

## ビール中のイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの 高速分析とマルチデータレポートの活用

森田 あずさ

### ユーザーベネフィット

- ◆ 高速分析条件を用いることで、ビール中のイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンを1分析あたり約5分で分析できます。
- ◆ マルチデータレポートの活用により、データを転記することなく定量値やグラフを自動で出力することができます。

### ■はじめに

イソ $\alpha$ 酸はビールに含まれる苦み成分で、ホップ中に含まれる $\alpha$ 酸が醸造工程で加熱され異性化することより生成されます。また、フムリノンも苦味成分であり、 $\alpha$ 酸が過酸化することにより生成されます。

苦味価の測定には、一般に国際苦味単位 (IBU; International Bitterness Units) が用いられます。ビール中の苦味成分を溶媒抽出し、イソ $\alpha$ 酸の極大波長付近である275 nmの吸光度を分光光度計で測定し算出する方法です。簡便ですが、275 nmにUV吸収を持つ物質が含まれていると過大な値となる可能性があります。一方、HPLCではカラムで分離した後に吸光度を測定するので、より正確に各成分を定量することができます。

本稿では、EBC (European Brewery Convention) 9.47を参考に、高速液体クロマトグラフNexera XRによるビール中のイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの分析例を紹介します。紫外可視分光光度計UV-1900iでIBUを実測し、HPLCの結果と比較を行いました。また、高速分離条件とマルチデータレポートの活用も合わせてご紹介します。

### ■イソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの標準溶液の分析

ビール中に含まれるイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの構造式を図1に示します。イソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンそれぞれに3つの同族体が存在します。さらにイソ $\alpha$ 酸には、シストランス異性体も存在します。標準溶液調製用の試薬には、“DCHA-Iso, ICS-I4”、“International Calibration Extract 4”、“DCHA-Humulones, ICS-Hum1”を用いました。表1にそれぞれの試薬の組成を示します。それぞれの試薬をりん酸を添加したメタノールに溶解させて母液を調製し、さらに移動相で希釈して調製しました(図4)。図2にEBC 9.47準拠、図3に高速分析条件で分析した標準溶液のクロマトグラムをそれぞれ示します。標準溶液調製用の試薬自体に複数の同族体が含まれるため、ここではイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンをそれぞれグルーピングしています。

EBC準拠条件では、移動相調製にpHメーターが必要ですが、高速分析条件では、pHメーターを用いずに移動相調製が可能です。分析時間は、EBC 9.47準拠条件では1分析あたり45分かかりますが、高速分析条件では5分で、約90%の時間短縮ができました。高速分析条件の移動相には、イソ $\alpha$ 酸のピーク形状を向上させるためEDTAを添加しています。

