

ビール中のキサントフモールの高速分析

早河 瑞希

ユーザーベネフィット

- ◆ ビール中のキサントフモールの高速分析が可能です。
- ◆ キサントフモールに加え、 α 酸、 β 酸など他6成分を1分析当たり8分で分析できます。
- ◆ フォトダイオードアレイ検出器を用いることで、各成分ごとに検出波長を設定でき高感度に測定できます。

■はじめに

キサントフモールはホップに含まれるプレニル化されたフラボノイドです。キサントフモールは抗酸化作用、抗炎症作用、抗菌性など多数機能を持っており、人体の健康に有益であるとされ注目されています。ビールの醸造工程の加熱によりキサントフモールは異性体化され、イソキサントフモールになります。イソキサントフモールは抗ガン作用や抗ウイルス活性があると報告されています。ホップにはフムリノン、イソ α 酸と β 酸等の苦みに関与する成分も含まれていますが、イソ α 酸は認知機能低下を改善する効果があると報告されています。

本稿では既報のアプリケーションニュース (01-00025-JPとL590)、EBC (European Brewery Convention) 9.47を参考に高速液体クロマトグラフNexera X3によるキサントフモール、イソキサントフモール、フムリノン、イソ α 酸、 α 酸、 β 酸を一斉分析した例を紹介いたします。

■キサントフモール、イソキサントフモール、フムリノン、イソ α 酸、 α 酸、 β 酸の標準溶液の分析

標準溶液は表1の試薬を用い、図1に示す手順で調製しました。表2に分析条件、図2に標準溶液のクロマトグラムをそれぞれ示します。標準溶液に含まれる各成分の濃度はキサントフモール10 mg/L、イソキサントフモール10 mg/L、フムリノン20 mg/L、イソ α 酸10 mg/L、 α 酸20 mg/L、 β 酸12.5 mg/Lです。標準溶液調製用の試薬自体に複数の同族体が含まれるため(図4)、フムリノン、イソ α 酸、 α 酸、 β 酸ではピークが複数本検出されます。これらのピークをグルーピングして定量します。各成分の検出波長は既報のアプリケーションニュースや文献を参考にし、キサントフモールで370 nm、イソキサントフモールで280 nm、イソ α 酸とフムリノンで270 nm、 α 酸と β 酸で314 nmとしました。

表1 標準溶液調製用の試薬

| 試薬名 | 組成 |
|-------------------------------------|---|
| Xanthohumol | >97.0% |
| (2S)-Isoxanthohumol | 99.77 % |
| DCHA-iso, ICS-I4 | Total Iso- α -acids 65.2 % (Trans isomer only) |
| International Calibration Extract 4 | Cohumulone 10.98 % N+adhumulone 31.60 % Total α -acids 42.58 % |
| | Colupulone 13.02 % N+adlupulone 13.52 % Total β -acids 26.54 % |
| DCHA-Humulones, ICS-Hum 1 | Humulinones 65.6 % |

・購入：Xanthohumol (東京化成工業株式会社)、(2S)-Isoxanthohumol (MedChemexpress Co., limited) "DCHA-Iso, ICS-I4"、"International Calibration Extract 4"、"DCHA-Humulones, ICS-Hum1" (ASBCまたはLabor Veritas)
・ICS-I4にはトランス体のみ含有されています。

表2 分析条件

| | |
|-------------------|---|
| System | : Nexera X3 |
| Column | : Shim-pack™ Velox C18 (50 mm × 3.0 mm I.D., 1.8 μ m) *1 |
| Mobile Phase A *2 | : 10 mmol/L (sodium) phosphate buffer (pH2.6) + 0.2 mmol/L EDTA·2Na aq. |
| Mobile Phase B | : Methanol |
| Flow Rate | : 0.7 mL/min |
| Time Program | : B Conc. 50 % (0min) -90 % (6 min) - 90 % (7 min) - 50 % (7.01-8 min) |
| Column Temp. | : 40 °C |
| Injection Vol. | : 5 μ L |
| Detection | : PDA (SPD-M40), Standard cell |
| Vial | : Shimadzu Vials, LC, 1.5 mL Clear Glass*3 |

*1 P/N: 227-32008-01

*2 Mobile phase A: :Sodium dihydrogen phosphate dihydrate 5 mmol (1.5619 g) and Phosphoric acid (85%, 14.7 mol/L) 5 mmol (0.68 mL) and EDTA·2Na 148.47 mg are dissolved in 2 L deionized water.

