

Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin

Část 2. Stanovení *cis/trans*- izomerů iso- α -hořkých kyselin v pivu metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie

New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials.

*Part 2. Determination of *cis/trans*- isomers -iso- α -acids in beer using Ultra Performance Liquid Chromatography*

JANA OLŠOVSKÁ, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Brewing and Malting PLC, Brewing Institute Prague, Lípová 15, CZ-120 44 Prague 2, Czech Republic*
e-mail: olsovska@beerresearch.cz

Olšovská, J. – Jurková, M. – Čejka, P.: Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 2. Stanovení *cis/trans*- izomerů iso- α -hořkých kyselin v pivu metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 4, s. 94–99.

Ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC), využívající principu separace na porézních částicích menších než 2 μ m, byla využita při separaci a stanovení prostorových forem iso- α -hořkých látek v pivu. Nová UHPLC metoda byla srovnána s metodou HPLC používanou pro tato stanovení ve VÚPS z hlediska rychlosti analýzy, účinnosti separace, spotřeby mobilní fáze a konečně byly porovnány opakovatelnosti obou metod. Výsledky studie potvrdily všechny očekávané výhody UHPLC, metoda je 2,5 krát rychlejší při zachování daného rozlišení a víc jak desetinásobně šetří spotřebu organických rozpouštědel. Kromě ekonomických výhod se tato nová metoda vyznačuje vysokou přesností. Ta byla ověřována pomocí opakovatelnosti UHPLC metody pro obě formy iso- α -hořkých kyselin. Zejména pro *trans*-iso-hořké kyseliny, které jsou významnými ukazateli stárnutí piva během jeho skladování nebo transportu, byla zjištěna lepší opakovatelnost UHPLC metody oproti HPLC.

Olšovská, J. – Jurková, M. – Čejka, P.: New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 2. Determination of *cis/trans*- isomers -iso- α -acids in beer using Ultra Performance Liquid Chromatography. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 4, p. 94–99.

The Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), which uses the principle of separation on sub-2 μ m particles, was tested for the separation and determination of steric forms of iso- α -acids in beer. The new UHPLC method was compared with the HPLC method, which is used for iso- α -acid determinations in RIBM. The comparison was performed with respect to the speed of analysis, separation efficiency, mobile phase consumption, and finally repeatability. The results of this study determined all the expected advantages of the UHPLC; while maintaining the resolution this method reduced analysis time 2.5 times compared to the previous HPLC. In addition, the UHPLC reduces the consumption of organic solvents 10 times. Apart from the economic benefits the UHPLC provides a high precision of the measurement, which was verified as repeatability of the UHPLC for both forms of iso- α -acids. Especially the *trans*-iso- α -isomers are significant indicators of beer aging during storage and transport. It was found that the repeatability of UHPLC for the *trans*-isomers is better than the repeatability of HPLC.

Olšovská, J. – Jurková, M. – Čejka, P.: Neue Trends in der Flüssigkeit-Chromatographie und ihre Anwendung in der Braurohstoffen- und in der Analyse des Bieres. Teil II. Die Bestimmung der *cis/trans*- Isomere von iso- α -Bittersäuren im Bier durch die Methode der Ultra-wirkenden Flüssigkeitschromatographie. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 4, S. 94–99.

Die Ultra-Wirkende Flüssigkeitschromatographie (UHPLC), die das Prinzip einer Separation auf den porösen Teilchen mit dem Durchmesser unter 2 μ m ausnützt, wurde bei der Separation und Bestimmung von Raumformen der iso- α -Bitterstoffen im Bier angewandt. Im Hinblick auf die Geschwindigkeit der Reaktion, die Separationsleistungsfähigkeit, Mobilphasenverbrauch wurde die neue UHPLC Methode mit der im Forschungsinstitut für Brauereien und Mälereien in Prag (VÚPS Praha) für gleiche Messen benutzte Methode HPLC verglichen und schließlich die Reproduzierbarkeit von beiden Methoden verglichen. Die experimentellen Ergebnisse haben alle voraussichtlichen Vorteile der neuen UHPLC Methode bestätigt mit folgendem Resultat, die Methode sei 2,5 schneller und Verbrauch an organischen Lösungen beträgt 10mal weniger. Neben den ökonomischen Beiträgen kann man als der weitere Vorteil betrachtet werden die höhere Genauigkeit der neuen Methoden, die durch die Messensreproduzierbarkeit der UHPLC für beide Formen der iso- α -Bittersäuren geprüft wurde. Insbesondere für die *trans*-iso-Bittersäuren, die eine bedeutenden Parameter der Älterung des Bieres binnen seines Transport und Lagerung sind, wurde eine bessere Reproduzierbarkeit der UHPLC Methode gegen die HPLC Methode gefunden.

Klíčová slova: UHPLC – ultraúčinná kapalinová chromatografie, HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UHPLC kolony, *cis/trans*-iso- α -hořké kyseliny

Keywords: UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography, HPLC – High Liquid Performance Liquid Chromatography, UHPLC columns, *cis/trans*-iso- α -acids

1 ÚVOD

Během varního procesu se formují iso- α -kyseliny ve dvou prostorových formách, *cis*- a *trans*-, v poměru 2:1 ve prospěch stabilnější *cis*-formy. Vlivem působení faktorů ovlivňujících proces stárnutí ubývá rychleji forma *trans*-, což se projevuje jednak snížením hořkosti piva, jednak tvorbou senzorycky nežádoucích látek. Proto se moderní technologické postupy, které hledají způsoby zpomalení stárnutí

1 INTRODUCTION

Iso- α -acids are formed during the brewing process in two steric forms, *cis*- and *trans*-, in a ratio of 2:1 in favor of the more stable *cis*-form. The factors influencing the beer aging process cause a faster decrease of the *trans*-form, which results in both a decrease of beer bitterness and the formation of sensory undesirable compounds. Therefore modern technology processes, which look for the ways of

piva, zaměřují právě na možnost zpomalit úbytek iso- α -kyselin (De Cooman et al., 2000).