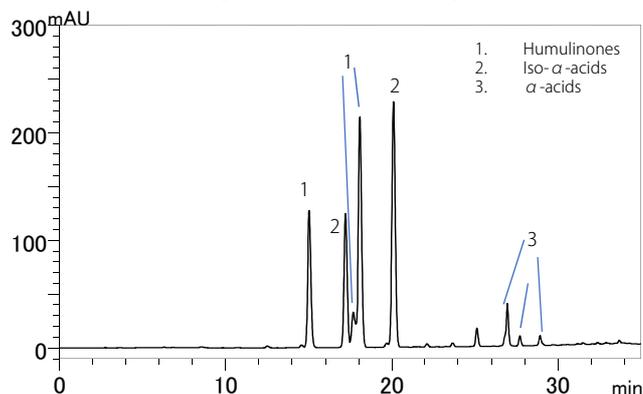


図2 EBC 9.47準拠条件 標準溶液のクロマトグラム

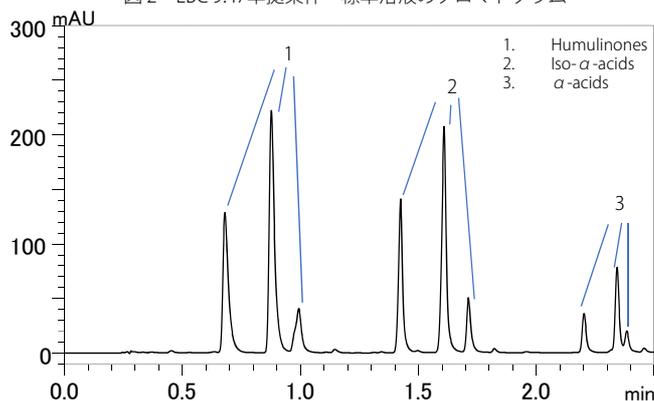


図3 高速分析条件 標準溶液のクロマトグラム

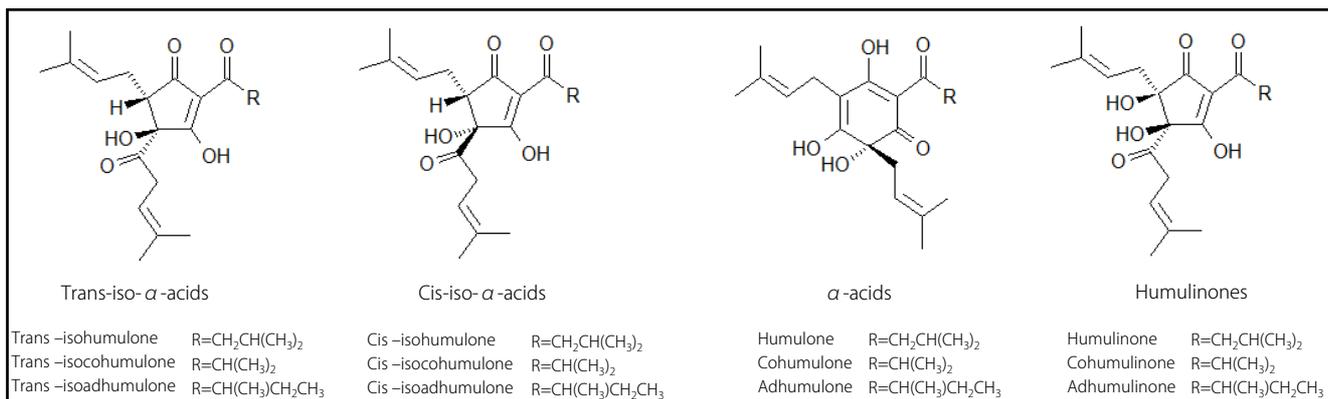


図1 イソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの構造式

表1 標準溶液調製用の試薬

試薬名	組成
DCHA-Iso, ICS-14	Total Iso- $\alpha$ -acids 65.2% (Trans isomer only)
International Calibration Extract 4	Cohumulone 10.98% N+adhumulone 31.60% <b>Total <math>\alpha</math>-acids 42.58%</b>
	Colupulone 13.02% N+adlupulone 13.52% <b>Total <math>\beta</math>-acids 26.54%</b>
DCHA-Humulonones, ICS-Hum1	Humulonones 65.6%

いずれの試薬もASBC (American Society of Brewing Chemists) またはLabor Veritas製です。ICS-14にはトランス体のみ含有されています。標準溶液に含まれる $\beta$ 酸(コルプロン, ルブロン, アドルブロン)は、 $\alpha$ 酸のあとに溶出しますので、それぞれの分析条件では溶出力の高い溶媒 (Mobile Phase B) による洗浄工程を加えています。

表2 EBC9.47準拠 分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack™ GIST C8 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 $\mu$ m)
Mobile Phase A	: Acetonitrile/1% citric acid buffer(pH7.0)=30:70
Mobile Phase B	: Methanol
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Time program	: B Conc. 15%(0-5min)-80%(30-33 min)-15%(35-45 min)
Column Temp.	: 35 °C
Injection Vol.	: 50 $\mu$ L
Detection	: UV 270 nm
Vial	: Shimadzu Vials, LC, 1.5 mL Clear Glass *2

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

1% citric acid buffer(pH7.0): 10.9 g citric acid monohydrate (analytical grade) is dissolved in about 950 ml deionized water. The pH is adjusted to 7.0 with 45 % KOH and deionized water added to make up to 1000 mL. The solution is filtered through a 0.45  $\mu$ m filter.

