

# 啤酒中异 $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮的快速分析和多数据报告的应用

森田 Azusa

## 对用户的好处

- ◆ 使用快速分析条件，每次分析时可在约 5 分钟内分析啤酒中的异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮。
- ◆ 利用 LabSolutions 的多数据报告功能，无需手动转录数据即可自动输出定量值和图形。

## 前言

异  $\alpha$ - 酸是啤酒中含有的苦味成分，是在酿造工序中对啤酒花中包含的  $\alpha$ - 酸加热并使其异构化而生成的。另外，葎草灵酮也是苦味成分，通过  $\alpha$ - 酸过氧化作用而生成。

测定苦味值通常采用国际苦味单位 (IBU; International Bitterness Units)。该方法对啤酒中的苦味成分进行溶剂萃取，使用分光光度计测定异  $\alpha$ - 酸最大波长附近 275 nm 处的吸光度并进行计算。虽然这种方法很方便，但是如果样品中含有在 275 nm 处有 UV 吸收的物质，则可能得到一个过高的值。HPLC 可以利用色谱柱分离后测定组分吸光度，因此，可以更准确地定量各组分。

本文介绍了通过高效液相色谱仪 Nexera XR 参考 EBC (European Brewery Convention) 9.47 中的方法，同时分析啤酒中异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮的案例。使用紫外可见分光光度计 UV-1900i 对 IBU 进行实际测定，并与 HPLC 的结果进行了比较。此外，还介绍了快速分离条件和 LabSolutions 多数据报告的应用。

## 异 $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮标准溶液的分析

啤酒中所含的异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮的结构式如图 1 所示。异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮分别存在 3 个同系物。另外，异  $\alpha$ - 酸还具有顺反异构体。用于制备标准溶液的试剂使用了“DCHA-Iso, ICS-I4”、“International Calibration Extract 4”、“DCHA-Humulones, ICS-Hum1”。各试剂的成分如表 1 所示。将各试剂溶解在添加有磷酸的甲醇中以制备母液，进一步利用流动相稀释并进行制备 (图 4)。图 2 所示为符合 EBC 9.47 的标准溶液的色谱图，图 3 所示为在快速分析条件下分析的标准溶液的色谱图。由于用于制备标准溶液的试剂本身包含多个同系物，因此，此处分别对异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮进行了分组。

在符合 EBC 的条件下，制备流动相时需要使用 pH 计，但在快速分析条件下，无需使用 pH 计即可制备流动相。在符合 EBC 9.47 的条件下，每次分析的分析时间为 45 分钟，而在快速分析条件下，分析时间为 5 分钟，缩短了约 90%。为了改善异  $\alpha$ - 酸的峰形，在快速分析条件的流动相中添加了 EDTA。