*3 P/N: 227-34001-01

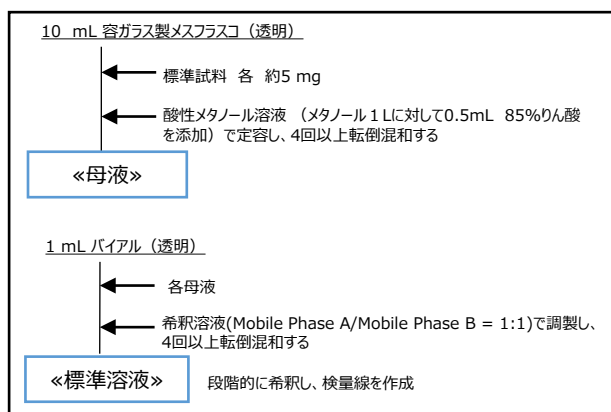


図1 標準溶液の調製

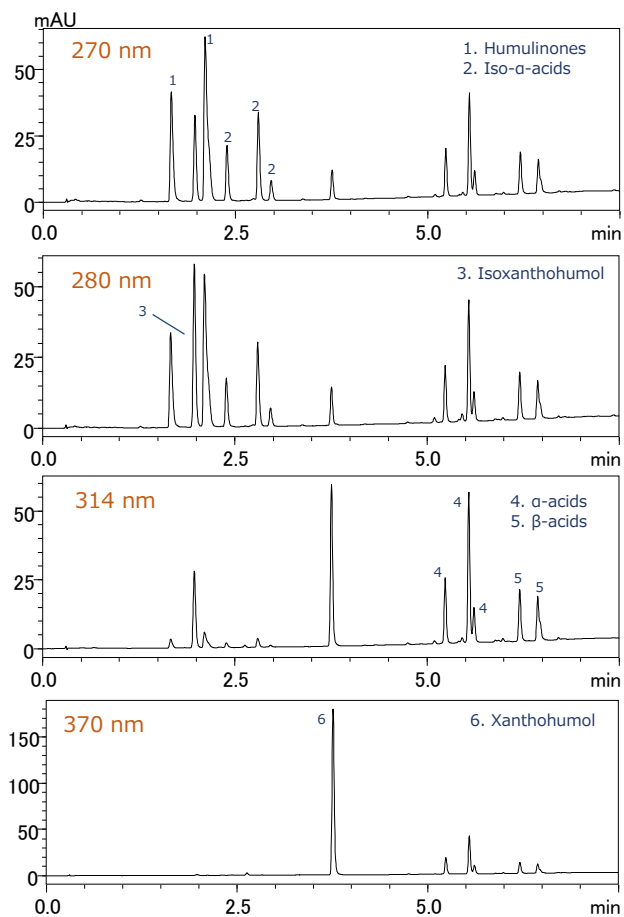


図2 標準溶液のクロマトグラム

■ビールの分析

EBC 9.47を参考に、7種類のビールを処理しました。前処理方法を図3に示します。図5～11にそれぞれの試料を測定した際のクロマトグラムを示します。5点検量線作成して各成分の定量を行いました。それぞれの検量線濃度範囲と寄与率を表3に示します。いずれの検量線も寄与率が0.999以上と良好な直線性が得られました。表4の定量結果はビール中に含まれる濃度を示します。なおイソα酸においてTrans体の他にCis体と推定されるピークが検出されたため、これらを合算し定量しました。

