 ± 0,031	0,07

Список использованных источников

1. Хорунжина С.И. Биохимические и физико-химические основы технологии солода и пива. М.: Колос, 1999. С 312.
2. Годованный А.А., Лещенко Н.И., Райтман И.Г., Ежов И.С. Хмель и его использование. К.: Урожай, 1990. С. 335.
3. Кунце В. Технология солода и пива. СПб.: Профессия, 2001. С. 912.

4. Шмидт Л. Г. Горькие вещества хмеля и методы их анализа. Центр. ин-т науч.-техн. информации пищевой пром-сти Гос. ком. по пищевой пром-сти. при Госплане СССР. М.: [б.и.], 1964. С. 64.
5. Ляшенко Н.И. Биохимия хмеля и хмеле-продуктов. Житомир: Полісся, 2002. С. 388.
6. Латыпова Г.М., Аюпова Г.В., Бубенчикова В.Н., Галимова Д.Ф., Батырова Е.Д., Шафикова С.Ф. Исследования по содержанию горьких кислот сырья хмеля обыкновенного. *Научные*

ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2012, 10-2(129), 65–69.

7. Ермолаева Г.А. Справочник работника лаборатории пивоваренного предприятия. СПб.: Профессия, 2004. С. 536.

8. Главачек Ф., Лхотский А. Пивоварение. М.: Пищевая промышленность, 1977. С. 622.

9. Christensen, J., Ladefoged, A. M., Nørgaard, L. Rapid Determination of Bitterness in Beer Using

Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics. *Jnl. Inst. Brew.* 2005, 111(1), 3–10.

10. Ullucci P.A., Acworth I.N., Thomas D.H. Determination of Isoxanthohumol, Xanthohumol, Alpha and Beta Bitter Acids, and trans and cis-iso-alpha acids by HPLC with UV and Electrochemical Detection: Application to Hop and Beer Analysis. *Planta Med.* 2012, 78(05), 147.

Статья поступила в редакцию: 04.05.2016.

SOLID-PHASE LUMINESCENT DETERMINATION OF BITTER SUBSTANCES IN BEER

Beltyukova S.V., Cherednychenko Ie.V., Teslyuk O.I., Liventsova E.O.

The possibility of determination of bitter substances in beer on a solid-phase sensitized luminescence of ions of Eu(III) is studied. The considered ligands contain a dicarbonyl fragment and, obviously, like β -diketones can form complexes with ions of two - and three-charging cations. Spectroscopic characteristics of bitter substances are studied. It is shown that energy of triplet level of bitter substances is equal or above energy of the excited levels of ions Eu(III) and Tb(III) that makes excitement transmission of energy to these ions possible. The ion of Eu(III) is chosen as a luminescent marker. It is established that intensity of a luminescence of complexes increases on sorbents. The greatest increase of luminescence intensity is obtained on Merk silica gel. Dependence of luminescence intensity of sorbates complexes on concentration of an ion of Eu (III), acidity of the environment, time of sorption, quantity of a sorbent, temperature and time of sorbent drying is investigated. The possibility of an express test assessment of content of bitter substances in beer is shown.