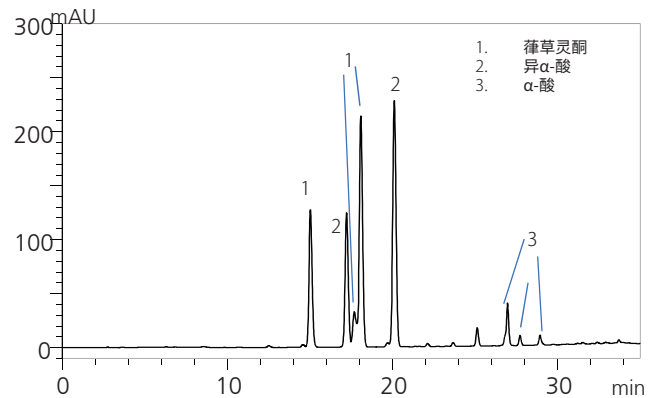


图 2 符合 EBC 9.47 的条件下的标准溶液色谱图

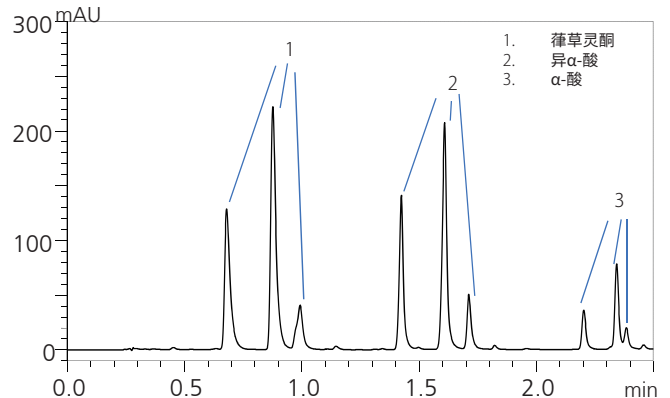


图 3 快速分析条件下标准溶液的色谱图

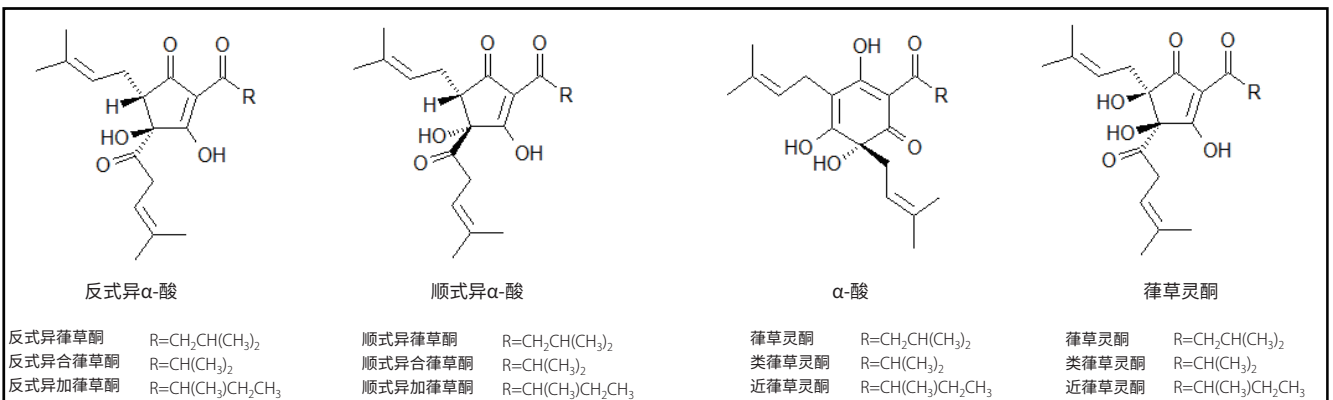

 图 1 异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮的结构式

表 1 用于制备标准溶液的试剂

试剂名	成分
DCHA-Iso, ICS-I4	总异 α- 酸 65.2% (仅反式异构体)
国际校准提取物 4	类葎草灵酮 10.98% N+ 近葎草灵酮 31.60% 总 α- 酸 42.58%
	类葎草灵酮 13.02% N+ 近葎草灵酮 13.52% 总 β- 酸 26.54%
DCHA- 葎草灵酮, ICS-Hum1	葎草灵酮 65.6%

任何试剂均由 ASBC (American Society of Brewing Chemists) 或 Labor Veritas 生产。ICS-I4 仅包含反式体。由于标准溶液中所含的 β- 酸 (含葎草灵酮、葎草灵酮、加葎草灵酮) 在 α- 酸之后洗脱, 因此, 在各分析条件下都追加了强洗脱力溶剂 (Mobile Phase B) 的清洗程序。

表 2 符合 EBC9.47 的分析条件

系统	: Nexera XR
色谱柱 <sup>*1</sup>	: Shim-pack™ GIST C8 (250 mm×4.6 mm 内径, 5 μm)
流动相 A	: 乙腈 /1% 柠檬酸缓冲液 (pH 7.0) =30:70
流动相 B	: 甲醇
流速	: 1.0 mL/min
时间程序	: B 浓度 15% (0-5 min) -80% (30-33 min) -15% (35-45min)
柱温	: 35 °C
进样量	: 50 μL
检测波长	: UV 270 nm
样品瓶	: 岛津样品瓶, LC, 1.5 mL 透明玻璃 <sup>*2</sup>

