

UHPLC

作者

Nonie Danna

PerkinElmer, Inc.
Waltham, MA USA测定酒花及
啤酒中的
 α -酸类物质

简介

酒花是啤酒酿造过程中重要的原料，在麦芽谷物后面加入，以使啤酒产生特定的苦味及香味。在啤酒中广泛使用酒花的历史可以追溯到十六世纪。然而，早在11世纪，欧洲中部就将酒花用作一种天然的防腐剂（今天德国）；结果发现使用了酒花作为防腐剂的啤酒，

不仅保存良好，且具有独特的味觉和嗅觉。

酒花是来自一种叫做香蛇麻的锥状植物，该植物具有蛇麻素的腺体，富含树脂和油脂。树脂含有大量的 α -酸类物质，赋予大部分啤酒苦味，而油脂在很大程度上是赋予啤酒香味。

啤酒酿造过程中，质量控制的一个重要方面是确保 α -酸类物质的种类及含量，以保证啤酒是相同的批次。此外，在啤酒的酿造过程中，它们转化为异构的 α -酸类物质的转化率使得某种牌子的啤酒具有特定味道（图1）。为此，在世界各地的酿酒厂，酒花和啤酒中的 α -酸类物质被作为常规参数进行监测。本应用文献提供了一种简单的方法，用于测定五种酒花原料中 α -酸类物质的种类及含量。分析了一种美国产的IPA牌啤酒，确证其中含有异构的 α -酸类物质。

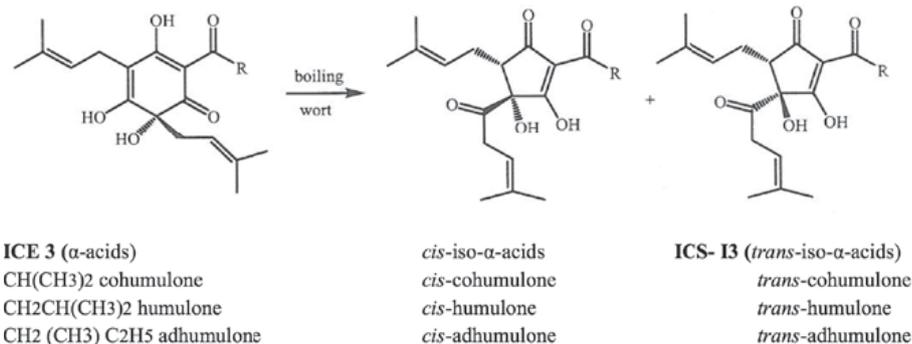


图1 在啤酒酿造过程中， α -酸类物质转变成异- α -酸类物质的过程

实验部分

分别称取一定量的ICE 3(a-酸类化合物)和ICS-I3 (异构化的a-酸类化合物)于10mL的容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 超声10min, 从而制备得到浓度为7.3 mg/mL的ICE和1.4 mg/mL的ICS-I3储备溶液。移取适量体积的储备溶液于10mL容量瓶中, 利用溶解样品的溶剂定容, 制备5个级别的标准工作溶液, ICE 3的浓度范围是23 μ g/mL至440 μ g/mL (23, 55, 110, 220, 440 μ g/mL)。两个较低浓度水平的溶液由前一级浓度水平的标准工作溶液1:1稀释制备。由7次重复测定440 μ g/mL浓度水平的标准工作溶液结果计算方法的重复性。

分别称取每个酒花样品约0.2g(German Spalt, American Cascade, American Summit, English Fuggle, NewZealand Nelson Sauvin)于10mL的容量瓶中, 加入约一半体积的样品溶剂, 使样品浸泡4小时, 每隔1小时振摇容量瓶。然后将上述样品溶液在冷水浴中超声15分钟, 最后定容至容量瓶的刻度, 充分混合后, 7000RPM离心10分钟。将样品的上清液分别转移至五个25mL容量瓶中, 静置。在每个样品的沉淀物中继续加入10mL溶剂, 剧烈振摇2分钟。后来制备的样品溶液同样7000RPM离心10分钟, 收集上层清液至上述不同样品的25mL容量瓶中, 并定容。制备的样品溶液经过0.2 μ m的尼龙过滤膜过滤, 待测。

通过液-液萃取(LLE)制备啤酒样品, 加入0.5mL磷酸和10mL三甲基戊烷于10mL经过脱气的美国产IPA牌啤酒样品中, 经过1分钟剧烈振摇后, 在冷水浴中超声15min, 制备的样品溶液2000RPM离心5分钟, 收集5mL的上层清液, 氮气吹干, 用2.0mL复溶残留物。

通过加标回收试验计算方法的准确度, 在10mL预先脱气的低含量啤酒花啤酒中加入一定体积的标准储备溶液, 使其浓度为440 μ g/mL, 与样品同样采用液-液萃取方法, 但是本次收集4mL的样品制备溶液, 氮气吹干, 4.0mL溶剂复溶。同样的, 所有样品在测定之前采用0.2 μ m的尼龙膜进行过滤。

