SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ　i-Series LC-2050C 3D

一体型HPLCによるビール中成分（キサントフモール/フムリノン/イソα酸/α酸/β酸）の一斉分析

早河 瑞希

ユーザーベネフィット

- ◆ 汎用的なHPLC i-Series LC-2050C 3Dを用いて、人体の健康に有益な機能を持つと報告されているキサントフモールとイソキサントフモール、苦味にかかわる成分（フムリノン、イソα酸、α酸、β酸）の一斉分析が可能です。
- ◆ 夾雑成分の影響を受けにくい分析条件により定量性を向上させることが可能です。

■はじめに

近年おいしさのみならず、健康機能性も兼ね備えたビール開発が進められつつあります。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。一方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。

既報のアプリケーションニュース01-00375Aでは、分析時間８分で上記6成分の一斉高速分析例を紹介しました。

本稿では汎用的なHPLCである、高速液体クロマトグラフ i-Series LC-2050C 3Dと詰まりによるカラムへのダメージ抑制を考え、既報アプリケーションニュースよりも粒子径の大きなカラムを用いて分析を行いました。また夾雑成分の影響を受けにくいような分離条件を用いた、ビール中の成分（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）の分析例をご紹介します。

■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、3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（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20 mg/L、α酸20 mg/L、β酸12.5 mg/L）。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ため、これらのピークをグルーピングして検量線を作成し、実試料を定量しました。検出波長は文献[1)2)3)4)]を参考に設定しました（表2）。

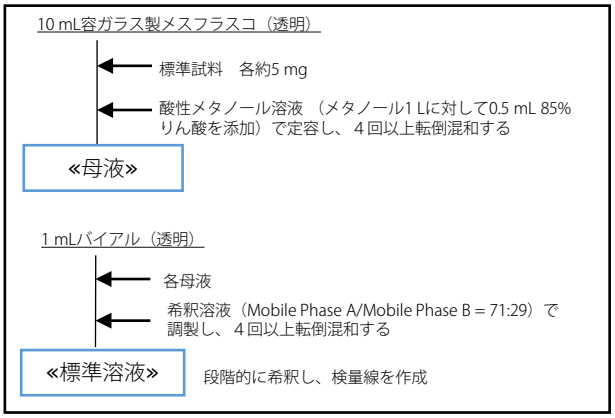


図 1 標準溶液の調製

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	Cohumunone 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-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-Humulinones, 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	:	i-Series LC-2050C 3D
Column	:	Shim-pack Velox™ Biphenyl（100 mm × 3.0 mm I.D., 2.7 µm）*1
Mobile Phase A*2	:	10 mmol/L （Sodium）phosphate buffer （pH2.6） + 0.2 mmol/L EDTA・2Na aq.
Mobile Phase B	:	Acetonitrile
Flow Rate	:	0.7 mL/min
Column Temp.	:	40 °C
Injection Vol.	:	20 µL
Detection	:	Xanthohumol: 370 nm Isoxanthohumol: 280 nm Iso-α-acids and Humulinones: 270 nm α-acids and β-acids: 314 nm
Vial	:	SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*3

*1 P/N: 227-32016-03
*2 Mobile phase A:Sodium dihydrogen phosphate dihydrate 5 mmol (1.56 g) and Phosphoric acid (85%, 14.7 mol/L) 5 mmol (0.68 mL) and EDTA・2Na 148 mg are dissolved in 2 L deionized water.
*3 P/N: 227-34001-01

表 3　タイムプログラム

Time (min)	B.conc
00.00	29
17.00	31
17.25	50
29.00	58
29.01	95
32.00	95
32.01	29
35.00	29

