SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. L590

高速液体クロマトグラフ　Nexera™ XR

ビール中のイソα酸、α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α酸、α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α酸はビールに含まれる苦み成分で、ホップ中に含まれるα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、α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α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α酸、α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α酸、α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α酸、α酸、フムリノンの構造式を図1に示します。イソα酸、α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α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-Humulinones, 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α酸、α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α酸のピーク形状を向上させるためEDTAを添加しています。

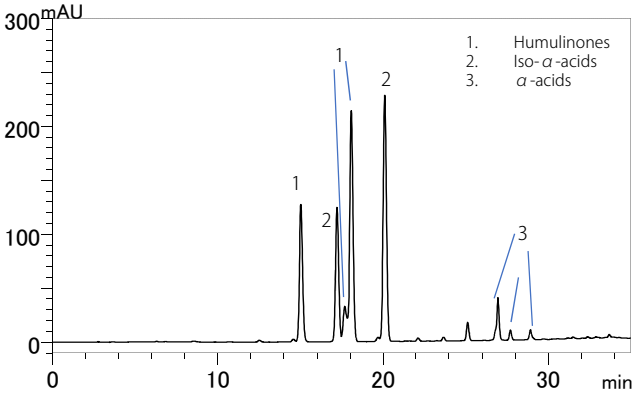


図２　EBC 9.47準拠条件　標準溶液のクロマトグラム

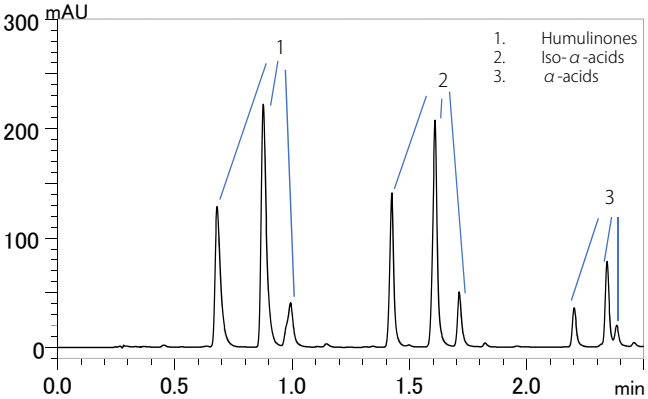


図３　高速分析条件　標準溶液のクロマトグラム

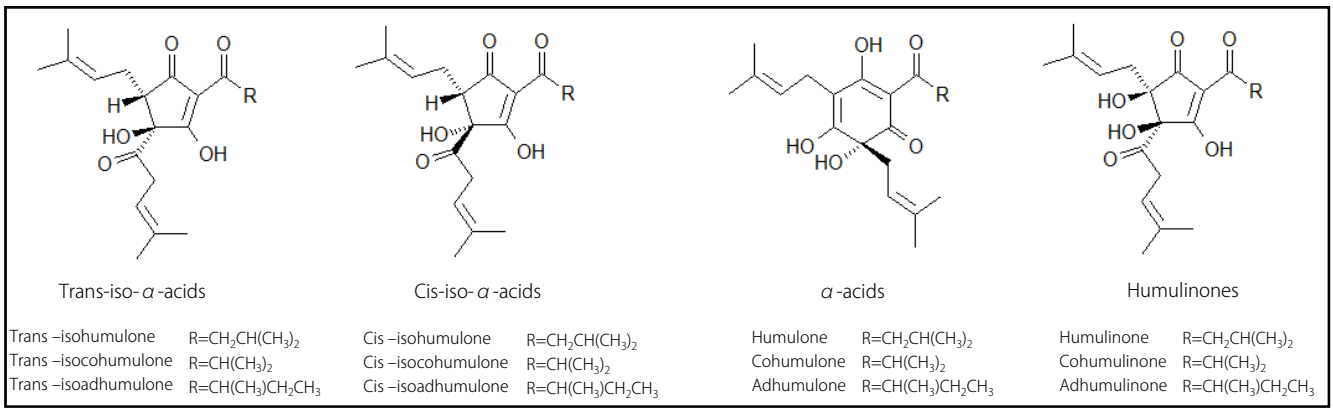


図１　イソα酸、α酸、フムリノンの構造式

表 1 標準溶液調製用の試薬

試薬名	組成
DCHA-Iso, ICS-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-Humulinones, ICS-Hum1	Humulinones 65.6%

いずれの試薬もASBC（American Society of Brewing Chemists）またはLabor Veritas製です。ICS-I4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β酸(コルプロン，ルプロン，アドルプロン)は、α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 *1 : Shim-pack™ GIST C8（250 mm × 4.6 mm I.D., 5 µm）
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 ℃
Injection Vol. : 50 µL
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 µm 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 µm）*4
Mobile Phase A : 10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH2.6)+ 0.2 mmol/L ETDA･2Na 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 ℃
Injection Vol. : 5 µL
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)

