

D. Harms und F. Nitzsche

# Neue Wege der Bestimmung von Bitterstoffen in Bier und Würze

Die gleichzeitige HPLC Bestimmung von Iso- $\alpha$ -Säuren, Rho-iso- $\alpha$ -Säuren, Tetrahydro-iso- $\alpha$ -Säuren,  $\alpha$ -Säuren und  $\beta$ -Säuren ist ein wertvolles und verlässliches Werkzeug für die Analyse von Bierinhaltsstoffen. Mit einer einzigen Analyse ist der Gehalt an unmodifizierten und reduzierten Hopfenbitterstoffen möglich. Die verwendete basendesaktivierte, quervernetzte C18 Trennsäule mit einem citratgepuffertem (pH 7) Acetonitril Methanol Gradienten als mobile Phase ermöglicht die vollständige Trennung innerhalb von 60 Minuten. Eine zusätzlich erarbeitete isokratische Methode zur Bestimmung von Iso- $\alpha$ -Säuren und Isoxanthohumol in Bierproben läßt ein kostengünstigeres und einfach zu handhabendes Arbeiten zu. Die Probenvorbereitung wurde über eine C8 Festphasenkartusche (SPE) durchgeführt. Verschiedene Biere und Hopfenextrakte konnten mit diesen Methoden erfolgreich analysiert werden. Diese Methode ermöglicht die Identifikation verschiedener Bier- und Hopfencharakteristika hinsichtlich ihrer Säuren und den korrespondierenden Isomeren.

BC 32 Hopfen

(Deskriptoren: Bier, Analysenmethoden, Würze, Hopfenextrakt, Bitterstoffe, Hochdruckflüssigchromatographie, HPLC, Festphasenextraktion).

Descriptors: Beer, analysis methods, wort, hop extract, bitter substances, HPLC, solidphase extraction).

## 1 Einleitung

Mit den offiziellen Methoden der „American Society of Brewing Chemists (ASBC)“ und der „European Brewery Convention (EBC)“ oder anderen RP- Chromatographiemethoden ist eine Trennung der Iso- $\alpha$ -Säuren Isomeren nicht möglich (1, 2). Eine vollständige Trennung dieser Bitterstoffe ist aber unumgänglich, um bessere Informationen über die Veränderungen der einzelnen Verbindungen über den Produktionsprozeß zu erhalten.

Mit dieser Arbeit präsentieren wir HPLC Methoden für die verschiedenen Kombinationen von Iso- $\alpha$ -Säuren und -produkten.

Mit dieser Methode ist die Trennung der verschiedenen Iso- $\alpha$ -Säuren, Rho-iso- $\alpha$ -Säuren, Tetrahydro-iso- $\alpha$ -Säuren,  $\alpha$ -Säuren und  $\beta$ -Säuren in einem Chromatogramm und darüber hinaus zum ersten Mal die vollständige Trennung der Isomeren dieser Verbindungen möglich.

## 2 Experimenteller Teil

*Reagenzien:* Alle Reagenzien wurden von Fluka (Neu-Ulm, Germany) in der höchstmöglichen Reinheit geliefert, außer Methanol und Acetonitril (LiChroSolv Gradient grade), die von Merck (Darmstadt, Germany) kamen. Kristallines Dicyclohexylamine (DCHA) – Salz der Trans-Iso- $\alpha$ -Säuren wurde von der Versuchs-