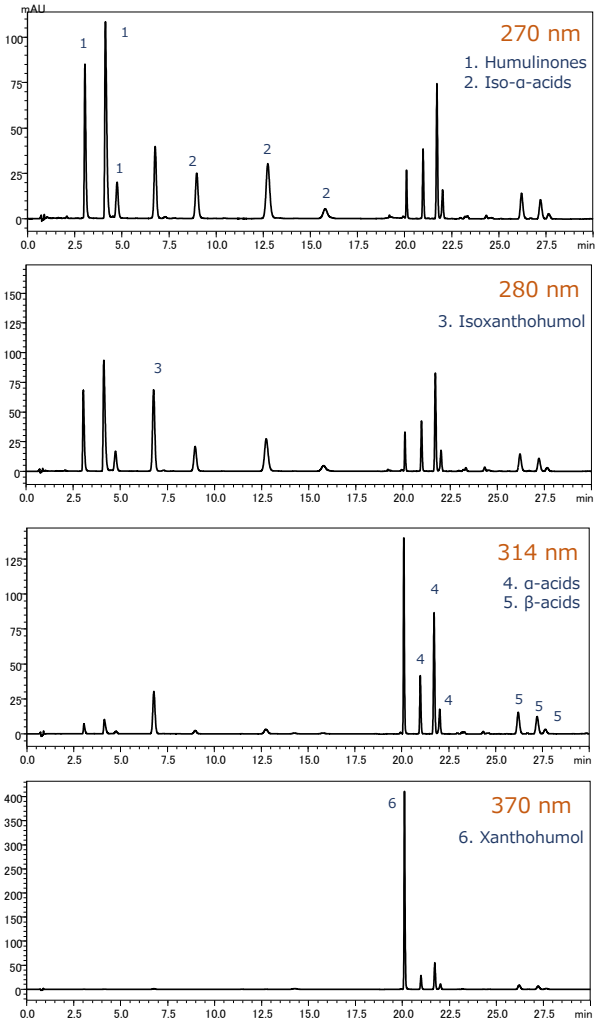
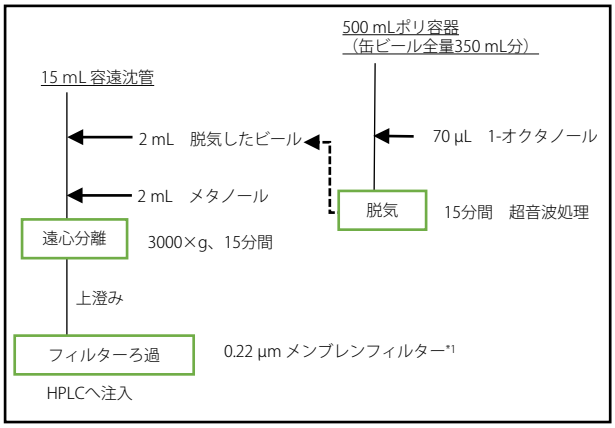


図 2 標準溶液のクロマトグラム

■ビールの分析

対象成分6種類について5点検量線を作成したところ、寄与率が0.999以上と良好な直線性が得られました（表4）。既報アプリケーションニュース01-00375A を参考に前処理を行い、3種類のビールを分析しました。前処理方法を図3に示します。図5~7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。表5に各成分のビール中含有量を示します。なおイソα酸において*cis*体と推定されるピーク[5]が検出されたため、*trans*体と*cis*体を合算し定量しました。

再現性試験では脱気後の工程を6回繰り返し行いました。各試料 6 点のピーク面積の相対標準偏差を表6に示します。今回用いたビールの前処理工程で、消泡剤作用をもつ1-オクタノールを加えたのちサンプリングすることで、ビールの泡によるサンプリング誤差を低減することができました。またBeer1を用いて添加回収試験を行いました。図3に示した脱気後に標準溶液を添加し、以降の工程を3回繰り返し行いました。添加回収試験の結果を表7に示します。