Beer 2、4、7については添加回収試験および再現性試験を行いました。添加回収試験では標準溶液を添加し、図3に示した前処理を6回行い、標準溶液を添加せず前処理を3回行った試料の平均値との差から回収率を算出しました(表5)。また再現性の確認では、添加試料6点のピーク面積の相対標準偏差を表6に示します。

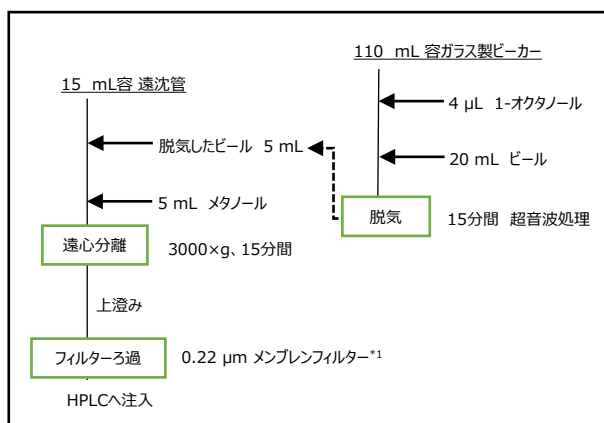


図3 ビールの前処理方法

*1 P/N : GLCTD-HPTFE1322

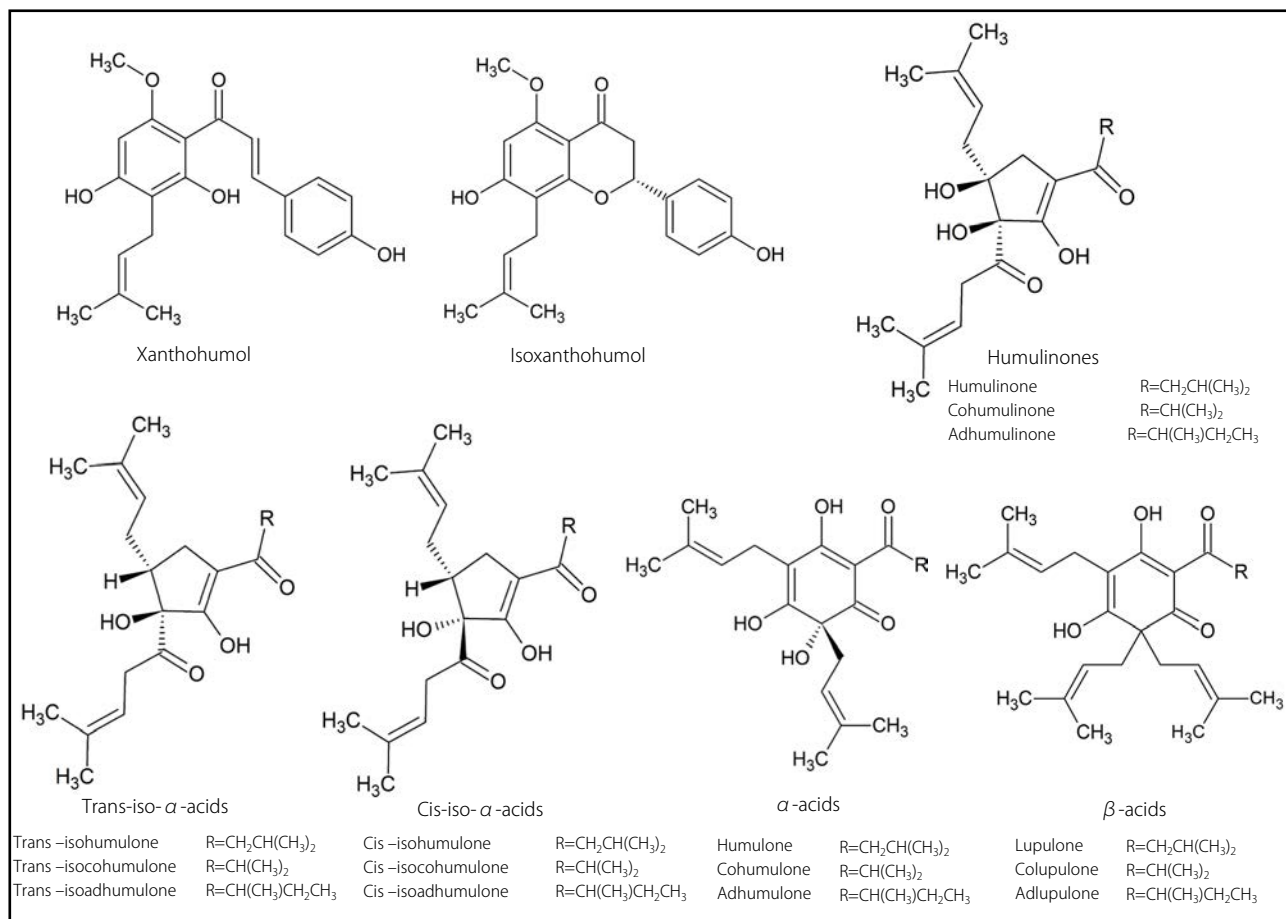