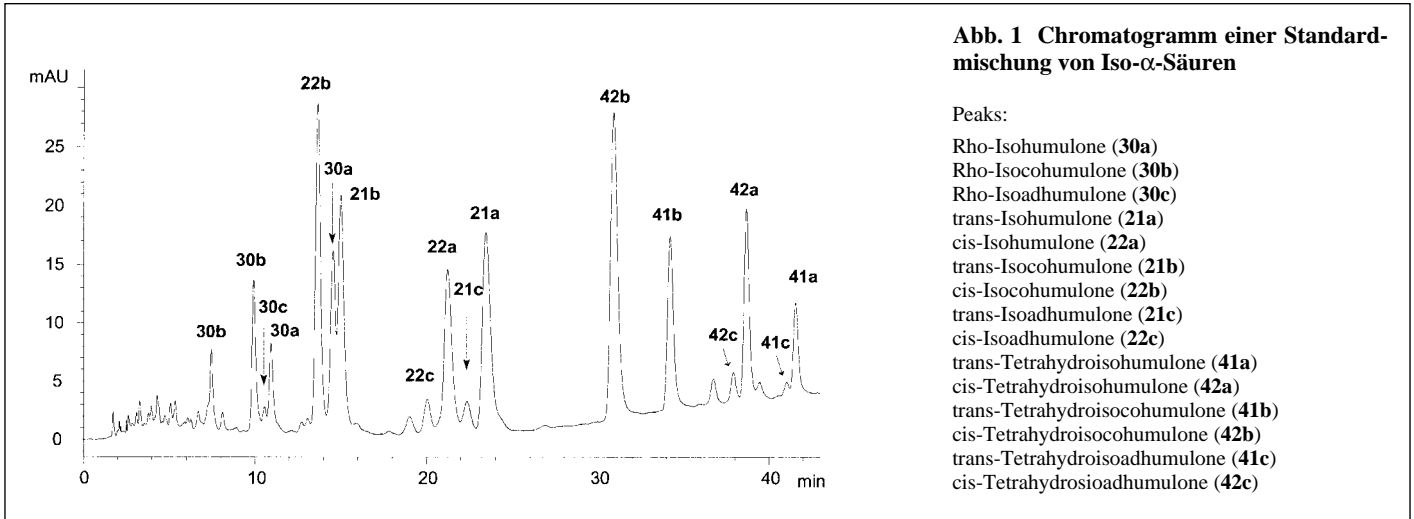
station Schweizerischer Brauereien (VSB, Zürich, Schweiz) geliefert. Das DCHA Salz enthielt 66,5%w Hopfenbitterstoffe. Mischungen von Tetrahydro-iso- $\alpha$ -Säuren und Rho-iso- $\alpha$ -Säuren wurden aus kommerziell erhältlichen Extrakten bereitet. Extrakte von Iso- $\alpha$ -Säuren und den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren kamen von Hopstabil GmbH (Wolnzach, Germany).

*HPLC Bedingungen:* Das HPLC System ist ein HP 1090 mit einem Diodenarray Detektor. Die Trennsäule von Macherey Nagel (ET 250/3 Nucleosil 100-5 C18 AB, Düren, Germany) wurde bei 40 °C gehalten. Die Detektorwellenlängen waren 275 nm für den Nachweis der Iso- $\alpha$ -Säuren und Tetrahydro-Iso- $\alpha$ -Säuren, 314 oder 290 nm für den Nachweis von Isoxanthohumulon und 314 nm für  $\alpha$ -Säuren und  $\beta$ -Säuren. Das Einspritzvolumen betrug 20  $\mu$ l. Für die vollständige Trennung wurde Mischung A ((Acetonitril: Methanol: Citratpuffer) 17:25:57 (v/v/v)) und Mischung B (Acetonitril: Citratpuffer 55:45 (v/v)) verwendet. Der 10 mmol Citratpuffer wurde auf pH 7 mit 50% NaOH-Lösung eingestellt und vor der Mischung mit organischen Lösungsmitteln filtriert. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 1 beschrieben.

**Tabelle 1 Mobile Phase Programm für die HPLC Methode**

| Zeit (min) | A (%) | B (%) |
|------------|-------|-------|
| 0          | 100   | 0     |
| 5          | 98    | 2     |
| 14         | 95    | 4     |
| 32         | 90    | 10    |
| 50         | 65    | 35    |
| 60         | 10    | 90    |
| 62         | 10    | 90    |
| 63         | 100   | 0     |
| 66         | 100   | 0     |

Die Flußrate betrug 0,55 ml/min für alle Methoden. Die isokratische Trennung der Iso- $\alpha$ -Säuren und Isoxanthohumol wurde mit einer mobilen Phase, bestehend aus Acetonitril: Methanol: Citratpuffer 17:21:62 (v/v/v), durchgeführt.