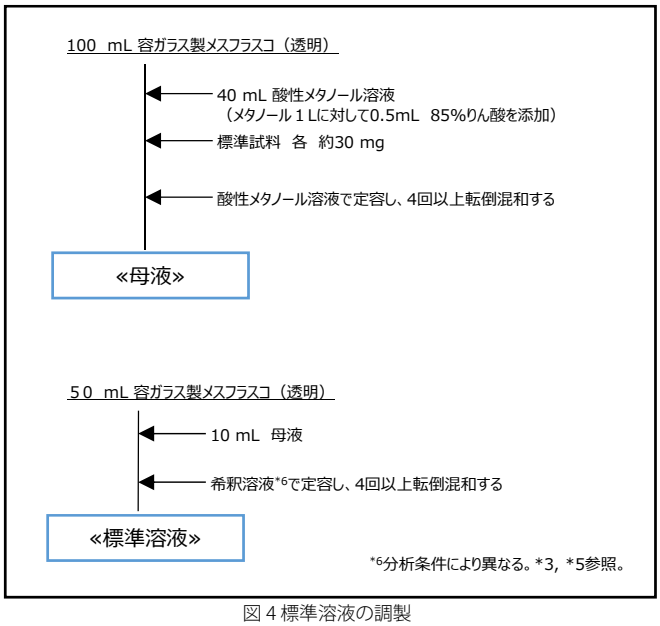


図 4 標準溶液の調製

■イソα酸、α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	Humulinones	Iso-α-acids	α-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

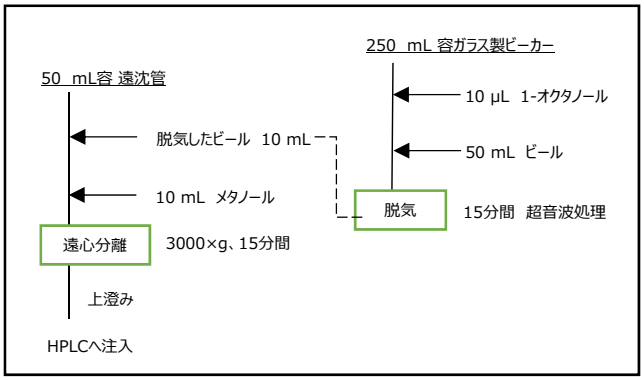


図 5 ビールの前処理方法

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

where:
F = response factor (average of 4 injections) (area per mg)
A_{std} = total area of the peaks representing a particular type of iso-α-acids in the standard
M_{std} = weight of international calibration standard in mg
C_{std} = concentration of a particular type of iso-α-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

$$Cs = As \times D \times 1000 / (V_{inj} \times F)$$

where:
Cs = concentration of a particular type of iso-α-acids in the beer expressed as mg/L
As = total area of the peaks representing a particular type of iso-α-acids in the sample (average of 2 injections)
F = response factor in area per mg
D = dilution factor = 2 x 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α酸のtrans体,2はcis体を示します