Diluted solution of standard solution\*3: Acetonitrile/1% citric acid buffer(pH7.0)=50:50(v/v)

表3 高速分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack Velox C18 (50 mm × 3.0 mm I.D., 1.8 $\mu$ m) *4
Mobile Phase A	: 10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH2.6)+ 0.2 mmol/L ETDA·2 Na aq.
Mobile Phase B	: Acetonitrile
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Time program	: B Conc. 40%(0 min)-90%(2.1-3.5 min)-40%(3.51-5 min)
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 5 $\mu$ L
Detection	: UV 270 nm
Vial	: Shimadzu Vials, LC, 1.5 mL Clear Glass *2

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

Mobile phase A: :Sodium dihydrogen phosphate dihydrate 5 mmol (0.78 g) and Phosphoric acid (85%, 14.7 mol/L) 5 mmol (0.34 mL) and EDTA·2Na 0.074 g are dissolved in 1L deionized water.

Diluted solution of standard solution\*5: mobile phase A / mobile phase B=50:50(v/v)

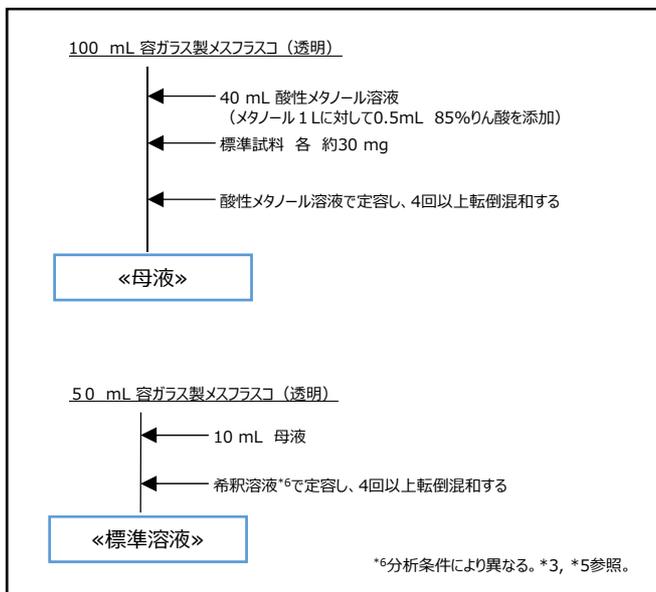


図4 標準溶液の調製

## ■イソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの標準溶液の再現性

図4に従って調製した標準溶液を5回繰り返し分析した時の面積の相対標準偏差を表4に示します。いずれの分析条件でも、相対標準偏差1%以下の良好な結果が得られ、システムパフォーマンスが安定していることが分かりました。

表4 5回繰り返し分析における標準溶液のピーク面積の相対標準偏差 (%RSD)

Analytical condition	Humulonones	Iso- $\alpha$ -acids	$\alpha$ -acids
Based on EBC 9.47	0.04	0.19	0.28
High speed analysis	0.03	0.03	0.03

## ■ビールの分析

EBC 9.47を参考に、市販されている5種類のビールを前処理しました。各試料の詳細を表5に、前処理方法を図5に示します。図6にEBC 9.47準拠した定量値の計算方法、図7にEBC 9.47準拠及び高速分析条件で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。

表5 測定試料の種類

Sample	Beer type	Country of manufacture
Beer I	Lager	Japan
Beer II	Lager	USA
Beer III	Lager	Italy
Beer IV	Ale	Japan
Beer V	IPA (Indian Pale Ale)	Japan