**2.1 Probenvorbereitung für die HPLC Analyse**

Eine C8 Festphasenkartusche der Firma Baker (Bakerbond spe 7087-60) wurde mit 5 ml Methanol gefolgt von 5 ml einer Mischung aus Methanol: Wasser: Phosphorsäure (85%) (60:40:0.1)(v/v/v) gewaschen. Eine 5 ml Probe des entgasten Bieres wurde über die SPE Säule gezogen. Anschließend wurde die SPE Säule mit 2 ml Wasser gewaschen. Die Säule wurde für 10 sec mit Luft getrocknet. Die Elution erfolgte mit einer Mischung aus Acetonitril : Methanol : Wasser : Phosphorsäure (85%) (50:40:10:0.1)(v/v/v) bis zu einer Marke von 2,0 ml in ein Glasgefäß. Nach Homogenisation wurden 10  $\mu$ l des Eluats chromatographisch untersucht.

**3 Ergebnisse und Diskussion**

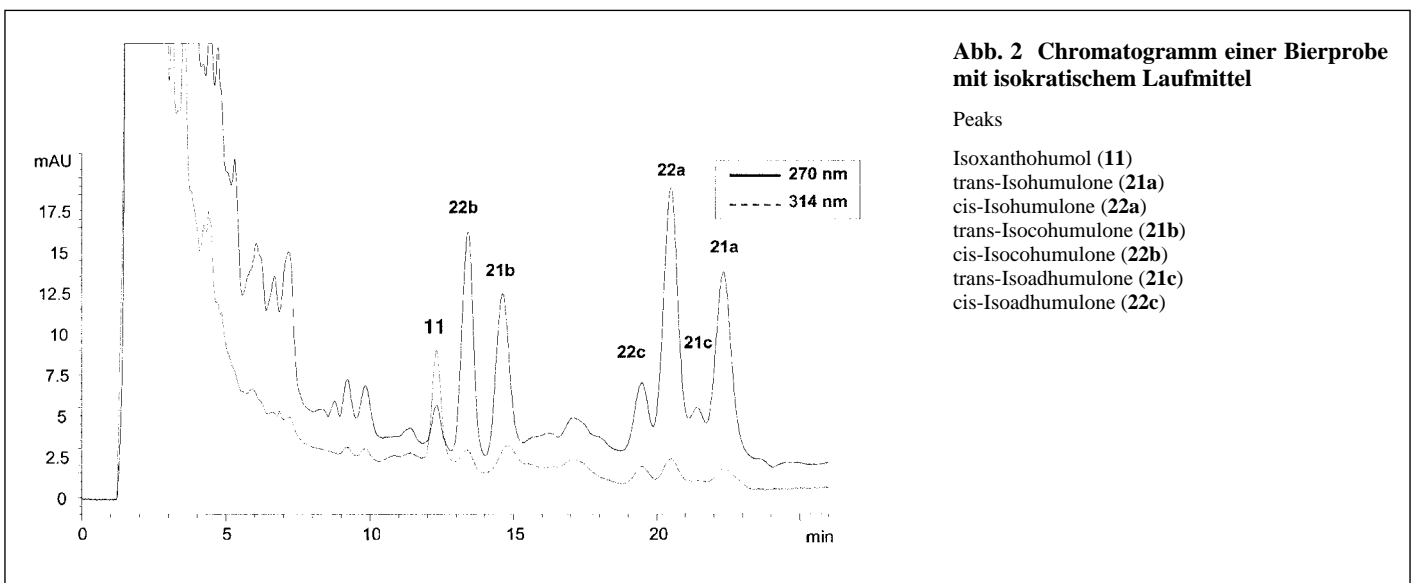
Wir fanden heraus, daß die Säule von Machery Nagel (C18 AB 250/3) mit einer basendesaktivierten, chemisch quervernetzten C18-Modifikation sich hervorragend für die Trennung der meisten Hopfensäuren und -produkte eignet. Eine Mischung von Acetonitril : Methanol : Wasser : Citratpuffer und bei einer Säulentemperatur von 40 °C erlaubt eine Trennung der Hauptbit-

terkomponenten in Hopfen, Würze und Bier. Ein Chromatogramm einer Mischung von Standards ist in Abbildung 1 zu sehen.

