

R-205.20.134 [2016-03]

Vergärbare Kohlenhydrate mittels HPLC (EBC-Methode)

Prinzip

Fructose, Glucose und Zucker mit zwei- und dreifachem Polymerisationsgrad (Maltose und Maltotriose) werden durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt.

Würze oder Bier werden über Ionenaustauscher entionisiert, die Probe wird filtriert, auf einer Festphasen-Säule konzentriert und die so behandelte Probe chromatographiert. Die Konzentration der Zucker wird anhand der Chromatogramme von Kalibrierlösungen errechnet.

Geräte

Säulenofen

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph, mit Refraktometer als Detektor
Gepackte Säule, Aminex HPX-87, $\frac{3}{8}$ inch \times 300 mm, Bio-Rad Laboratories,
Cat.No. 125-0095

PC-Workstation

Schüttelmaschine

Filter, Swinnex, Millipore Cat.No. S 0000 1300 Spritze, 10 μ L

Spritze, 2 mL

Filterpackung, 0,45 μ m, Millipore Cat.No. HAWGO 1300

Sep-Pak-Patrone, Waters Associates, Part No. 51910

Reagenzien

Mischbett-Ionenaustauscherharze, AG 501-X8

Glucose, Reinheitsgrad 99,9 %

Maltose, Reinheitsgrad 99,9 %, bezogen auf Trockensubstanz

Fructose, Reinheitsgrad 99,9 %

Destilliertes oder entionisiertes H₂O, filtriert über 0,45- μ m-Membranfilterpackung

Kalibrierlösung: ca. 1 g Glucose, 0,1 g Fructose und 3 g wasserfreie Maltose auf 0,1 mg genau in 50-mL-Messkolben einwiegen, in H₂O lösen und mit H₂O zur Marke auffüllen. Die tatsächlich eingewogene Menge Maltose aus dem Wassergehalt und dem Reinheitsgrad der verwendeten Charge berechnen.

Die exakten Zuckerkonzentrationen bei den Berechnungen zugrunde legen.

Ausführung

Probenvorbereitung

- Aliquot der Kongresswürze (siehe R-206.00.002 [2016-03]) zur Inaktivierung der Enzyme rasch zum Kochen bringen und 5 min kochen
- abkühlen und verdampftes Wasser mit H₂O auf ursprüngliches Gewicht ergänzen
- Trüb über Faltenfilter abtrennen
- zu 10,0 mL Würze 200 ± 5 mg Mischbettionenaustauscherharze zusetzen
- Sep-Pak-Patrone durch Hindurchdrücken von 2 mL H₂O mit einer Spritze vorbereiten
- zunächst die Spritze mit dem die 0,45-µm-Filterpackung enthaltenden Swinnex-Filtervorsatz und dann mit Sep-Pak-Patrone versehen
- die Würze mit den Ionenaustauscherharzen durch diese Anordnung filtrieren
- die ersten mL verwerfen
- Rest für die Analyse aufbewahren

Analysenprobe

10 µL der gemäß Abschnitt „Probenvorbereitung“ behandelten Proben einsetzen

Analysenbedingungen

- Säulentemperatur 85 °C
- Verbindungs- und Verschraubungsteile isolieren, um eine konstante Temperatur am Säuleneingang und Säulenausgang zu gewährleisten
- Verbindung zum Refraktometer möglichst kurz wählen
- das als Säulen-Eluent verwendete H₂O durch Erhitzen bis nahe zur Siedetemperatur entgasen und bei einer Temperatur von mehr als 85 °C im Vorratsbehälter lassen
- Refraktometer-Temperatur = Raumtemperatur (Anm.: Für die Qualität der Messung ist eine konstante Temperatur besonders wichtig)
- Durchfluss-Rate: 0,2 mL/min
- Empfindlichkeit des Refraktometers entsprechend einstellen

Infolge der unvollständigen Trennung der Trisaccharide von höhermolekularen Polysacchariden ist auf einheitliche Integrationsparameter in den einzelnen Laboratorien besonders zu achten. Zum Auftrennen nicht getrennter Peaks

wird die „Drop-Line“-Methode empfohlen, obwohl sie etwas zu hohe Werte für Trisaccharide ergeben kann

Kalibrierung

- 10 µL Kalibrierlösung einspritzen
- Kalibrierlösung dreimal analysieren, nämlich am Anfang, in der Mitte und am Ende einer Probenserie

Ungefähre Retentionszeiten:

Maltotriose	24 min	Glucose	32 min
Maltose	26 min	Fructose	40 min

Messung

- Analysenprobe einspritzen
- Chromatographie wie im Unterabschnitt „Analysenbedingungen“ beschreiben durchführen
- jede Analysenprobe einmal chromatographieren

Berechnung

Peakflächen von Fructose, Glucose und Maltose aus den drei Kalibrierchromatogrammen bestimmen. Durchschnittswert für jeden Zucker errechnen. Kalibrierfaktor für jeden einzelnen Zucker berechnen.

$$r_s [\text{g}/100 \text{ mL}] = \frac{A_P}{C_S}$$

A_p = Peakfläche des Zuckers

C_s = Zuckerkonzentration in der Kalibrierlösung in g/100 mL

Kalibrierfaktor für Maltotriose gemäß $1,03 \times r_M$ errechnen

1,03 = Umrechnungsfaktor von Maltose auf Maltotriose (Maltotriose ist hygroskopisch)

r_M = Kalibrierfaktor für Maltose

Die Konzentration der einzelnen Zucker in der Probe in g/100 mL wie folgt berechnen:

$$\frac{A_s}{r_s}$$

A_s = Peakfläche des jeweiligen Zuckers

r_s = Kalibrierfaktor für den jeweiligen Zucker

Angabe der Ergebnisse

In g/100 mL mit zwei Dezimalen

Genauigkeit

Summe der vergärbaren Zucker

Messbereich 5,57–13,13 g/100mL :

r = 0,56

R = $0,76 + 0,24 \times m$

m = Mittelwert

Literatur

1. A-EBC, 8.7

Abbildung 1 – R-205.20.134 [2016-03]:

Chromatogramm der HPLC-Methode zur Bestimmung von Fructose, Glucose, Maltose und Maltotriose