図4 キサントフモール、イソキサントフモール、フムリノン、イソα酸、α酸、β酸の構造式

Beer1

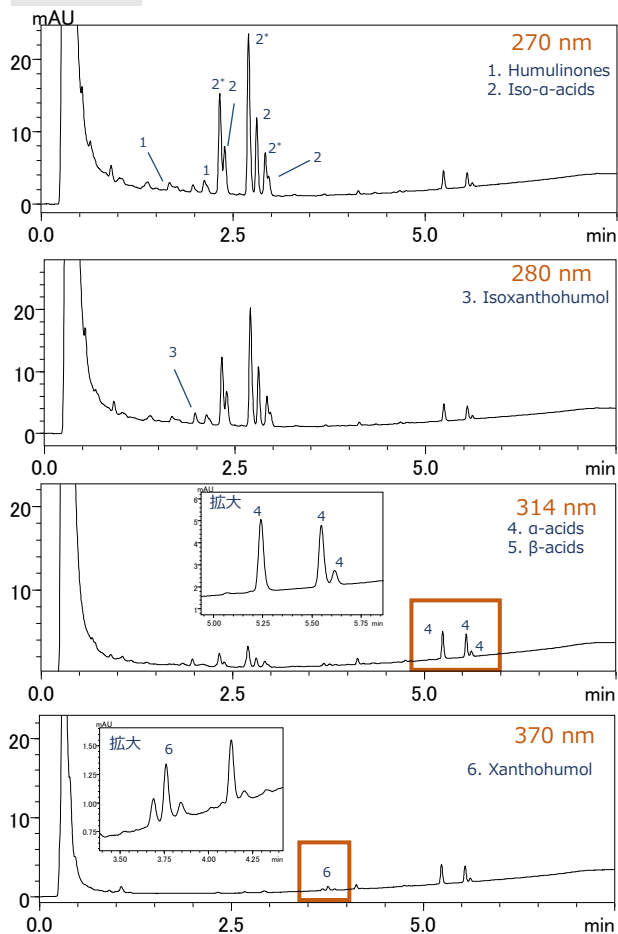


図5 Beer1のクロマトグラム

Beer3

2はイソ α 酸のtrans体、2'はcis体と推定します。

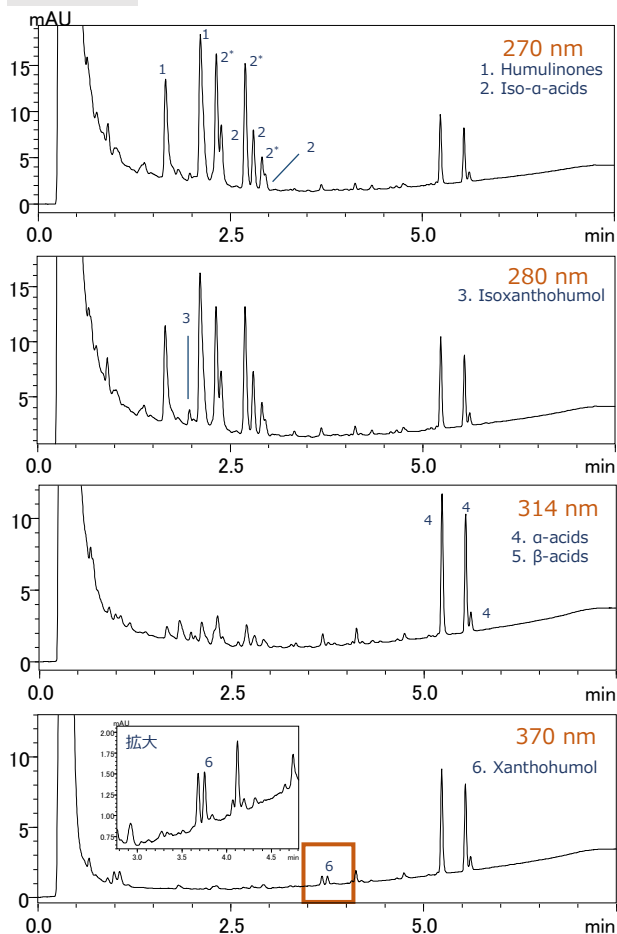


図7 Beer3のクロマトグラム

Beer2

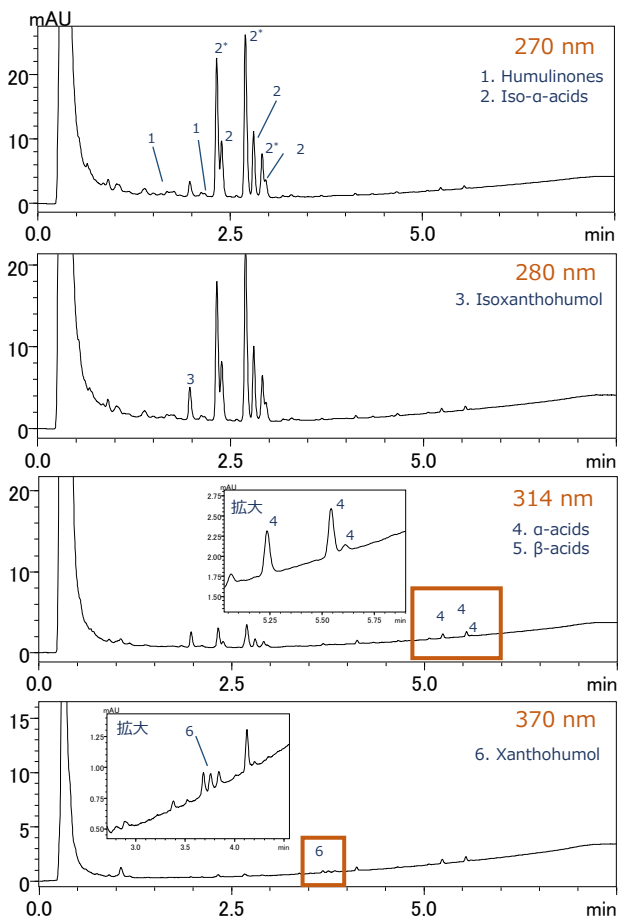