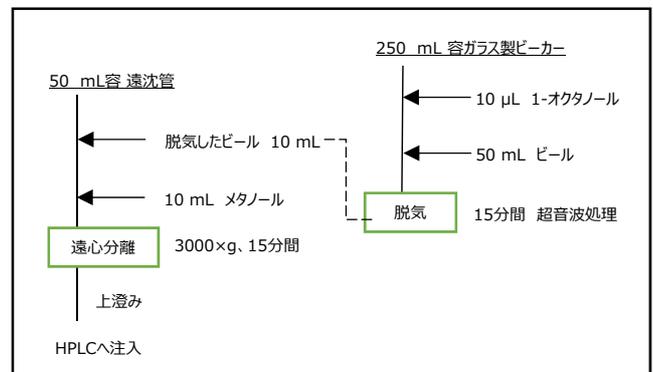


図5 ビールの前処理方法

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

where:

F = response factor (average of 4 injections) (area per mg)

$A_{std}$  = total area of the peaks representing a particular type of iso- $\alpha$ -acids in the standard

$M_{std}$  = weight of international calibration standard in mg

$C_{std}$  = concentration of a particular type of iso- $\alpha$ -acids in the international calibration standard in % (m/m)

$V_{std}$  = volume of stock standard solution in mL diluted at 50 mL (working standard solution)

$V_{inj}$  = volume injected in mL

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

where:

$C_s$  = concentration of a particular type of iso- $\alpha$ -acids in the beer expressed as mg/L

$A_s$  = total area of the peaks representing a particular type of iso- $\alpha$ -acids in the sample (average of 2 injections)

F = response factor in area per mg

D = dilution factor = 2 × 0.967 = 1.934 where 0.967 is due to the volume change when mixing methanol and beer 1:1 by volume.