*1 P/N： GLCTD-HPTFE1322

図 3 ビールの前処理方法

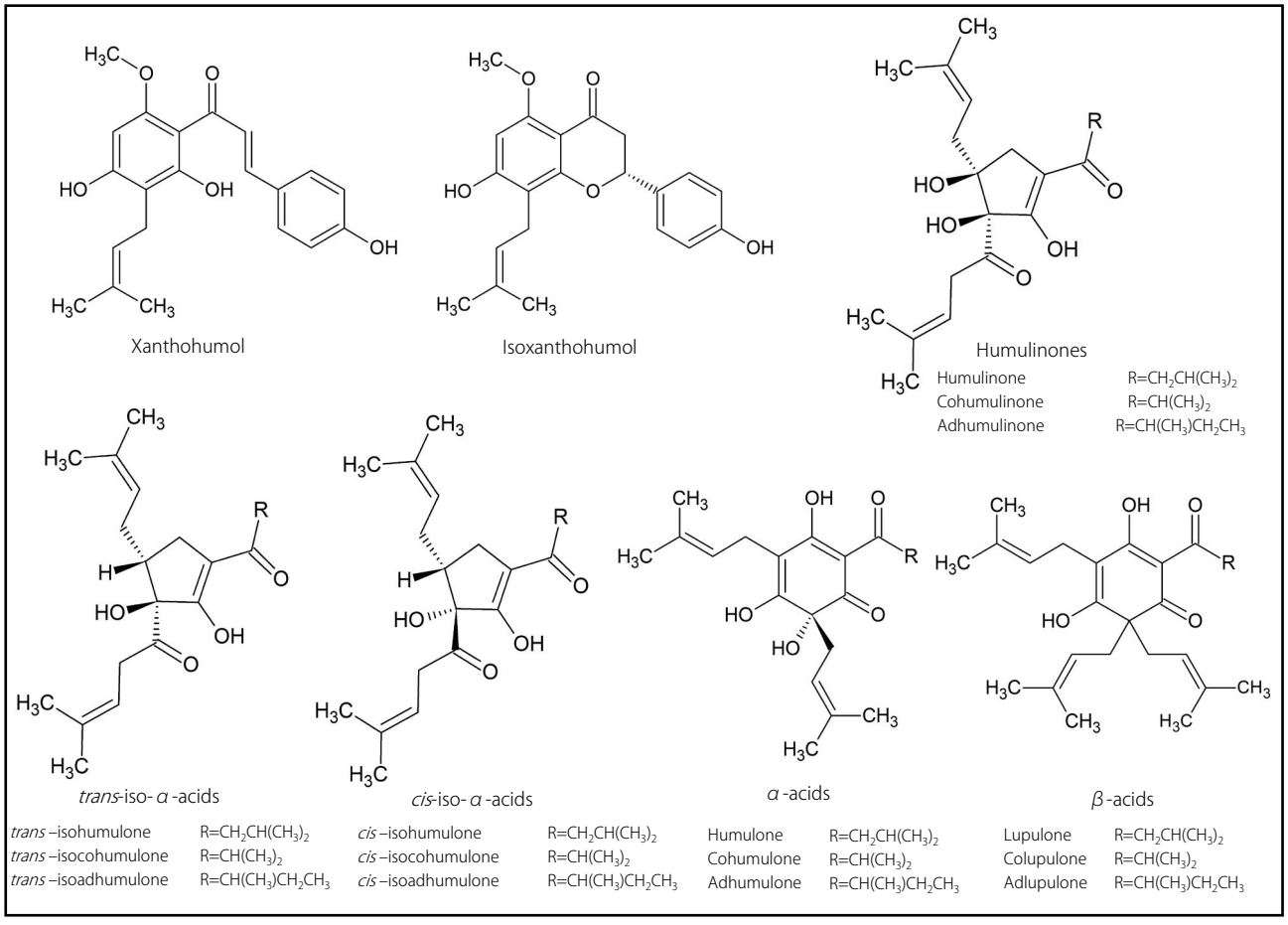


図 4　キサントフモール、イソキサントフモール