Als interessantes Detail der Untersuchungen stellte sich das Verhältnis von Acetonitril und Methanol in der HPLC-Elutionsmischung heraus. Eine Variation der Anteile führt zu einer Verschiebung des trans-Isoadhumulon Peaks. Ein höherer Gehalt an Methanol schiebt ihn von dem trans-Isohumulon hin zum cis-Isohumulon Peak.

Für Biere, die nur Iso- $\alpha$ -Säuren und Isoxanthohumol enthalten, war die Verwendung der isokratischen Methode möglich. Abbildung 2 zeigt ein typisches Chromatogramm einer Bierprobe, die Trennung wurde innerhalb von 30 Minuten erreicht.

Grundsätzlich wird die Isooktanextraktion zur Aufreinigung der Bierproben benutzt (2). Auch wenn diese Art der Probenvorbereitung nur ein geringes Hintergrundsignal liefert, hat diese Methode den Nachteil, hinsichtlich des Zeitbedarfs, der Arbeitszeit und des Anfalls an organischem Lösungsmittelabfall, hohe Kosten zu verursachen. Wir haben unterschiedliche SPE Materialien bezüglich ihrer Eignung als Ersatz für die Flüssig/Flüssig-Extraktion untersucht (C8-, C18-, Phenyl-, und Styroldivinylbenzol-Adsor-



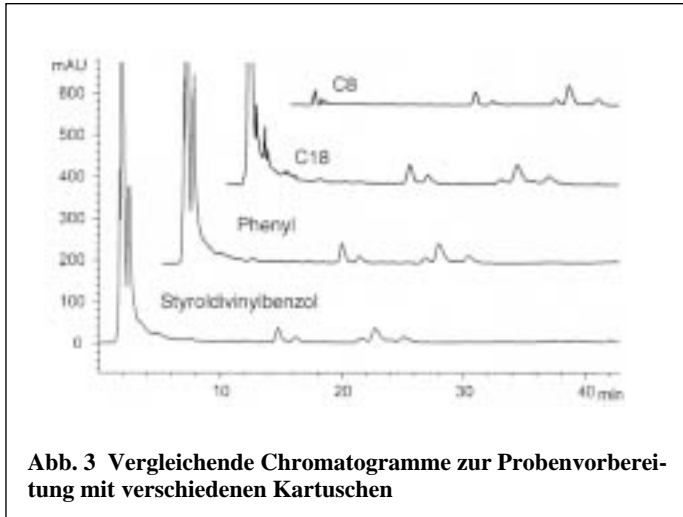


Abb. 3 Vergleichende Chromatogramme zur Probenvorbereitung mit verschiedenen Kartuschen

bentien). Mit einer C8 SPE Kartusche und einer Eluentenmischung aus Acetonitril : Methanol : Wasser : Phosphorsäure (85%) konnten die besten Resultate hinsichtlich der Wiederfindung und Schutz der HPLC Säule vor Verunreinigungen gefunden werden. In Abbildung 3 sind Chromatogramme der verschiedenen Probenvorbereitungen zu sehen.

Verschiedene Realproben wurden erfolgreich analysiert. Dabei konnten Biere gefunden werden, die modifizierte Hopfenbitterstoffe enthielten. Bei der Verwendung klarer Flaschen konnten Tetrahydro-iso- $\alpha$ -Säuren nachgewiesen werden, die zur Herstellung lichtstabiler Biere verwendet werden. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 4 dargestellt. Ein Chromatogramm eines Bieres, das Rho-iso- $\alpha$ -Säuren enthält, zeigt Abbildung 5.