Vývoji analytických metod pro stanovení *cis*- a *trans*- forem iso- α -kyselin je věnována pozornost nejen z hlediska jejich šetrné izolace z piva (SPE extrakce), ale také z hlediska jejich dokonalé separace a dostatečně citlivého stanovení v pivu metodami kapalinové chromatografie. V současné době jsou v pivovarství používány zejména metody klasické HPLC. Ale i do této oblasti začínají pronikat techniky rychlé chromatografie založené na separaci na kolonách s částicemi menšími než 2 μ m, neboli „sub-2- μ m“, jejichž účinnost se s rostoucí lineární průtokovou rychlostí prakticky nemění. Jestliže k separaci použijeme takové kolony, mluvíme pak o ultra účinné kapalinové chromatografii (UHPLC), jejíž základní principy byly popsány v čísle 2, 2012 tohoto časopisu. Pomocí UHPLC lze dosáhnout stejně dobré, často i lepší separace než v HPLC módu, ale v podstatně kratších časech. Vyšší zpětné tlaky, které jsou důsledkem jemného zrnění UHPLC kolon, umožňují zvládnout nově vyvinutá speciální čerpadla, dokonalá těsnost celého systému a s tím spojená řada nových technických prvků tvořící UHPLC systém. Kromě rychlosti separace je další výhodou UHPLC velmi nízká spotřeba rozpouštědel (až desetinásobná úspora oproti HPLC) a nízké nástríky vzorku na kolonu (1–2 μ l).

UHPLC byla využita při vývoji nové metody stanovení *cis*- a *trans*- izomerů iso- α -kyselin v pivu. Parametry separace byly srovnávány s klasickou HPLC metodou běžně užívanou ve VÚPS (Výzkumný ústav pivovarský a sladařský); kromě rychlosti analýzy a účinnosti separace byly srovnávány hodnoty opakovatelnosti (r_{95}) dosažených výsledků z obou metod.

Separace iso- α -kyselin a jejich izomerů obsažených v pivu se běžně provádí na reverzní C18 stacionární fázi, mobilní fáze je tvořena pufrům či kyselinou v kyselé pH oblasti a organickým modifikátorem acetonitrilem (ACN). S vývojem stacionárních fází odolných v široké oblasti pH, tedy i v oblasti alkalické, vznikají metody separace, které využívají i tuto oblast pH (Hofta et al., 2007). Dobrá selektivita těchto kolon umožňuje stanovení iso- α -kyselin, jejich oxidačních produktů a různých forem hydrogenovaných iso- α -kyselin současně v jedné analýze. Metoda stanovení obsahu *cis*- a *trans*- izomerů iso- α -kyselin za neutrálních či slabě zásaditých podmínek (Harms et Nitzsche, 2001) byla využita v práci při stanovení změn poměru *cis/trans* forem během skladování piva při různých teplotách (Straková et al., 2007). Je však nutno podotknout, že v alkalickém prostředí dochází k přeměně a tedy posunu rovnováhy z α -kyselin na iso- α -kyseliny (Basařová et al., 2010). Dosud nebylo zdokumentováno, v jaké míře může tato izomerizace ovlivnit výsledek analýzy při separaci těchto látek v alkalickém prostředí.

Pro účely naší studie byla proto zvolena původní varianta s hodnotou pH mobilní fáze v kyselé oblasti.

2 MATERIÁL A METODY

Pro porovnání obou metod UHPLC a HPLC pro stanovení izomerů *cis*- a *trans*- iso- α -kyselin byla vybrána tuzemská piva vykazující hořkost v rozsahu 25–34 mg/l celkového obsahu iso- α -kyselin. Iso- α -kyseliny byly z piva izolovány technikou SPE na extrakčních kolonách Phenomenex podle dříve popsaného postupu (Jurková et al., 2003).

V obou metodách byl použit jako externí standard mezinárodní kalibrační standard (ICS) dicyklohexylamin iso- α -kyselin s obsahem 62,3% iso- α -kyselin označený DCHA-Iso, ICS-I3.

Zásobní roztok kalibračního standardu byl připraven navážením 20 mg ICS – I3 s přesností na 0,1 mg a rozpustěním do 100 ml methanolu, gradient grade 99,8% (Merck), okyseleného kyselinou fosforečnou, p.a. (Merck), 0,5 : 1000 (v/v). Pro metodu HPLC byl zásobní roztok kalibračního standardu zředěn 10x, pro metodu UHPLC byl zředěn 20x, vždy okyseleným methanolem použitým pro zásobní kalibrační roztok.