図6 定量値算出方法

2\* はイソ $\alpha$ 酸のtrans体, 2はcis体を示します

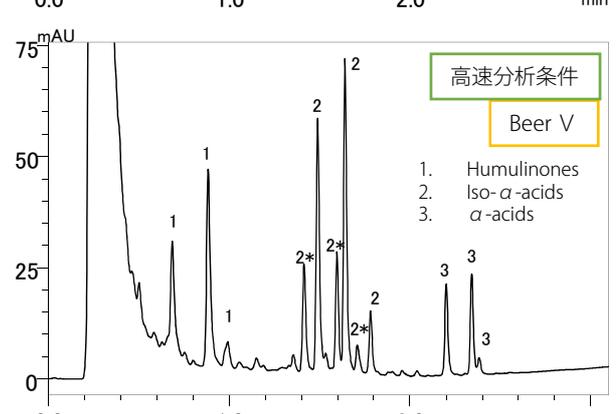
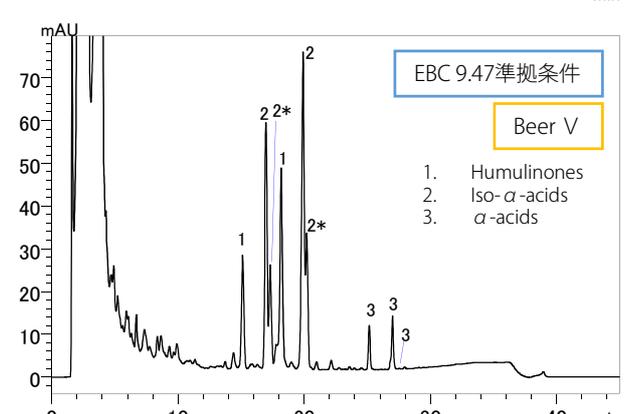
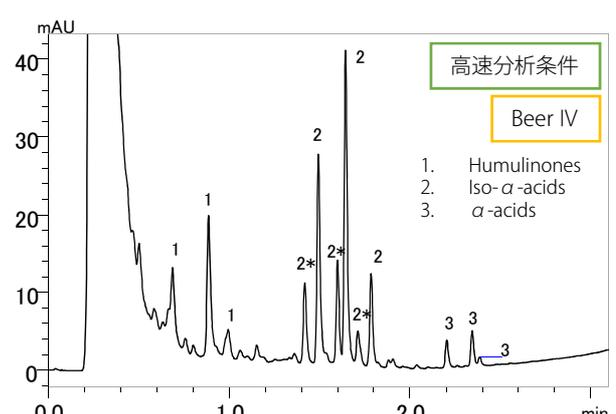
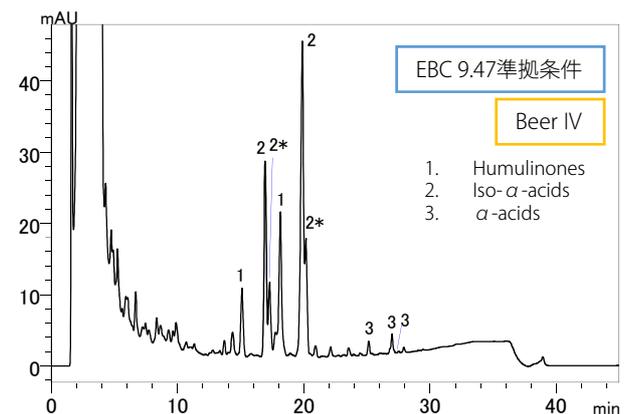
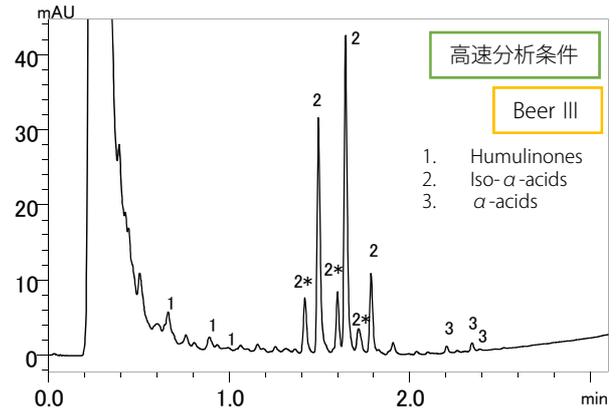
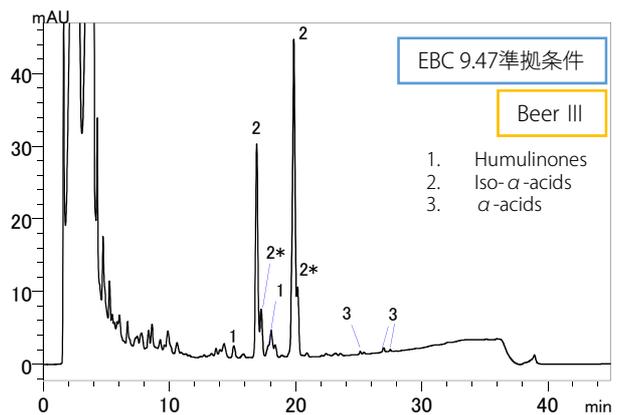
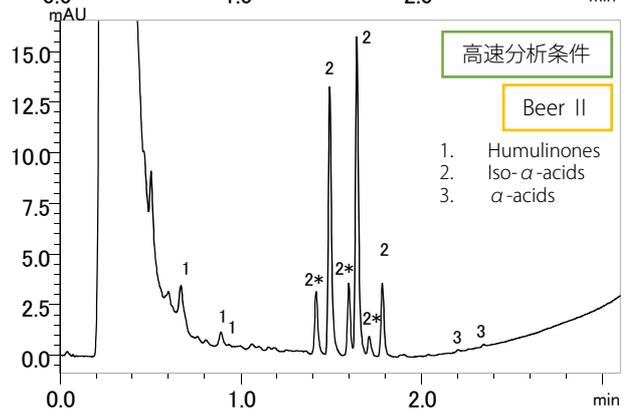
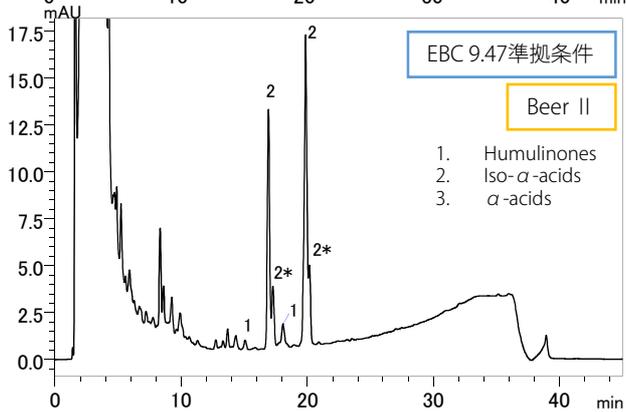
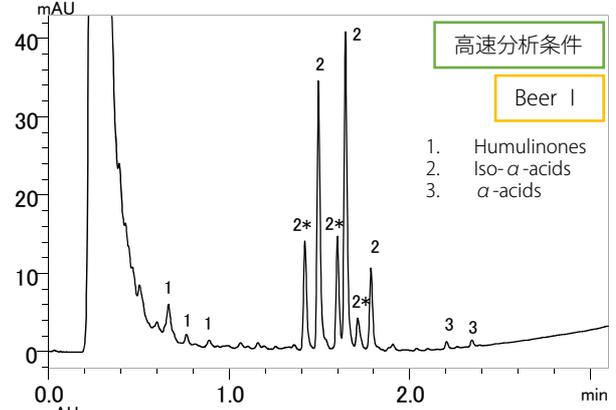
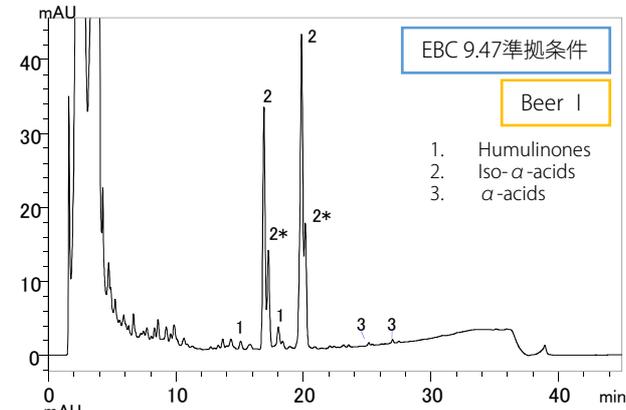