色谱条件

自动进样器	Flexar™ FX UHPLC
设置:	50 μ L定量环及15 μ L的进样针, 部分定量环注射模式
进样体积:	4 μ L; 进样针清洗溶剂: 1:1甲醇/水
流速:	1 mL/min
UV检测器:	270nm
色谱柱:	Brownlee™ SPP C18, 100X3.5mm, 2.7 μ m, 25 °C, 货号: N9308410
等梯度洗脱:	35%流动相A: 0.1%磷酸, 0.2mmol/L EDTA 2NA 65%流动相B: 乙腈
样品溶剂:	8:2甲醇/0.1%三氟乙酸(TFA)的水溶液 (HPLC级的溶剂和ACS级的试剂)
软件:	Chromera™ version 3.0
样品速率:	5pts/s

结果与讨论

利用配有UV检测器的PerkinElmer® Flexar FX-15用作液相平台, 使用Brownlee™ SPP C18, 100X3.5mm, 2.7 μ m色谱柱进行分离, 优化流速为1.0mL/min, 此时压力适当, 接近3500PSI (241bars), 且运行时间为5分钟。浓度为440 μ g/mL的标准品重复7次进样, 获得了优越的重复性, %RSD数值在0.7-1.5之间。再者, 五个浓度范围的标准品平均%RSD<2.0%, 校准曲线的线性良好, $r^2 \geq 0.999$ 。LLE萃取技术测定IPA啤酒中的a-酸类物质结果良好, 平均准确度为95%。测定结果与啤酒花标签称值一致。方法的性能参数, 包括校正曲线、精密度、峰拖尾和分辨率, 见图2和表1所示。有代表性的色谱图, 包括标准物质、American Cascade酒花样品、New Zealand Nelson酒花样品、American IPA啤酒样品, 见图3,4,5, 6。啤酒花的分析结果见表2所示。

表1 方法性能参数

α -acids	Repeatability (n = 7)	Resolution	Tailing	Accuracy
t-isocohumulone	0.8	-	1.5	99%
t-isohumulone	0.7	6.8	1.4	99%
t-isoadhumulone	1.1	2.5	1.0	90%
cohumulone	1.1	5.8	1.1	92%
humulone	1.5	8.1	1.1	96%
adhumulone	1.1	2.3	1.0	96%
Average	1.1	-	1.2	95%

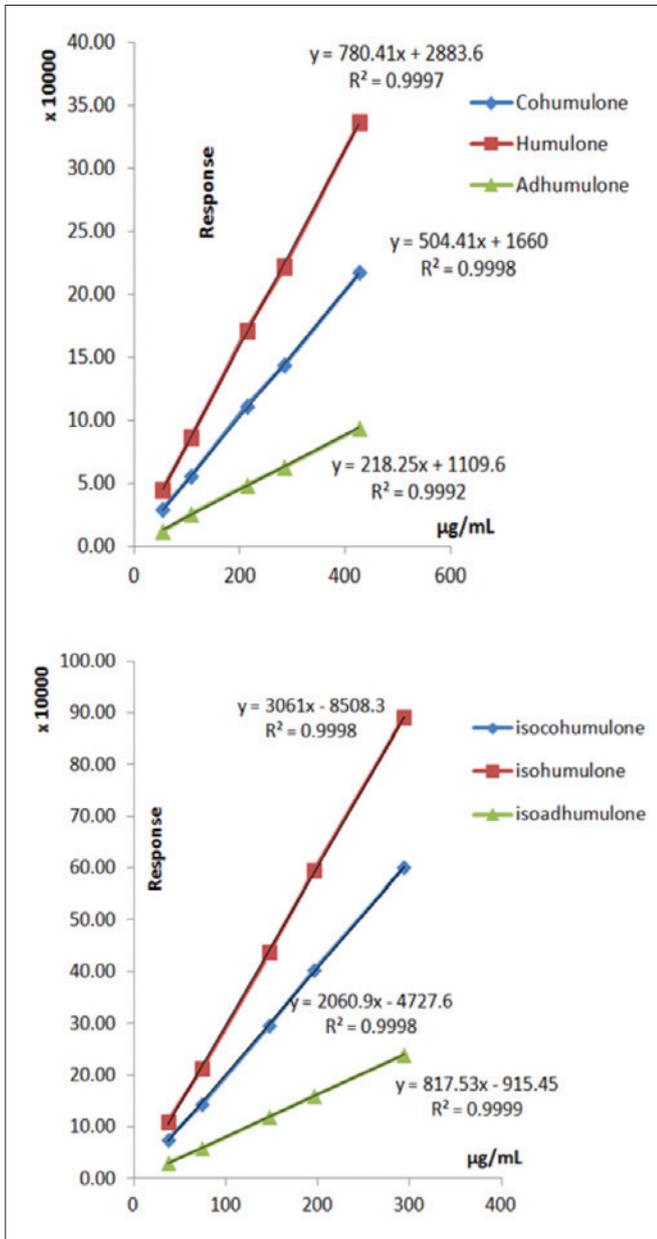


图2 校准曲线, 回归截距

表2 标签标称值及分析结果

Species of Hops	Analysis results	α -acids label claim	% of label claim
German Spalt	2.3%	2.6%	87%
American Cascade	4.9%	5.5%	90%
American Summit	16.6%	16.8%	99%
English Fuggle	3.4%	4.2%	81%
New Zealand Nelson	11.6%	12.0%	97%
Average	-	-	91%