\*1 P/N: 227-30173-09, \*2 P/N: 227-34001-01

1% 柠檬酸缓冲液 (pH 7.0) : 10.9 g 一水柠檬酸 (分析纯) 溶解在约 950 ml 去离子水中。用 45% 的 KOH 将 pH 值调整到 7.0, 并加入去离子水定容至 1000 mL。用 0.45 μm 滤膜过滤溶液。

标准溶液的稀释溶液 \*3: 乙腈 /1% 柠檬酸缓冲液 (pH 7.0) =50:50 (v/v)

表 3 快速分析条件

系统	: Nexera XR
色谱柱	: Shim-pack Velox C18 (50 mm×3.0 mm 内径, 1.8 μm) <sup>*4</sup>
流动相 A	: 10 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 2.6) +0.2 mmol/L EDTA 2Na aq.
流动相 B	: 乙腈
流速	: 0.8 mL/min
时间程序	: B 浓度 40% (0 min) -90% (2.1-3.5 min) -40% (3.51-5 min)
柱温	: 40 °C
进样量	: 5 μL
检测波长	: UV 270 nm
样品瓶	: 岛津样品瓶, LC, 1.5 mL 透明玻璃 <sup>*2</sup>

\*4 P/N: 227-32008-01

流动相 A: 将 5 mmol (0.78 g) 的二水合磷酸二氢钠、5 mmol (0.34 mL) 的磷酸 (85%, 14.7 mol/L) 和 0.074 g 的 EDTA 2Na 溶解在 1L 去离子水中。

标准溶液的稀释溶液 \*5: 流动相 A/ 流动相 B=50:50 (v/v)

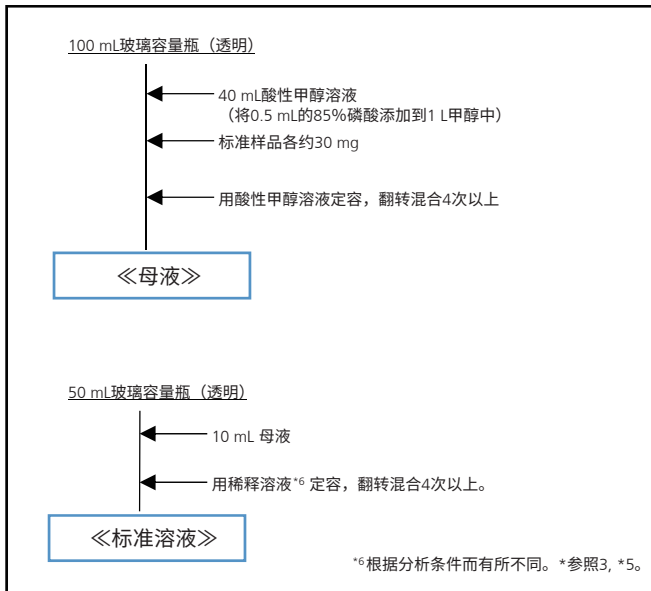


图 4 标准溶液的制备

## ■ 异 α- 酸、α- 酸和葎草灵酮标准溶液的重现性

表 4 所示为对按照图 4 制备的标准溶液反复分析 5 次时的面积的相对标准偏差。在任何分析条件下, 均得到了相对标准偏差小于等于 1% 的良好结果, 表明系统性能稳定。

表 4 重复分析 5 次时的标准溶液峰面积的相对标准偏差 (% RSD)

分析条件	葎草灵酮	异 α- 酸	α- 酸
根据 EBC 9.47	0.04	0.19	0.28
快速分析	0.03	0.03	0.03

## ■ 啤酒样品的分析

参考 EBC 9.47, 对市售的 5 种啤酒进行了预处理。各样品详情如表 5 所示, 预处理方法如图 5 所示。图 6 所示为基于 EBC 9.47 的定量值计算方法, 图 7 所示为依据 EBC 9.47 且在快速分析条件下测定各样品时的色谱图。

表 5 待测定样品的种类

样品	啤酒类型	生产国
啤酒 I	贮藏啤酒	日本
啤酒 II	贮藏啤酒	美国
啤酒 III	贮藏啤酒	意大利
啤酒 IV	麦芽酒	日本
啤酒 V	IPA (印度淡啤酒)	日本