Chromatografické podmínky HPLC

Separace byla provedena na koloně s reverzní fází (Alltima C18, 5 μ m, 150 x 4,6 mm, Alltech) s předkolonkou C18 (4 x 3 mm, Phenomenex), za použití lineárního gradientu dvousložkové mobilní fáze (A) a (B). Fáze (A) byla tvořena ultračistou vodou (Millipore) s obsahem max. 5 ppb organických látek, okyselenou kyselinou fosforečnou na hodnotu pH 2,7. Fáze (B) byla tvořena ACN, gradient grade \geq 99,9 % (Sigma Aldrich). Na počátku analýzy obsahovala mobilní fáze 52% ACN, během 30minutové analýzy se obsah acetonitrilu li-

slowing down beer aging, focus on the possibility how to reduce the drop in the concentration of iso- α -acids (De Cooman et al., 2000).

During the development of analytical methods for determination of *cis*-/*trans*-iso- α -acids, close attention is paid to the isolation of these compounds from beer (SPE extraction) and to the complete separation and sufficiently sensitive determination in the beer using the liquid chromatography methods. In the present, classical HPLC methods are used for the purpose. However, new chromatography techniques based on separation on columns packed with sub-2 μ m particles are being increasingly used in the analysis of beer. The efficiency of these columns does not change when the linear velocity increases. The chromatography employing these columns is called Ultra High Performance Chromatography (UHPLC). The principles of this method were described in issue 2, 2012 of the journal. An identical and often better separation can be achieved using UHPLC in comparison with HPLC; furthermore, the analysis time is significantly shorter. The higher backpressure, which is caused by extremely small particle size in UHPLC columns, has been overcome using special and newly developed pumps, absolute narrowness of the whole system, and a number of technical elements forming the new UHPLC system. Apart from the separation speed a further advantage of UHPLC is very low consumption of organic solvents (up to 10-fold lower compared to HPLC), and a very small injection volume (1–2 μ l).

The UHPLC was used for the development of a new method of *cis*- and *trans*-iso- α -acids determination in beer. The separation parameters were compared with the classical HPLC method, which is used in RIBM (Research Institute of Brewing and Malting). Besides comparing the speed of analysis and separation efficiency the values of repeatability (r_{95}) of the two methods were confronted.

The separation of iso- α -acids and their isomers in beer is usually performed on the reversed C18 stationary phase. The mobile phase is prepared as a buffer with acid pH or the aqueous solution of any acid. Acetonitrile (ACN) is usually used as organic modifier. The development of highly resistant stationary phases in a wide pH range reaching up to alkali values gives rise to new methods of separation using this pH range (Hofta et al., 2007). The good selectivity of these columns enables the simultaneous determination of iso-lfa-acids, their oxidative products, and different forms of hydrogenated iso- α -acids. The HPLC method of determination of *cis*- and *trans*- isomers of iso- α -acids under neutral or weak alkali conditions (Harms et Nitzsche, 2001) was used in the study concerning the *cis/trans*-ratio changes during beer storage under various temperature conditions. (Straková et al., 2007). However, it is necessary to note that alkali pH causes the transformation of α -acids to iso- α -acids and thus a shift in the equilibrium (Basařová et al., 2010). The dependence of isomerization on the analysis at alkaline pH has not yet been documented.

The original variant of mobile phase with acidic pH was chosen for the purpose of our study.

2 MATERIAL AND METHODS

Domestic beers with the bitterness ranging from 25 to 34 mg/l were chosen for comparing the efficiency of UHPLC and HPLC methods in the determination of *cis*- and *trans*-iso- α -acids. The iso- α -acids were isolated from the beer using the SPE technique on the extraction columns Phenomenex according to a previously described procedure (Jurkova et al., 2003).

The iso- α -acid dicyclohexylamine containing 62.3% of iso- α -acids and highlighted as DCHA-Iso, ICS-13, which is an international calibration standard (ICS), was used as an external standard for the calibration in both methods.

The stock solution of the calibration standard was prepared by dilution of ICS-13 (20 mg) weighed with the precision of 0.1 mg in 100 ml of gradient grade methanol (99.8%, Merck). Prior to the dilution, the methanol was acidified with phosphoric acid (p.a. Merck) in an acid-methanol ratio of 0.5 : 1000 (v/v). For HPLC and UHPLC, the calibration standard was diluted tenfold and twentyfold with acidified methanol, respectively.

HPLC chromatographic conditions

The separation was performed on a reversed phase column (Alltima C18, 5 μ m, 150 x 4.6 mm, Alltech) protected by a C18 pre-column (4 x 3 mm, Phenomenex). The linear gradient was applied and two-component mobile phase (A) and (B) was used. Phase (A) with pH 2.7 was prepared from ultrapure water (Millipore) with a maximum

neárně zvýšil na 67%. Ekvilibrační čas po skončení separace byl 10 minut. Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min, teplota kolony byla 40 °C. Analyty byly detekovány v UV oblasti při 275 nm. Objem nástřiku na kolonu byl 10 µl.

K analýze byl použit kapalinový chromatograf SpectraSYSTEM (TSP, USA) s detektorem PDA. Sběr dat a vyhodnocení bylo provedeno chromatografickým softwarem ChromQuest pro Windows NT.