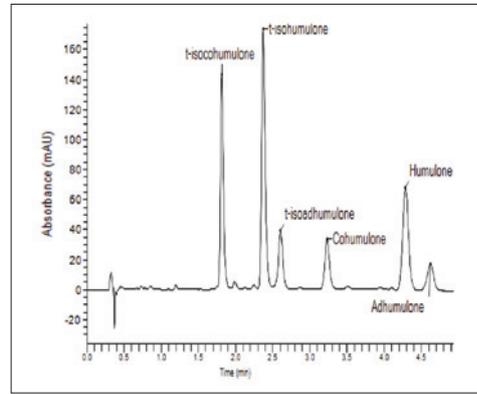


图3 ECE3, ICS-I3标准2的色谱图

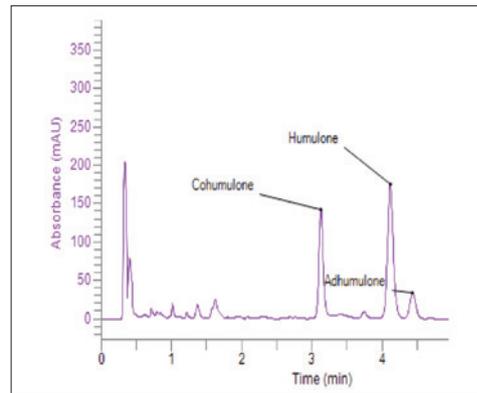


图4 American Cascade 酒花样品的色谱图

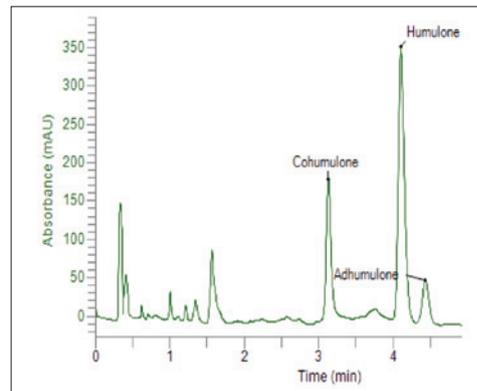


图5 New Zealand Nelson 酒花样品的色谱图

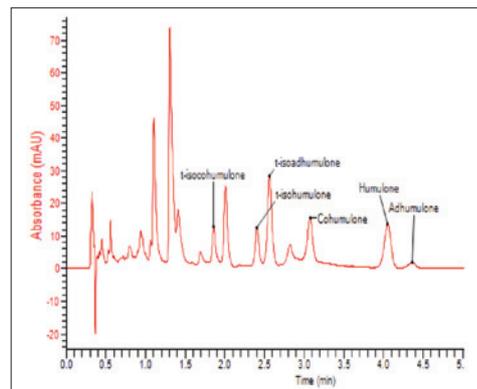


图6 American IPA啤酒样品的色谱图

结论

本应用文献中, 六种 α -酸类物质在5min之内分离完成, 两个连续峰的分辨率在2.3-8.1之间。本方法性能优越, 线性相关系数 (r^2) 不低于0.999, 精密度值 $\%RSD \leq 1.5$, 峰形尖锐, 对称性用拖尾因子表示, 数值 ≤ 1.5 。萃取技术非常有效, 平均回收率为95%。分析结果显示, 酒花中 α -酸类物质含量与标签标称值一致, IPA啤酒分析结果确证了异构化的 α -酸类物质存在。

PerkinElmer's FX-15 泵配有耐用性高的色谱泵及高可靠度的自动进样器, 该设计使进样具有高精密度, 表面多孔粒子Brownlee色谱柱, 其创新的结构减少了样品扩散, 从而实现快速分离, 峰形尖锐, 且压力适当。

参考文献

Enhance Quantitative Extraction and HPLC Determination of Hop and Beer Bitter acids. B. Jaskula, K. Goiris., G. De Rock, G. Alert, L. De Coonan: J. of The Institute of Brewing, 2007, Vol.113(4), 381-390.

PerkinElmer, Inc.

珀金埃尔默仪器(上海)有限公司

地址: 上海 张江高科技园区 张衡路1670号

邮编: 201203

电话: 021-60645888

传真: 021-60645999

www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表, 请访问<http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2012, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。