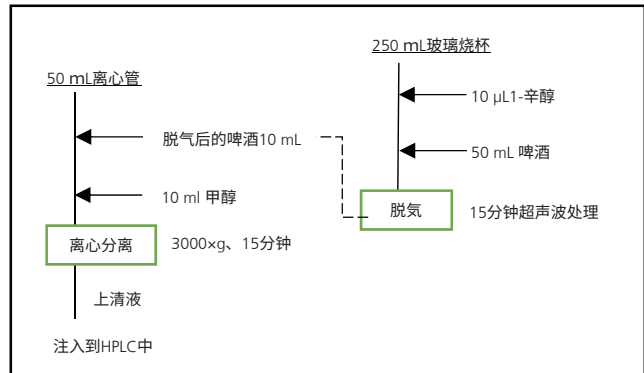


图 5 啤酒的预处理方法

$$F = A_{std} \times 50 \times 100 / (V_{std} \times V_{inj} \times M_{std} \times C_{std} / 100)$$

式中:

F = 响应因子 (4次进样平均值) (每毫克面积)

A<sub>std</sub> = 标准品中代表特定类型的异α酸的总峰面积

M<sub>std</sub> = 国际校准标准的重量, 单位为mg

C<sub>std</sub> = 国际校准标准中特定类型的异α酸的浓度, 单位为% (m/m)

V<sub>std</sub> = 以50mL稀释的标准储备液 (mL) 的体积 (工作标准溶液)

V<sub>inj</sub> = 进样量, 单位为mL

$$C_s = A_s \times D \times 1000 / (V_{inj} \times F)$$

式中:

C<sub>s</sub> = 啤酒中特定类型的异α酸的浓度, 单位为mg/L

A<sub>s</sub> = 样品中代表特定类型的异α酸的总峰面积 (两次进样的平均值)