Chromatografické podmínky UHPLC

- UHPLC analýzy byly provedeny na koloně BEH C18 (2.1 x 50 mm I.D., velikost částic 1.7 µm), Waters, teplota kolony byla 40 °C, průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. K detekci byl použit UV detektor s diodovým polem (PDA), vyhodnocení bylo provedeno při vlnové délce 275 nm. Dvousložková mobilní fáze byla tvořena vodným roztokem (ultračistá voda, Millipore) kyselin nebo pufrů tak, aby se hodnoty pH mobilní fáze pohybovaly v rozmezí 1,6 až 3,08 (A) a acetonitrilem (B). V průběhu optimalizace metody byly použity následující mobilní fáze: TFA, pH 1,6 (0,1% TFA obj., připravena přidáním 100 µl koncentrované TFA; 99,95% ULC/MS, Biosolve, Netherlands) do 100 ml ultračisté vody;
- TFA, pH 2,7 (0,01% TFA obj. připravena přidáním 10 µl koncentrované TFA; 99,95% ULC/MS, Biosolve, Netherlands) do 100 ml ultračisté vody; použitím této mobilní fáze bylo dosaženo nejlepší separace, proto byla vybrána jako optimální (viz sekce „3. Výsledky a diskuse“);
- Mravenčan amonný, 5 mM, pH 3,08 (připraven titrací 5 mM kyseliny mravenčí 99%, Merck, Německo, vodným roztokem hydroxidu amonného 29%, A. C. S. reagent Sigma–Aldrich, Německo, do požadovaného pH 3,08).

Gradientová eluce byla optimalizována s ohledem na minimální čas analýzy a dosažení maximálního rozlišení stanovovaných látek. Gradient s počátkem 48% fáze (B) lineárně vzrůstal do 55% (B) za 11 minut. Následoval 2minutový isokratický krok při obsahu 55% (B) a 3minutový ekvilibrační krok při počátečních podmínkách 48% (B). Objem nástřiku na kolonu byl 2 µl.

UHPLC analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Acquity UPLC™ (Waters) s 2996 PDA detektorem operujícím v rozmezí vlnových délek od 194 do 600 nm. Data byla vyhodnocována softwarem Empower 2 (Waters). Chromatogramy k interpretaci byly extrahovány při vlnové délce 275 nm, sample rate byl nastaven na hodnotu 20 pts s⁻¹ a filtrační konstanta na hodnotu 0.5.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Na obr. 1 je uveden UHPLC chromatogram rozdělených izomerů iso- α -kyselin, na obr. 2 je pro srovnání uveden HPLC chromatogram, oba chromatogramy byly naměřeny za optimálních podmínek uvedených v kapitole 2 pro dané metody. Chromatogram potvrzuje tvrzení, že UHPLC metoda je rychlejší, v tomto případě 2,5 krát při porovnání celkového času analýzy. V případě UHPLC má poslední elující pik *cis*-iso-ad-humulonu retenční čas 4,9 min, celá délka analýzy včetně vymývacího kroku je 13 min, ekvilibrace byla 3 min, celkem tedy 16 min. V případě HPLC analýzy eluoval poslední stanovovaný pik *cis*-iso-ad-humulonu ve 12. minutě, celková analýza trvala 30 min, ekvilibrační krok 10 min, celkem tedy 40 min. V obou případech pokračuje gradient i po eluci iso-sloučenin z důvodu elujících zbytkových α - a β -kyselin, jejichž retence je vyšší než retence iso- α -kyselin. Jestliže stanovení α - a β -kyselin není požadováno (zkrácená verze metody), lze gradient zkrátit zařazením rychlého vymývacího kroku s vysokým procentem organické fáze po 5. minutě v UHPLC a po 12. minutě v HPLC módu (viz obr. 1 a 2). Bez tohoto vymývacího kroku by se α - a β -kyseliny na koloně hromadily a postupně interferovaly v následných měřeních. V takovém případě se ukazuje, jak markantní je rozdíl mezi oběma metodami nejen v časové prodlevě, ale i v celkové spotřebě organického rozpouštědla. Ta činí v hrubém odhadu při celém gradientu 32 ml/10 vzorků v módu UHPLC a 360 ml/10 vzorků v módu HPLC. To potvrzuje více jak 10násobnou úsporu organických rozpouštědel, kterou jsme avizovali v předchozím článku.

Při převodu metody HPLC na UHPLC a její optimalizaci bylo zjištěno, že jsou retenční časy studovaných látek, izomerů iso- α -kyselin, výrazně ovlivňovány pH mobilní fáze. I malé změny pH ve sledovaném intervalu pH (1,6 až 3,08) se projeví velkým posunem retencí při shodném gradientu organického modifikátoru. Při pH 2,7 (0,01% TFA) bylo dosaženo velmi dobré separace iso- α -kyselin v módu UHPLC, kdy retenční čas posledního elujícího píku iso-

organic compound content of 5 ppb, and phosphoric acid. Phase (B) was gradient grade acetonitrile ($\geq 99.9\%$, Sigma Aldrich). The linear gradient started with 52% of ACN, the content of ACN linearly increasing within 30 min to the final concentration of 67%. The equilibration time was 10 minutes. The flow rate was 1.5 ml/min and the column temperature was 40 °C. The analytes were detected in the UV area at 275 nm. The injection volume was 10 µl.

The SpectraSYSTEM (TSP, USA) liquid chromatograph with PDA detector was used for the analysis. The data collection and data processing was carried out with the ChromQuest software for Windows NT.