図6 Beer2のクロマトグラム

Beer4

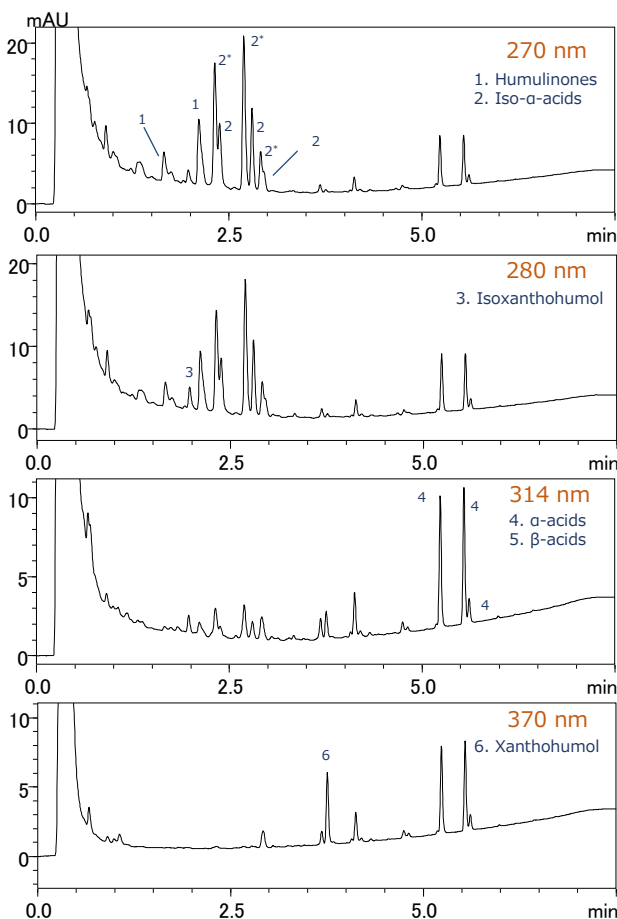


図8 Beer4のクロマトグラム

Beer5

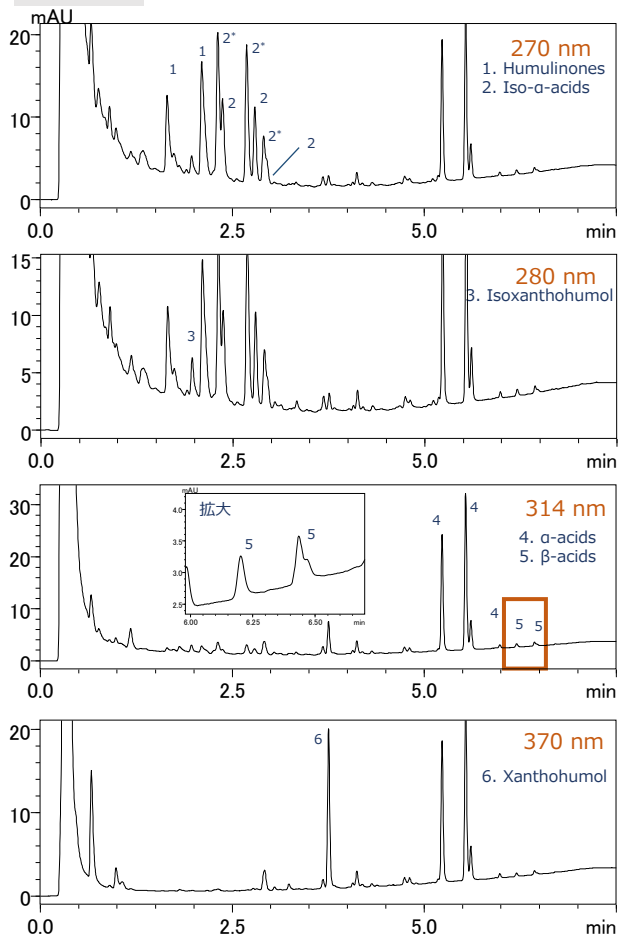


図9 Beer5のクロマトグラム

Beer7

2はイソ α 酸のtrans体、2'はcis体と推定します。

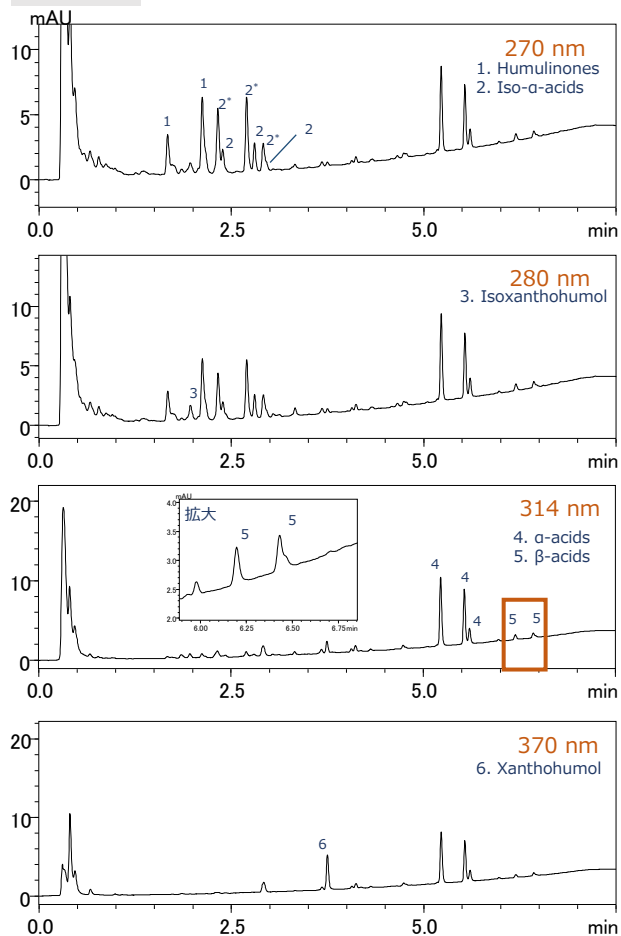


図11 Beer7のクロマトグラム