F = 响应因子, 每毫克面积

D = 稀释系数=2×0.967=1.934, 其中0.967为将甲醇和啤酒按1:1体积比混合时的体积变化。

图 6 定量值计算方法

2\* 表示异 $\alpha$ -酸的trans体, 2表示cis体

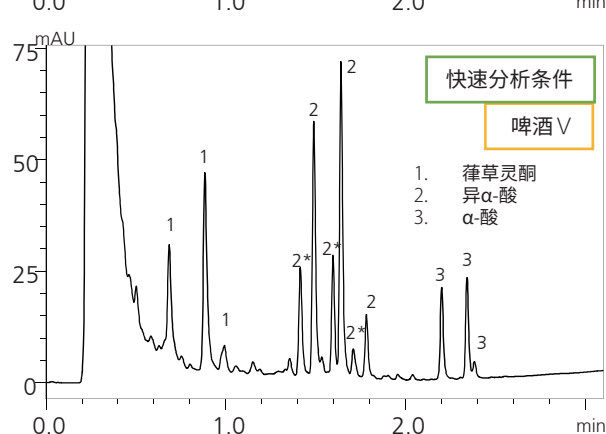
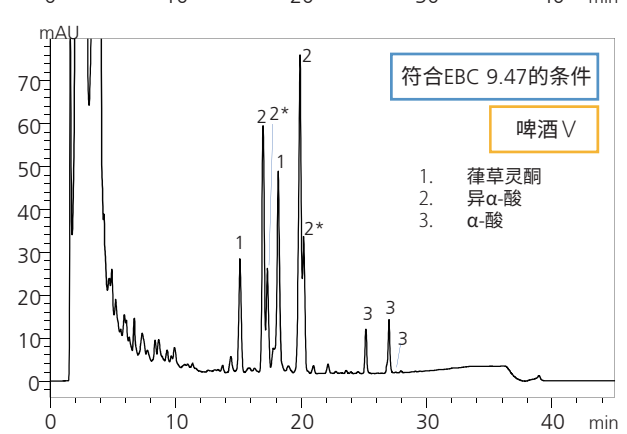
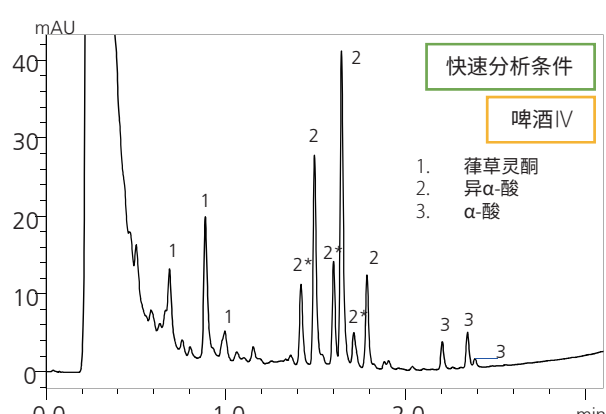
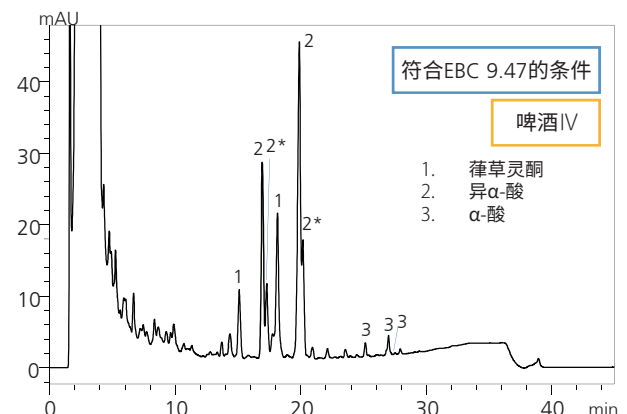
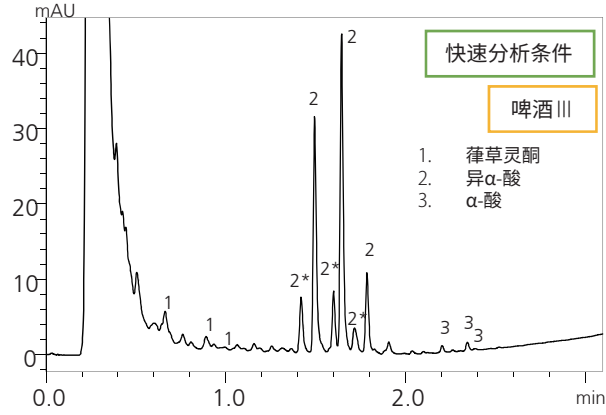
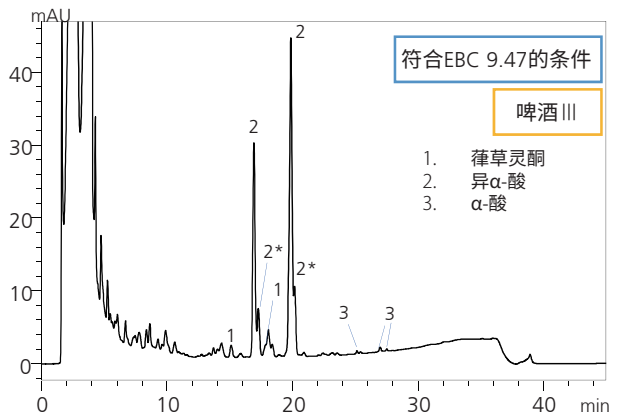
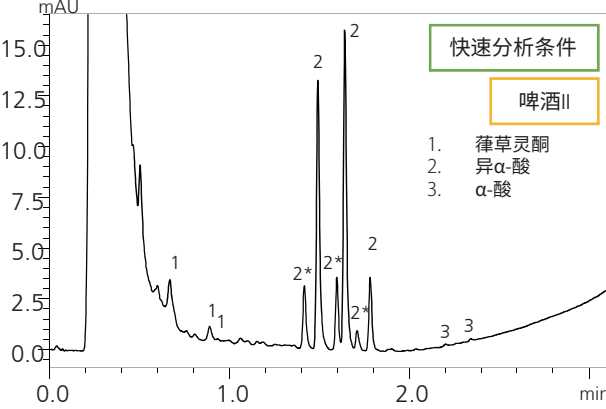
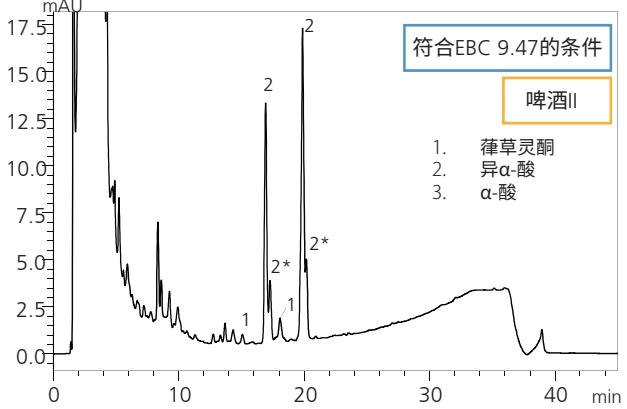
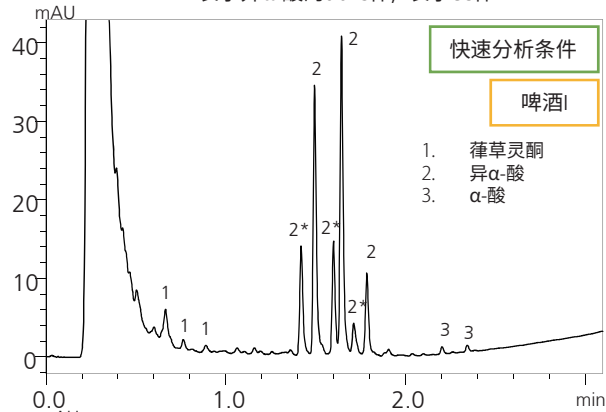
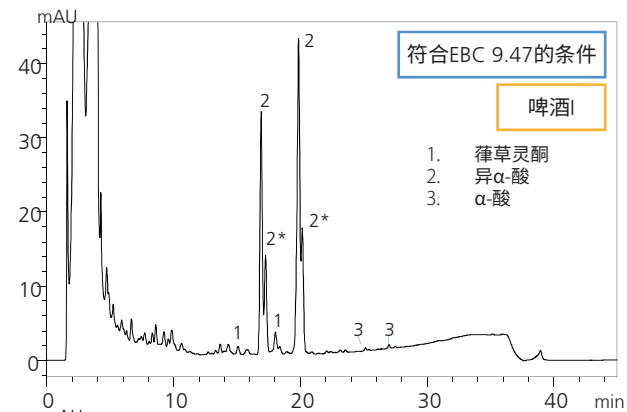