図7 ビールのクロマトグラム

表6 定量結果 (EBC9.47準拠条件)

単位: mg/L

Sample	Humulinones	Iso- $\alpha$ -acids	$\alpha$ -acids
Beer I	1.0	23.0	0.7
Beer II	0.4	8.0	0.0
Beer III	1.5	19.4	1.1
Beer IV	7.5	22.1	4.3
Beer V	17.1	40.1	18.6

表7 定量結果 (高速分析条件)

単位: mg/L

Sample	Humulinones	Iso- $\alpha$ -acids	$\alpha$ -acids
Beer I	1.2	21.0	0.7
Beer II	0.6	7.0	0.1
Beer III	1.3	18.2	0.9
Beer IV	6.4	19.7	3.6
Beer V	14.9	36.8	18.7

表8 UV-1900i測定結果

Sample	IBU
Beer I	16.3
Beer II	5.1
Beer III	14.1
Beer IV	23.6
Beer V	50.5

図6の計算式に従って、ビール中のイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの定量を行いました。それぞれの分析条件での結果を表6、表7に示します。どちらの条件でもほぼ同等の定量値を得ることができました。また、METHODS of the ASBC, Method Beer-23に従って、紫外可視分光光度計UV-1900iでIBUを実測した結果を表8に示します。IBUの測定条件の詳細については、アプリケーションニュースA622をご参照ください。