UHPLC chromatographic conditions

- UHPLC analyses were performed on the BEH C18 column (2.1 x 50 mm I.D., 1.7 µm), Waters, the column temperature was 40 °C and the mobile phase flow was 0.4 ml/min. The diode array detector (PDA) was used for detection; analytes were detected at 275 nm. The two-component mobile phase was composed of acetonitrile (B) and aqueous solution of acids or buffers (ultrapure water, Millipore) with pH ranging from 1.6 to 3.08 (A). During the optimization the following mobile phase (A) were tested:
- TFA, pH 1.6 (0.1% vol., prepared as a solution of 100 µl TFA, 99.95% ULC/MS, Biosolve, Netherlands) in 100 ml of ultrapure water;
- TFA, pH 2.7 (0.01% TFA vol., prepared as a solution of 10 µl, 99.95% ULC/MS, Biosolve, Netherlands) in 100 ml of ultrapure water; using of this conditions was achieved the best separation, thus, this phase was finally chosen as optimal (see section “3. Results and Discussion”);

Ammonium formate, 5 mM, pH 3.08 (prepared using titration of 5 mM formic acid (99%, Merck, Germany) with aqueous solution of ammonium hydroxide, 29%, A.C.S. reagent, Sigma Aldrich, Germany to the final pH of 3.08).

The gradient elution was optimized in terms of the minimal analysis time and maximal resolution of determined compounds. The final gradient conditions were as follows: the gradient started at 48% of phase (B) and grew linearly up to 55% (B) within 11 min. The subsequent isocratic step at 55% (B) and equilibration step starting at final condition of 48% (B) were 2 min and 3 min, respectively. The injection volume was 2 µl.

UHPLC analyses were performed on Acquity UPLC™ (Waters) chromatograph with the 2996 PDA detector operating in the range from 194 to 600 nm. Data were processed with Empower 2 software (Waters). Chromatograms were extracted at 275 nm before interpretation, data sample rate was set at 20 pts/s and filter constant was 0.5.

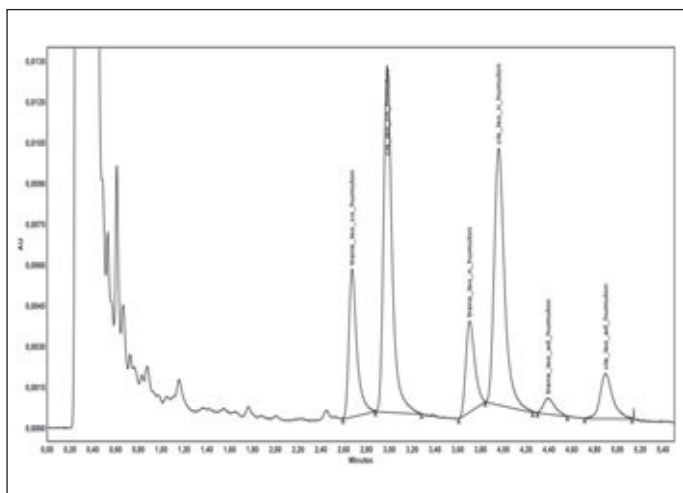
3 RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of UHPLC and HPLC chromatograms of separated iso- α -acids isomers is given in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. Both chromatograms were measured under optimal UHPLC and HPLC conditions described in Materials and Methods. Fig. 1 confirms that the UHPLC method is faster than HPLC; the analysis time was reduced 2.5 times in comparison with HPLC method. In the UHPLC, the last eluting peak of *cis*-iso-ad-humulone had the retention time of 4.9 min, the total analysis time including the wash step was 13 min, and equilibration step was 3 min. Thus, the total analysis time was 16 min. In the HPLC, the last eluting peak of *cis*-iso-ad-humulone eluted at 12 min, the gradient wash step lasted 30 min, and the equilibration step was 10 min, the total HPLC analysis time being thus 40 min. In both events, the gradient is continuing also after elution of *cis*-iso-ad-humulone because residual α - and β -acids can elute even later. If the detection of α - and β -acids is not required (reduced method version) then it is possible to reduce the gradient by implementing a fast wash step with a high content of organic modifier after 5th and 12th min in UHPLC and HPLC mode, respectively (see Fig. 1 and 2). If the wash step is not included or if it is not sufficient, the residual α - and β -acids can accumulate on the column and can subsequently interfere in the following analyses. The comparison revealed a noticeable difference between the two methods. Apart from the marked difference in the time of analysis a huge difference in the consumption of organic solvents is evident. While the ACN consumption under our experimental conditions in the UHPLC mode is 32 ml per 10 samples, in the HPLC mode it is 360 ml per 10 samples, i.e. ten times more.

Obr. 1 UHPLC chromatogram reálného vzorku piva / Fig. 1 UHPLC chromatogram of real beer sample

Eluce prostorových izomerů iso-kyselin v pořadí: *trans*-iso-co-humulon (2,7 min), *cis*-iso-co-humulon (3,0 min), *trans*-iso-n-humulon (3,7 min), *cis*-iso-n-humulon (4,0 min), *trans*-iso-ad-humulon (4,4 min), *cis*-iso-ad-humulon (4,9 min).

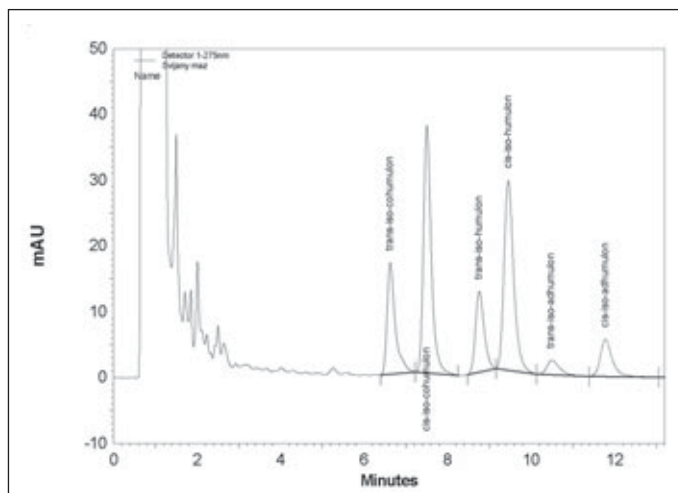
Elution of steric iso-acid isomers in the order: *trans*-iso-co-humulone (2.7 min), *cis*-iso-co-humulone (3.0 min), *trans*-iso-n-humulone (3.7 min), *cis*-iso-n-humulone (4.0 min), *trans*-iso-ad-humulone (4.4 min), *cis*-iso-ad-humulone (4.9 min).