Beer6

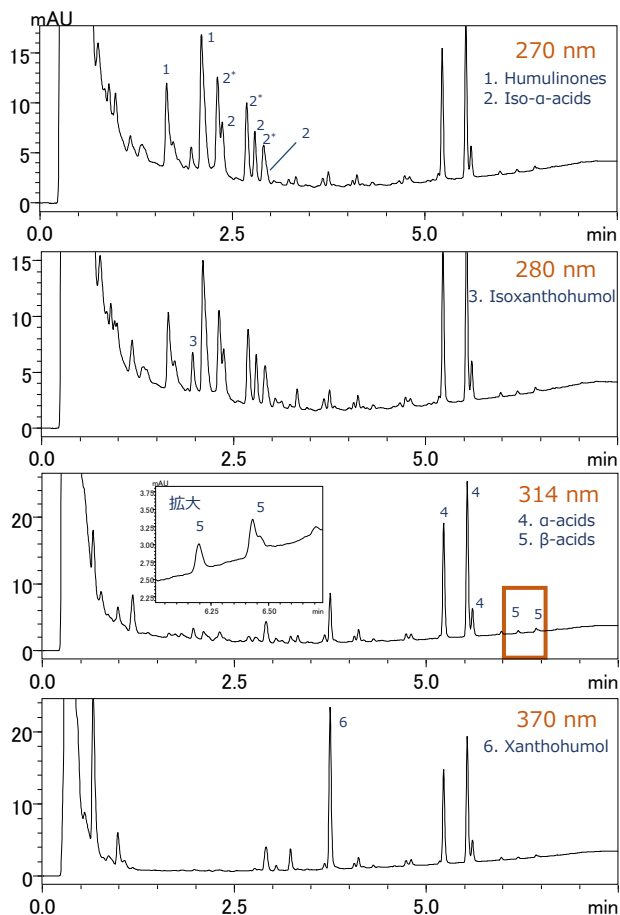


図10 Beer6のクロマトグラム

表3 検量線範囲と寄与率

| Compound | Conc.range (mg/L) | r ² |
|----------------------|-------------------|----------------|
| Xanthohumol | 0.016~0.250 | 0.9991 |
| | 0.125~2.500 | 0.9999 |
| Isoxanthohumol | 0.125~2.500 | 0.9998 |
| Humloinones | 0.250~5.000 | 0.9999 |
| | 1.000~20.000 | 1.0000 |
| Iso- α -acids | 0.500~10.000 | 0.9996 |
| α -acids | 0.500~10.000 | 0.9990 |
| | 1.000~20.000 | 0.9994 |
| β -acids | 0.019~0.312 | 0.9996 |
| | 0.039~0.623 | 0.9999 |