、フムリノン、イソα酸、α酸、β酸の構造式

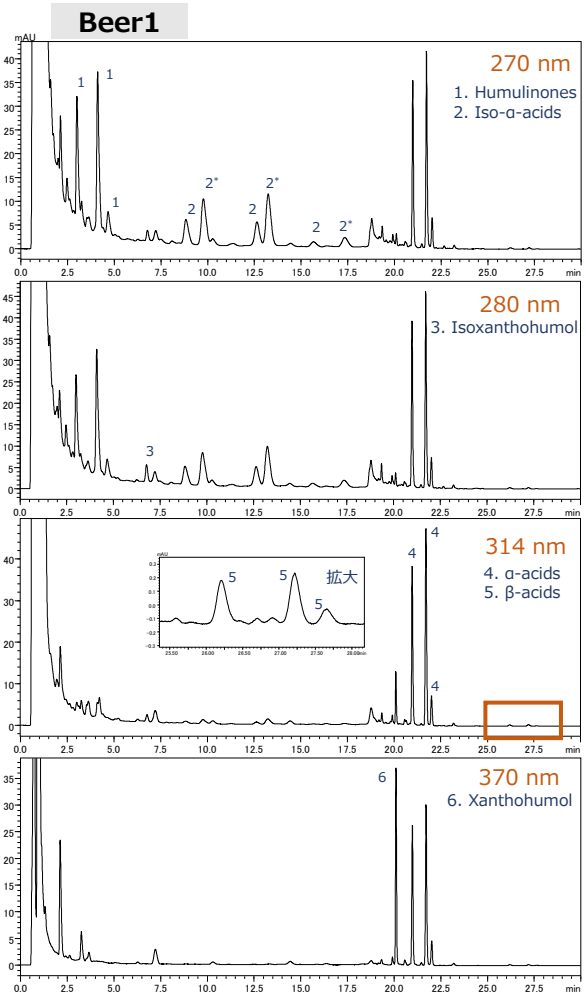
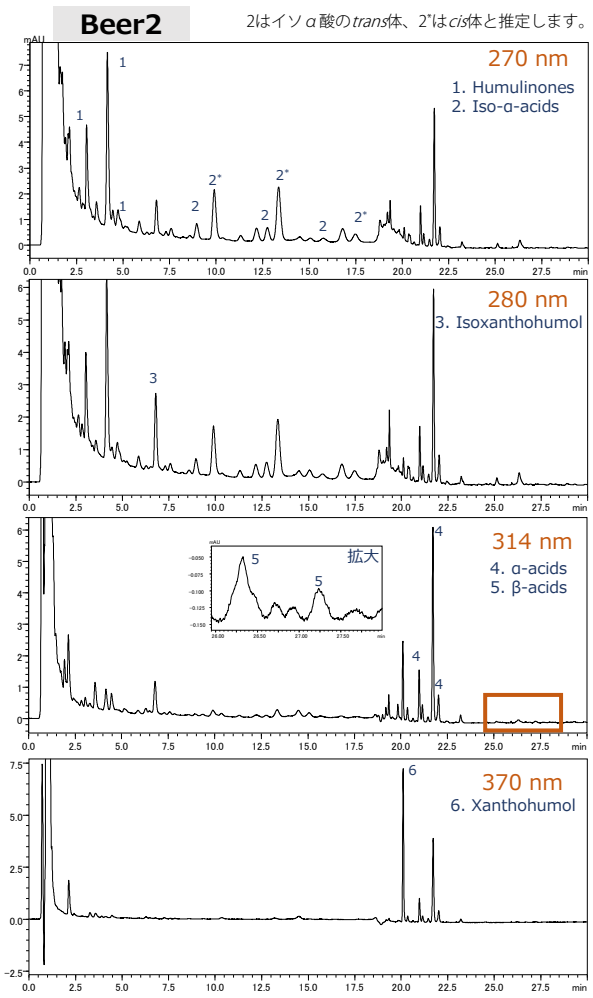