Obr. 2 HPLC chromatogram reálného vzorku piva / Fig. 2 HPLC chromatogram of real beer sample

Eluce prostorových izomerů iso-kyselin v pořadí: *trans*-iso-co-humulon (6,6 min), *cis*-iso-co-humulon (7,5 min), *trans*-iso-n-humulon (8,8 min), *cis*-iso-n-humulon (9,4 min), *trans*-iso-ad-humulon (10,5 min), *cis*-iso-ad-humulon (11,8 min).

Elution of steric iso-acid isomers in the order: *trans*-iso-co-humulone (6.6 min), *cis*-iso-co-humulone (7.5 min), *trans*-iso-n-humulone (8.8 min), *cis*-iso-n-humulone (9.4 min), *trans*-iso-ad-humulone (10.5 min), *cis*-iso-ad-humulone (11.8 min).



látky (*cis*-iso-ad-humulon) byl 4,9 min. Toto pH bylo zvoleno jako optimální i vzhledem k jeho použití k separaci iso- α -kyselin v HPLC módu, kdy retenční čas tohoto píku je 12 min. Snížení pH na hodnotu 1,6 (0,1% TFA) vedlo k téměř čtyřnásobnému prodloužení retenčních časů. Poslední elující pík *cis*-iso-ad-humulon měl retenční čas 19 min a navíc píky *trans*-iso-ad-humulonu a *cis*-iso-n-humulonu nebyly rozdělené. Naopak zvýšení pH na hodnotu 3,08 (5mM mravenčan amonný) se projevilo výrazným zkrácením retenčních časů. Všechny izomery iso- α -kyselin eluovaly v rozmezí 1. a 2. minuty, izomerní formy *trans*- a *cis*- však nebyly ani u jedné z kyselin od sebe rozděleny.

Při testování vhodných aditiv do vodné mobilní fáze byly srovnávány TFA, kyselina mravenčí a kyselina fosforečná. Kyselina fosforečná je běžně používaná v původní HPLC metodice. Ukázalo se však, že tato kyselina není vhodná v UHPLC módu, neboť píky eluovaných látek byly značně deformované. Nejlepších separačních parametrů bylo dosaženo za použití TFA, proto byla zvolena jako optimální aditivum. Při optimalizaci gradientu bylo nutné snížit počáteční procento organické fáze na 48 %, neboť při stejném procentu jako v HPLC (52 %) dochází v UHPLC k rychlé eluci nedostatečně separovaných iso-látek. Toto sledování opět koreluje s teorií UHPLC, kdy separované látky procházejí UHPLC kolonou za mnohem vyššího tlaku (až pětinašobného) než v případě HPLC. V gradientu byla upravena také hodnota konečného procenta organického modifikátoru, místo původních 67 % stačilo k separaci látek 55 % ACN. Konečně i doba lineárního gradientu byla zredukována z 30 na 11 min.

Posledním krokem byla optimalizace nástřiku. Jestliže se v HPLC používá chromatografická kolona o rozměrech 150 x 4,6 mm a metoda UHPLC využívá kolony s mnohem menším vnitřním objemem, tj. s rozměry 50 x 2,1 mm, musí dojít zákonitě při převodu metody ke zmenšení dávkovaného objemu. Při nástřicích vyšších než 2 μ l docházelo k přetížení UHPLC kolony, které se projevilo rozštěpením píků. Při dávkování objemu 2 μ l bylo dosaženo optimálního rozdělení všech stanovovaných látek s vyhovující citlivostí, která odpovídala kvantifikačním limitům dané metody. Nově optimalizovaná UHPLC metoda byla srovnána se stávající HPLC metodou z hlediska opakovatelnosti. Ta byla zjištěna z hodnot koncentrací izomerů iso- α -kyselin ve 4 reálných vzorcích pív u obou metod, každý vzorek byl měřen dvakrát. Vyhodnocení bylo provedeno na základě změřených ploch píků odpovídajících *trans*- a *cis*- formám iso-co-humulonu, iso-ad-humulonu a iso-n-humulonu. Výsledky stanovení a hodnoty opakovatelnosti pro jednotlivé formy *cis*- a *trans*- iso- α -kyselin a pro celkové

The transformation of the HPLC method to the UHPLC and its optimization revealed a strong dependence of the retention time of studied compounds, iso- α -acids, on the mobile phase pH. Even small changes in the monitored pH range (from 1.6 to 3.08) give rise to a significant shift of the retention under the maintenance of the organic modifier gradient. A very good separation was achieved in UHPLC mode at pH 2.7, when the retention time of the last eluting peak belonging to iso- α -acid (*cis*-iso-ad-humulone) was 4.9 min. This pH proved as optimal even for usage in HPLC mode, where the retention time of this peak is 12 min. When the pH was decreased to 1.6 (0.1% TFA) the retention times were extended four times and the last determined peak of *cis*-iso-ad-humulone eluted at 19th min. Additionally, the peaks of *trans*-iso-ad-humulone and *cis*-iso-n-humulone were not separated. On the contrary, when the pH was increased to 3.08 (5mM ammonium formate) the retention times were noticeably reduced. All iso- α -isomers eluted in the range from 1 to 2 min, but isomeric forms *cis*- and *trans*- of any acids were not separated.