#### 4 Summary

Harms, D., and Nitzsche, F.: New ways to determine bitter substances in beer and wort — Monatsschrift für Brauwissenschaft 53, No 7/8, 143 – 146, 2000

#### BC 12 Hops

The simultaneous HPLC determination of iso- $\alpha$  acids, tetrahydro-iso- $\alpha$  acids,  $\alpha$ -acids and  $\beta$ -acids is a valuable and reliable tool for the analysis of substances contained in beer. The content of unmodified and reduced bitter hop substances can be determined by means of just one single analysis. The used base-activated, cross-linked C18 separating column with a citrate-buffered (pH7) acetonitril methanol gradients as mobile phase makes complete separation possible within 60 minutes. An additionally developed isocratic method to determine iso- $\alpha$ -acids and isoxanthohumol in beer samples permits working at more favourable costs and easy handling. The specimens were prepared with a C8 fixed phase cartridge (SPE). Various beers and hop extracts could be successfully analysed by this method. This method makes identification of various beer and hop characteristics in respect of their acids and the corresponding isomers possible.

Harms, D., et Nitzsche, F.: Nouvelles voies pour la détermination des composés amers dans la bière et le moût — Monatsschrift für Brauwissenschaft 53, No 7/8, 143 – 146, 2000

#### BC 12 Houblon

La détermination simultanée par CLHP d'acides iso- $\alpha$ , d'acides rho-iso- $\alpha$ , d'acides tétrahydro-iso- $\alpha$ , d'acides  $\alpha$  et d'acides  $\beta$  est un outil précieux et sûr pour l'analyse de composés de la bière. Par une seule analyse il est possible de déterminer la teneur de composés amers du houblon non modifiés et réduits. La colonne de séparation utilisée est une C18 greffée,

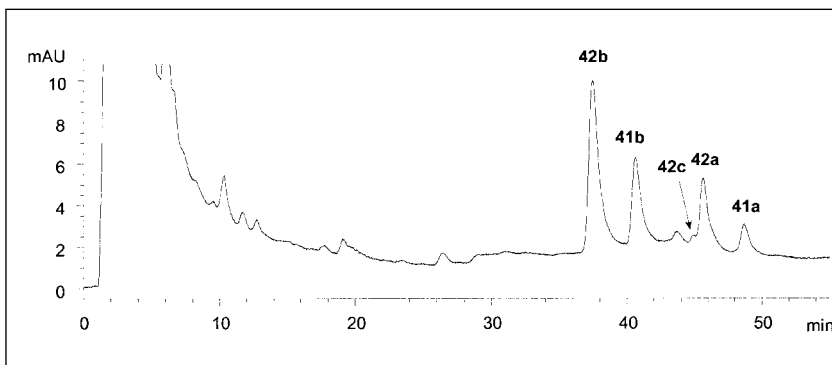


Abb. 4 Chromatogramm eines lichtstabilen Bieres mit Tetrahydro-iso- $\alpha$ -Säuren

Peaks:

- trans-Tetrahydroisohumulone (41a)
- cis-Tetrahydroisohumulone (42a)
- trans-Tetrahydroisocohumulone (41b)
- cis-Tetrahydroisocohumulone (42b)
- cis-Tetrahydroisoadhumulone (42c)

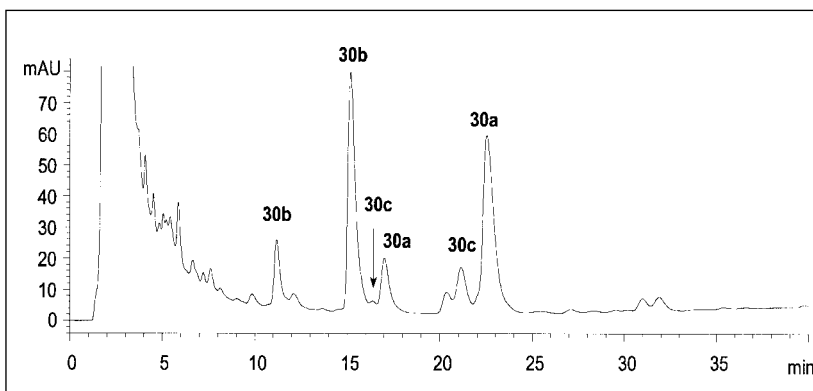


Abb. 5 Chromatogramm eines Bieres mit Rho-Iso- $\alpha$ -Säuren

Peaks:

- Rho-Isosohumulone (30a)
- Rho-Isocohumulone (30b)
- Rho-Isosohumulone (30c)

désactivée par une base. Le mélange éluant est constitué de tampon citrate (pH 7)/acétonitrile/méthanol utilisé en gradient qui permet une séparation complète en 60 minutes. Une méthode isocratique complémentaire, élaborée pour la détermination d'acides iso- $\alpha$  et d'isoxanthumulone dans les échantillons de bière, permet un travail à coûts plus favorables et plus simple. La préparation d'échantillons a été réalisée sur une cartouche C8 à phase solide (SPE). Différentes bières et extraits de houblon ont pu être analysés avec succès par cette méthode. Cette méthode permet une identification de différentes caractéristiques des bières et des houblons concernant leurs acides et les isomères correspondants.

**5 Literatur**

1. Burroughs, L. J., und Williams, P. D., vorgestellt als Poster auf dem 27. EBC Kongress, Cannes, Frankreich, 1999.
2. Benitez, J.L., Forster, A., De Keukeleire, D., Mair, M., Sharpe, F.R., Verhagen, L.C., and Westwood, K. T.: Hops and hop products, EBC, Manual of Good Practice 28 – 30, Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, 1997.
3. McMurrough, I., Lynch, M. V., Murray, F., Kearney, M., and Nitzsche F.: J. Am. Soc. Brew. Chem., **45**, 1, 6–14, 1987.  
(Manuskripteingang 4. 4. 2000)

**Fachwörterbuch  
der Brauerei- und  
Abfüllpraxis**

Englisch-Deutsch / Deutsch-Englisch  
4., überarbeitete und erweiterte Auflage

**A practical Dictionary  
of Brewing and  
Bottling**

English-German / German- English  
4<sup>th</sup> revised and enlarged Edition

**FACHVERLAG HANS CARL, Nürnberg**

**FACHWÖRTERBUCH  
DER BRAUEREI-  
UND ABFÜLLPRAXIS**  
Englisch-Deutsch /  
Deutsch-Englisch

Seit der ersten Auflage 1977 durch Dr. Tilmann Schmitt wurde dieses Standardwerk in zwei weiteren Ausgaben 1981 und 1989 durch Dr. Karl-Ullrich Heyse fortlaufend ergänzt und erweitert. In der nun vorliegenden vierten Auflage wurde die Anzahl der Fachbegriffe nochmals erheblich erweitert. Damit wurde der Anwendungsbereich dieser Übersetzungshilfe erheblich erweitert und den Erfordernissen der Technik angepaßt.

4. überarbeitete und erweiterte  
Auflage von Dr. Thomas Bühler  
VIII/344 Seiten, flexibel gebunden  
DM 98,- Bestell-Nr. 764 ..... Ex.

**FAX-BESTELLUNG: 0911 / 9 52 85-61**

**FACHVERLAG HANS CARL  
NÜRNBERG  
FACHBUCHHANDLUNG**

Andernacher Str. 33a 90411 Nürnberg  
Fax (0911) 9 52 85-61  
E-Mail: fachbuch@hanscarl.com  
Internet:www.hanscarl.com

|        |                      |
|--------|----------------------|
| _____  | _____                |
| Name   | Kunden-Nr.           |
| _____  | _____                |
| Firma  | USt.-Id.-Nr.         |
| _____  | _____                |
| Straße | PLZ/Ort              |
| _____  | _____                |
| Datum  | Stempel/Unterschrift |