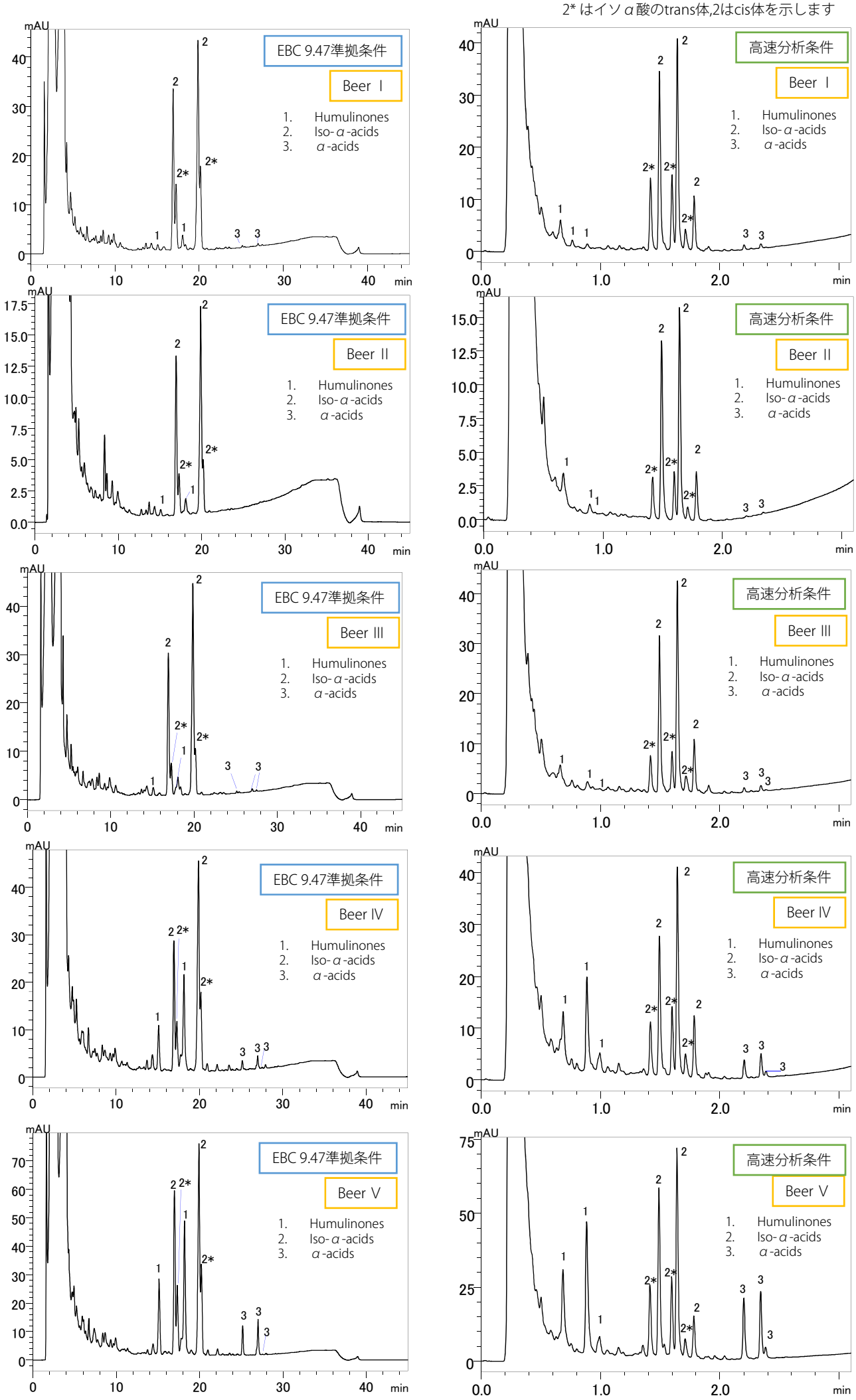


図 7 ビールのクロマトグラム

表 6 定量結果（EBC9.47準拠条件）

単位：mg/L

Sample	Humulinones	Iso-α-acids	α-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-α-acids	α-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α酸、α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、α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-α-acids	α-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-α-acids	α-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

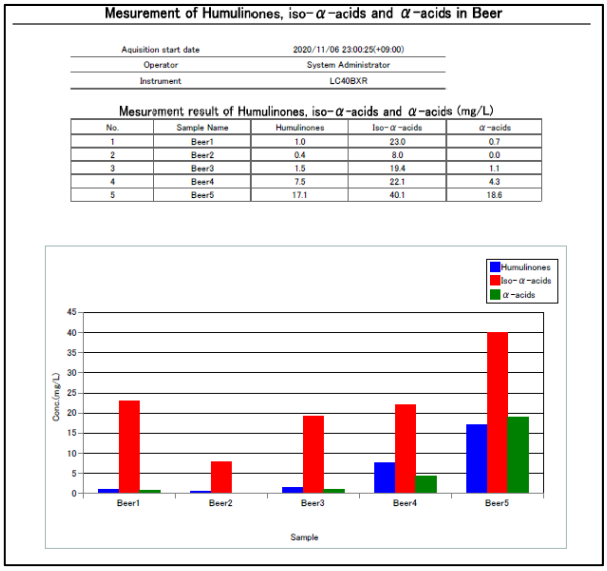
＊7：マルチデータレポートはLabSolutions DBおよびCSのオプション機能です。

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α酸、α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）。



Mesurement of Humulinones, iso-α-acids and α-acids in Beer

Aquisition start date	2020/11/06 23:00:25(+09:00)
Operator	System Administrator
Instrument	LC40BXR

Mesurement result of Humulinones, iso-α-acids and α-acids (mg/L)

No.	Sample Name	Humulinones	Iso-α-acids	α-acids
1	Beer1	1.0	23.0	0.7
2	Beer2	0.4	8.0	0.0
3	Beer3	1.5	19.4	1.1
4	Beer4	7.5	22.1	4.3
5	Beer5	17.1	40.1	18.6

図 8 マルチデータレポートによる
ビール中のイソα酸、α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α酸、α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

株式会社 島津製作所 分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター
島津コールセンター 0120-131691

初版発行：2020 年 12月

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。

改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/

© Shimadzu Corporation, 2020