TFA, formic acid, and phosphoric acid were tested as potential additives to the aqueous part of the mobile phase. Phosphoric acid is commonly used in the original HPLC method. However, this acid was found to be unsuitable in the UHPLC mode, because all the peaks were considerably deformed. Finally, TFA proved to be the optimal additive because its usage showed the best separation parameters. During the gradient optimization it was necessary to decrease the initial content of organic modifier to 48%, because the use of the same percentage of ACN as in HPLC (52%) caused fast peak elution with insufficient separation. This observation is in correlation with the UHPLC theory according to which the analytes pass through the column under much higher pressure (up to five times) compared to HPLC. The final content of ACN in the gradient was also changed, the percentage of 55 % being sufficient for good and fast separation instead of the original 67 %. Finally, the time of duration of the linear gradient was also reduced, specifically from 30 to 11 min.

The last step was the optimization of the injection volume. Regarding the different column dimension of 150 x 4.6 mm and 50 x 2.1 mm in HPLC and UHPLC, respectively, the injection volume should be reduced during the method transfer. Injection volume higher than 2 μ l caused overloading of UHPLC column, which appeared in the peak splitting. When 2 μ l of the sample was loaded on the column it ensured a very good separation of all determined compounds with convenient sensitivity which was in accordance with the quantification limits of the method.

koncentrace iso- α -kyselin v obou systémech HPLC i UHPLC jsou uvedeny v tab. 1 a 2. Opakovatelnost r_{95} byla vypočítána podle vzorce $r_{95} = s_r \times 2,8$, kde s_r je směrodatná odchylka vypočítaná pro různé, ale podobné vzorky měřené za podmínek opakovatelnosti:

$$s_r^2 = \sum D_i^2 / 2n, \text{ kde } D_i \text{ je rozpětí hodnot dvou stanovení.}$$

Metoda UHPLC poskytuje lepší nebo srovnatelnou opakovatelnost s metodou HPLC pro všechny *cis*- a *trans*- formy iso- α -kyselin s výjimkou *cis*-formy co-humulonu a n-humulonu, který je s lepší opakovatelností měřen metodou HPLC. Tento jev lze přisuzovat lepší geometrii většiny píků při UHPLC separaci, která se projevuje v přesnější integraci a tím i kvantifikaci.

Dále lze konstatovat, že metoda UHPLC je schopna poskytnout výsledky s menším rozptylem a je tedy přesnější v určení koncentrací *trans*- forem, které jsou považovány za jeden z indikátorů vypovídajících o stabilitě nebo stárnutí piva během jeho skladování nebo transportu.

The repeatability of the new UHPLC method was compared with the original HPLC method and was calculated from the values of the iso- α -concentration values in 4 real beer samples, every sample was measured in duplicate. The evaluation was carried out from the peak areas of both *trans*- and *cis*- forms of iso-co-humulone, iso-ad-humulone, and iso-n-humulone. The results of individual concentrations and repeatability values of all studied isomers in both UHPLC and HPLC systems are given in Tab. 1 and 2. The repeatability r_{95} was calculated according to the formula $r_{95} = s_r \times 2,8$, where s_r is standard deviation calculated for various, but similar, samples measured under the conditions of repeatability:

$$s_r^2 = \sum D_i^2 / 2n, \text{ where } D_i \text{ is the range of values from two determinations.}$$

The UHPLC method affords a comparable or even better repeatability compared to the HPLC for the all *cis*- and *trans*-iso- α -acids with the exception of *cis*-isomers of co-humulone and n-humulone. This could be probably caused by better geometry of UHPLC peaks leading to better peak integration and thus, better quantification.

Tab. 1 Stanovení *cis*- a *trans*- forem iso- α -kyselin metodou HPLC / Determination of *cis*- and *trans*- forms of iso- α -acids using the HPLC method

vzorek / sample	co-humulon / co-humulone		n-humulon / n-humulone		ad-humulon / ad-humulone	
	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -
1a	2.5	5.83	3.54	10.29	0.74	2.22
1b	2.47	5.82	3.68	10.54	0.59	2.38
rozpětí D1 / range D1	0.03	0.01	0.14	0.25	0.15	0.16
2a	2.6	5.59	3.82	10.28	0.85	2.7
2b	2.72	5.64	3.91	10.27	0.92	2.44
rozpětí D2 / range D2	0.12	0.05	0.09	0.01	0.07	0.26
3a	4.96	10.43	3.79	9.87	1.03	2.45
3b	4.87	10.28	3.75	9.87	1.05	2.37
rozpětí D3 / range D3	0.09	0.15	0.04	0	0.02	0.08
4a	2.27	5.05	2.8	8.45	0.83	2.41
4b	2.19	5.1	2.82	8.37	0.85	2.4
rozpětí D4 / range D4	0.08	0.05	0.02	0.08	0.02	0.01
s_r^2	0.00373	0.00345	0.00371	0.00863	0.00353	0.01246
s_r	0.06103	0.05874	0.06093	0.09287	0.05937	0.11164
opakovatelnost / repeatability	0.17	0.16	0.17	0.26	0.17	0.31