图7 啤酒的色谱图

表 6 定量结果 (符合 EBC9.47 的条件)

单位: mg/L

样品	葎草灵酮	异 $\alpha$ - 酸	$\alpha$ - 酸
啤酒 I	1.0	23.0	0.7
啤酒 II	0.4	8.0	0.0
啤酒 III	1.5	19.4	1.1
啤酒 IV	7.5	22.1	4.3
啤酒 V	17.1	40.1	18.6

表 7 定量结果 (快速分析条件)

单位: mg/L

样品	葎草灵酮	异 $\alpha$ - 酸	$\alpha$ - 酸
啤酒 I	1.2	21.0	0.7
啤酒 II	0.6	7.0	0.1
啤酒 III	1.3	18.2	0.9
啤酒 IV	6.4	19.7	3.6
啤酒 V	14.9	36.8	18.7

表 8 UV-1900i 测定结果

样品	IBU
啤酒 I	16.3
啤酒 II	5.1
啤酒 III	14.1
啤酒 IV	23.6
啤酒 V	50.5

根据图 6 的计算公式对啤酒中的异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮进行了定量。各分析条件下的结果如表 6、表 7 所示。在任何条件下均能得到几乎相同的定量值。此外,表 8 所示为根据 METHODS of the ASBC, Method Beer-23, 利用紫外可见分光光度计 UV-1900i 实际测定 IBU 的结果。关于 IBU 测定条件的详细内容,请参照应用报告 NO.A622。