図 5 Beer1のクロマトグラム



2はイソα酸のtrans体、2*はcis体と推定します。

図 6 Beer2のクロマトグラム

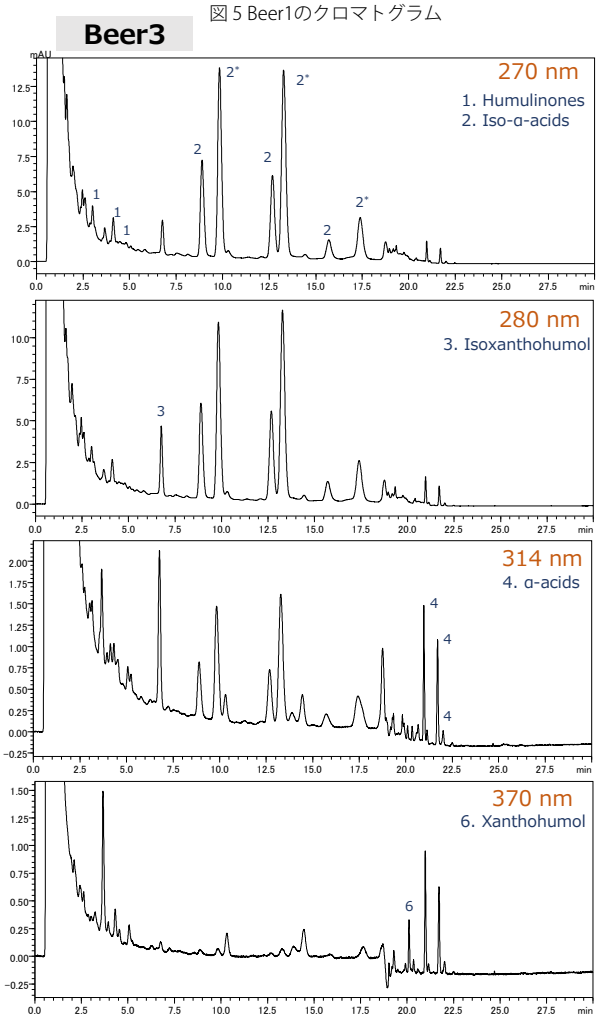


図 7 Beer3のクロマトグラム

表 4　検量線範囲と寄与率

Compound	Conc. Range(mg/L)	r^2
Xanthohumol	0.016~1.000	0.9999
Isoxanthohumol	0.250~10.000	0.9998
Humloinones	0.250~10.000	1.0000
Iso-α-acids	0.500~20.000	0.9998
α-acids	0.500~20.000	0.9995
β-acids	0.039~1.250	0.9991

表 5 定量結果　　単位：mg/L

Sample	Xanthohumol	Isoxanthohumol	Humulinones	Iso-α-acids	α-acids	β-acids
Beer1	1.77	1.07	14.61	29.02	25.16	2.37
Beer2	0.36	0.71	2.18	4.30	3.04	0.29
Beer3	0.01*	1.26	0.84	34.72	1.34	N.D.

*：検量線の外挿値

表 6 再現性試験結果（%RSD、n=6）

	Beer 1	Beer 2	Beer 3
Xanthohumol	3.31	1.33	1.73
Isoxanthohumol	2.90	0.38	1.35
Humlinones	2.72	0.84	2.18
Iso-α-acids	2.71	0.76	1.37
α-acids	3.40	0.62	2.11
β-acids	3.28	0.67	-

表 7 添加回収試験結果
（ Beer1 、n=3の平均）　　単位：%

	Recovery rate
Xanthohumol	96
Isoxanthohumol	98
Humlinones	92
Iso-α-acids	111
α-acids	97
β-acids	103

■まとめ

本稿ではi-Series LC-2050C 3D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。本分析では目的成分と夾雑成分の分離を改善したため、夾雑成分の影響を軽減した一斉分析が可能です。

＜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) Dieudonné Nimubona et al. “An approximate shelf life prediction of elaborated lager beer in terms of degradation of its iso-a-acids”. Journal of Food Engineering, 138-143, Nov 2012

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/

01-00537-JP　初版発行：2023年 4月

島津コールセンター 0120-131691

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

LCMS-2050
シングル四重極質量分析計

関連分野

食品・飲料

栄養・機能性成分

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