Tab. 2 Stanovení *cis*- a *trans*- forem iso- α -kyselin metodou UHPLC / Determination of *cis*- and *trans*- forms of iso- α -acids using the UHPLC method

vzorek / sample	co-humulon / co-humulone		n-humulon / n-humulone		ad-humulon / ad-humulone	
	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -
1a	2.11	6.5	3.08	11.61	0.66	2.25
1b	2.09	6.41	3.07	11.5	0.59	2.28
rozpětí D1 / range D1	0.02	0.09	0.01	0.11	0.07	0.03
2a	2.15	6.22	3.25	11.11	0.69	2.45
2b	2.15	6.22	3.25	11.03	0.66	2.42
rozpětí D2 / range D2	0	0	0	0.08	0.03	0.03
3a	4.91	12.18	3.38	11.04	0.76	2.37
3b	4.84	11.86	3.28	10.77	0.77	2.34
rozpětí D3 / range D3	0.07	0.32	0.1	0.27	0.01	0.03
4a	1.75	5.31	2.15	9.15	0.64	2.27
4b	1.73	5.3	2.15	9.05	0.6	2.19
rozpětí D4 / range D4	0.02	0.01	0	0.1	0.04	0.08
s_r^2	0.00071	0.01383	0.00126	0.01267	0.00094	0.00114
s_r	0.02669	0.11758	0.03553	0.11258	0.03062	0.03373
opakovatelnost / repeatability	0.07	0.33	0.10	0.32	0.09	0.09

Tab. 3 Srovnání parametrů metod UHPLC a HPLC / Comparison of UPLC and HPLC method parameters

	UHPLC	HPLC
Kolona / Column	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	Altima C18, Alltech (150 x 3.9 mm, 5 µm)
Průtok / Flow Rate (ml.min ⁻¹)	0.4	1.5
Objem nástřiku / Injection Volume (µl)	2	10
Celková doba analýzy / Total analysis time (min)	16	40
Mobilní fáze A / Mobile phase A	TFA (pH 2.7)	H ₃ PO ₄ (pH 2.7)
Mobilní fáze B / Mobile phase B	ACN	ACN
Lineární gradient / Linear Gradient	48 %–55 % během 11 min / within 11 min	52 %–67 % během 30 min / within 30 min
Spotřeba ACN / ACN Consumption	32 ml na 10 vzorků / per 10 samples	360 ml na 10 vzorků / per 10 samples

Tab. 3 sumarizuje popsané rozdíly a výhody nové UHPLC metody ve srovnání s původní HPLC.

4 ZÁVĚR

Nová generace kapalinové chromatografie UHPLC založená na vyspělejší přístrojové technice je přínosem nejen ekonomickým (kratší doba analýz s malými spotřebami rozpouštědel), ale také posouvá pivovarskou analytiku do oblasti přesnějšího měření s menším rozptylem výsledků, jak bylo v této studii demonstrováno na příkladu stanovení prostorových izomerů iso- α -kyselin.

Poděkování

Tato práce je součástí Výzkumného záměru MSM6019369701. Autoři děkují firmě Waters za laskavé zapůjčení kapalinového chromatografu Acquity UPLC™.

Furthermore, it could be established that the use of the UHPLC method results in a smaller variance and thus a more accurate concentration determination of *trans*- forms, which are considered as an indicator of beer stability or beer ageing during storage or transport.

The Tab. 3 summarizes described differences and advantages of newly developed UHPLC method comparing the original HPLC method.

4 CONCLUSION

The new generation of UHPLC liquid chromatography based on more advanced instrumental technique is not only more economical (reduced analysis time with low consumption of solvents) but it also shifts the analysis of beer to the area with more accurate measurement and lower variance of results, which was demonstrated in this study on the example of determination of steric iso- α -acid isomers.

Acknowledgements

The financial support by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM6019369701) is gratefully acknowledged. The authors give thanks to Waters Company for helpful lending of the liquid chromatography instrument Acquity UPLC™.

Literatura / References

- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva, Vydavatelství VŠCHT Praha, 50.
- De Cooman, L., Aerts, G., Overmaire, H., De Keukeleire, D., 2000: Alterations of the profiles of iso- α -acids during beer ageing, marked instability of *trans*-iso- α -acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso- α -acids. J. Inst. Brew. **106**, 169–178.
- Harms, D., Nitzsche, F., 2001: High-performance separation of unmodified and reduced hop and beer bitter compounds by a single high-performance liquid chromatographic method. J. Am. Soc. Brew. Chem. **59**: 28–31.

- Hofta, P., Dostálek, P., Sýkora, D., 2007: Liquid chromatography-diode array and electrospray high-accuracy mass spectrometry of iso- α -acids in DCHA-Iso Standard and Beer. J. Inst. Brew. **113**(1): 48–54.
- Jurková, M., Kellner, V., Čulík, J., Horák, T., Čejka, P., 2003: Rychlá a účinná izolace iso- α -hořkých kyselin z piva metodou SPE. Kvasny Prum. **49**: 258–259.
- Straková, L., Hofta, P., Dostálek, P., Průcha, P., 2007: Content of *trans*- and *cis*-iso- α -bitter acids as indicator of sensorial beer stability. Kvasny Prum. **53**(3): 71–74.

Recenzovaný článek / Reviewed paper
Do redakce došlo / Manuscript received: 20. 12. 2011
Přijato k publikování / Accepted for publication: 6. 2. 2012