在 Beer V 的 IPA (印度淡啤酒) 中,IBU 的值很高。IPA 的特点是,使用大量啤酒花所以具有独特的苦味,主要原因是由于在煮沸并冷却的麦汁中也添加了啤酒花,因此与其他啤酒相比, $\alpha$ - 酸和葎草灵酮增加。

与标准溶液相同的浓度进行标准添加,进行 5 次图 5 所示的预处理,并计算了加标回收率。表 9 所示为加标回收率,表 10 所示为添加样品 5 点峰面积的相对标准偏差。

表 9 加标回收试验结果 (在高速分析条件下测定, n=5 的平均)

单位: %

样品	葎草灵酮	异 $\alpha$ - 酸	$\alpha$ - 酸
啤酒 I	108	105	103
啤酒 II	115	115	111
啤酒 III	112	109	95
啤酒 IV	105	103	94
啤酒 V	106	104	103

表 10 加标样品的峰面积相对标准偏差 (在高速分析条件下测定, n=5)

单位: %

样品	葎草灵酮	异 $\alpha$ - 酸	$\alpha$ - 酸
啤酒 I	1.69	1.60	2.12
啤酒 II	1.07	1.48	1.45
啤酒 III	2.60	1.54	3.27
啤酒 IV	1.60	1.83	1.63
啤酒 V	0.93	0.85	0.80

\*7: 多数据报告是 Lab Solutions DB 以及 CS 的可选功能。Nexera、Shim-pack、LabSolutions 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。

## ■ 多数据报告 \*7 的应用

多数据报告是 LabSolutions™DB 以及 CS 的可选功能,可以创建灵活性较高的报告。可与分析日程表关联,在分析结束的同时创建报告。不仅可以减少手动编写报告的时间,还可以防止转录错误。

准备了一个模板,其中包含图 6 所示的用于定量的计算公式,并根据啤酒中的异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮的测定结果创建了多数据报告。同时还可以根据定量结果同时创建图表,因此,一眼就能判别苦味组分的比例 (图 8)。

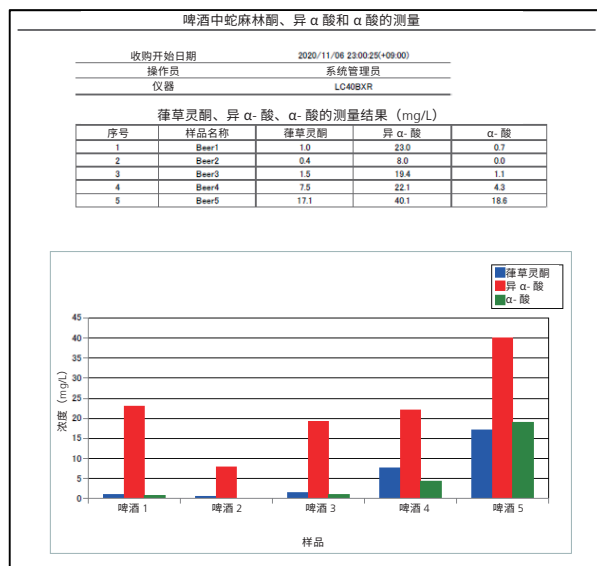


图 8 利用多数据报告  
自动计算啤酒中的异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮

## ■ 总结

本文介绍了一种使用 Nexera XR 分析啤酒中异  $\alpha$ - 酸、 $\alpha$ - 酸和葎草灵酮的案例。在符合 EBC 9.47 的条件和快速分析这两种条件下进行分析,定量值几乎相同。在快速分析条件下,每个分析都可以在 5 分钟内完成,分析时间可以减少约 90%。利用 UV-1900i 测定 IBU 与 HPLC 的结果进行了比较,结果发现,印度淡啤酒中的 IBU 较高。采用高效液相色谱法可以进行更准确的定量分析。利用多数据报告,能够自动创建图表和定量值列表,而无需将复杂的计算公式转录到表格计算软件中。

- 参考文献
- 1) American Society of Brewing Chemists, ASBC Methods of Analysis, Beer-23
  - 2) European Brewery Convention, EBC ANALYTICA, 9.47

岛津应用云