■まとめ

本稿ではNexera X3でビール中のキサントフモール、イソキサントフモール、フムリノン、イソ α 酸、 α 酸、 β 酸の分析例を紹介しました。1分析当たり8分以内の迅速な分析が可能であるほか、PDA検出器を用いることで検出波長を最適化することができ、適正な感度を確保することができました。本稿の方法により業務の効率化が期待されます。

[参考情報]

- 1) European Brewery Convention, EBC ANALYTICA, 7.15
- 2) European Brewery Convention, EBC ANALYTICA, 9.47
- 3) European Brewery Convention, EBC ANALYTICA, 9.50
- 4) Vázquez Loureiro P et al. "Determination of Xanthohumol in Hops, Food Supplements and Beers by HPLC", foods. 2019
- 5) Anna Katarzyna Żołnierczyk et al. "Isoxanthohumol — Biologically active hop flavonoid", Fitoterapia. Pages 71-82. Jun 2015
- 6) Táborský, J et al. "A study of dynamics of bitter acids and xanthohumol in hop pellets during storage". Agronomy Research.16(S2), 1509-1516, 2018
- 7) A. Gahr et al. "The Stability of Bitter Substances in Berrt During the Ageing Process". Brewing Science. Dec 2020
- 8) Dieudonné Nimubona et al. "An approximate shelf life prediction of elaborated lager beer in terms of degradation of its iso- α -acids". Journal of Food Engineering, 138-143, Nov 2012

表4 定量結果

単位：mg/L

| Sample | Xanthohumol | Isoxanthohumol | Humulinones | Iso- α -acids | α -acids | β -acids |
|--------|-------------|----------------|-------------|----------------------|-----------------|----------------|
| Beer1 | 0.052 | 0.640 | 1.284 | 21.016* | 3.858 | 0.018* |
| Beer2 | 0.012* | 1.432 | 0.586 | 25.328* | 1.392 | 0.006* |
| Beer3 | 0.064 | 0.402 | 12.126 | 16.704 | 9.646 | 0.012* |
| Beer4 | 0.594 | 1.030 | 5.226 | 21.730* | 9.188 | 0.122 |
| Beer5 | 2.092 | 1.326 | 10.456 | 23.150* | 26.280 | 1.120 |
| Beer6 | 2.458 | 1.300 | 10.752 | 13.216 | 20.412 | 0.708 |
| Beer7 | 0.534 | 0.502 | 3.348 | 5.974 | 8.684 | 0.906 |

*: 検量線の外挿値

表5 添加回収試験結果 (n=6の平均) 単位：%

| | Beer2 | Beer4 | Beer7 |
|----------------------|-------|-------|-------|
| Xanthohumol | 95 | 104 | 103 |
| Isoxanthohumol | 104 | 111 | 107 |
| Humloinones | 102 | 109 | 108 |
| Iso- α -acids | 98 | 113 | 106 |
| α -acids | 91 | 103 | 91 |
| β -acids | 96 | 94 | 103 |

表6 添加試料のピーク面積の相対標準偏差 (n=6の平均) 単位：%

| | Beer2 | Beer4 | Beer7 |
|----------------------|-------|-------|-------|
| Xanthohumol | 8.609 | 4.923 | 2.143 |
| Isoxanthohumol | 5.751 | 5.166 | 3.711 |
| Humloinones | 7.740 | 4.843 | 2.570 |
| Iso- α -acids | 1.431 | 2.962 | 2.627 |
| α -acids | 5.914 | 5.253 | 2.190 |
| β -acids | 8.021 | 7.937 | 1.648 |

Nexera、Shim-packは株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

初版発行：2022年 3月
01-00375A-JP A改訂版発行：2022年 6月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022