Beer VのIPA (インディアンペールエール) では、IBUの値が大きい結果となりました。IPAは多量のホップを使用することによる独特の苦みが特徴で、煮沸冷却された麦汁に対してもホップを添加するため、 $\alpha$ 酸やフムリノンも他のビールと比較して増えていることが要因と考えられます。

標準溶液と同じ濃度を標準添加し、図5に示した前処理を5回行い添加回収率を算出しました。表9に添加回収率を、表10に添加試料5点のピーク面積の相対標準偏差を示します。

表9 添加回収試験結果 (高速分析条件で測定、n=5の平均)

単位: %

Sample	Humulinones	Iso- $\alpha$ -acids	$\alpha$ -acids
Beer I	108	105	103
Beer II	115	115	111
Beer III	112	109	95
Beer IV	105	103	94
Beer V	106	104	103

表10 添加試料のピーク面積の相対標準偏差 (高速分析条件で測定、n=5)

単位: %

Sample	Humulinones	Iso- $\alpha$ -acids	$\alpha$ -acids
Beer I	1.69	1.60	2.12
Beer II	1.07	1.48	1.45
Beer III	2.60	1.54	3.27
Beer IV	1.60	1.83	1.63
Beer V	0.93	0.85	0.80

\*7: マルチデータレポートはLabSolutions DBおよびCSのオプション機能です。

Nexera、Shim-pack、LabSolutions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。

## ■ マルチデータレポート\*7の活用

マルチデータレポートは、表計算ソフトと同様の柔軟性の高いレポートを作成できるLabSolutions™ DBおよびCSのオプション機能です。分析スケジュールに連動させて分析終了と同時に報告書を作成できます。手作業によるレポート作成の時間を削減できるだけでなく、転記ミスも防ぐことができます。

図6の定量に用いる計算式を組み込んだテンプレートを用意し、ビール中のイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの測定結果からマルチデータレポートを作成しました。定量結果からグラフも同時に作成できるので、苦味成分の比率を一目で判別できます (図8)。

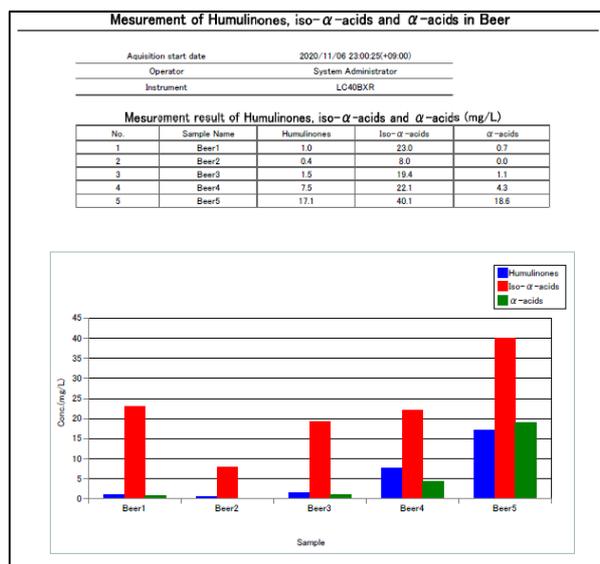


図8 マルチデータレポートによるビール中のイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの自動計算

## ■ まとめ

本稿ではNexera XRで、ビール中のイソ $\alpha$ 酸、 $\alpha$ 酸、フムリノンの分析例を紹介しました。EBC 9.47準拠した条件と高速分析の2条件で分析し、定量値はほぼ同等となりました。高速分析条件では分析時間を約90%短縮でき、1分析あたり5分で分析できる条件となっています。UV-1900iでIBUを測定しHPLCの結果と比較した結果、インディアンペールエールビールではIBUが高めとなりました。分離分析であるHPLCを用いることで、より正確な定量を行うことが可能です。マルチデータレポートの活用により、複雑な計算式も表計算ソフトに転記することなくグラフや定量値の一覧を自動で作成できました。

参考文献

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