

## Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 3. Porovnání HPLC a UHPLC stanovení $\alpha$ - a $\beta$ -hořkých kyselin

### *New Trends in Liquid Chromatography and Their Utilization in Analysis of Beer and Brewery Raw Materials. Part 3. Comparison of HPLC and UHPLC Determination of $\alpha$ - and $\beta$ -Acids*

MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, JANA OLŠOVSKÁ

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

**Jurková, M. – Čejka, P. – Olšovská, J.: Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 3. Porovnání HPLC a UHPLC stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 6, s. 166–170.**

Na reprezentativní skupině 11 vzorků chmele byla porovnána klasická metoda vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se stále více rozšířenou ultra účinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC). Výsledky práce potvrdily, že i v případě stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin zajišťuje technika UHPLC rychlejší průchodnost vzorků laboratořemi. Dalším přínosem je snížení nejistoty výsledku stanovení, které je spojeno s nesrovnatelně vyšší separační schopností UHPLC systému. Zatímco původní HPLC metodou přejatou z Analytiky EBC 7.7 jsme schopni 6 analyzovaných hořkých látek rozdělit pouze ve formě 4 píků (koeluují n-humulon a adhumulon a dále n-lupulon a adlupulon), v UHPLC módu bylo dosaženo kompletní separace všech 6 analytů.

**Jurková, M. – Čejka, P. – Olšovská, J.: New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 3. Comparison of HPLC and UHPLC determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 6, p. 166–170.**

The traditional method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was compared with the currently increasingly used Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) on a representative group of 11 hop samples. The results of this work confirmed that the UHPLC technique ensures high throughput also in determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids. Another benefit of this method is the decrease of result uncertainty which is determined by high separation properties of the UHPLC system. While original HPLC method originating from Analytica EBC 7.7 provides 4 separate peaks (co-elution of n-adhumulone and adhumulone and also of n-lupulone and adlupulone), all 6 analyzed bitter compounds were completely separated using UHPLC.

**Jurková, M. – Čejka, P. – Olšovská, J.: Neue Trends in der Flüssigkeit – Chromatographie und ihre Anwendung in der Brauherstoffen- und in der Analyse des Bieres. Teil III. Der Vergleich der HPLC und UHPLC Bestimmung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Bittersäuren. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 6, S. 166–170.**

Die klassische Methode hoch wirkende Flüssigkeit - Chromatographie (HPLC) wurde an einer repräsentativen Gruppe von 11 Hopfenmustern mit zunehmend benutzten Ultra wirkende Flüssigkeit - Chromatographie (UHPLC = Ultra high performance liquid chromatography) verglichen. Die erworbenen Ergebnisse haben es bestätigt, dass auch in Falle einer Anwendung der Technik UHPLC zur Bestimmung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren der Mustervorgang durch Labor schneller wurde. Der weitere Vorteil ist eine Verringerung der Unsicherheit der Resultatermittlung, die mit einer unvergleichbar höheren Separationsfähigkeit des UHPLC Systems verbunden wird. Derweil durch die laut der EBC Analytik 7.7 angewandte HPLC Methode konnten 6 Bitterstoffen nur in der Form 4 Peaks (korrelierte n-Adhumulone und Adhumulone und weiterhin auch n-lupulone und adlupulone) analysiert werden, im UHPLC Modus wurde die komplette Separation von allen 6 Analyten erreicht.

**Klíčová slova:** UHPLC – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie,  $\alpha$ -kyseliny,  $\beta$ -kyseliny

**Keywords:** UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography, HPLC – High Performance Liquid Chromatography,  $\alpha$ -acids,  $\beta$ -acids

## ■ 1 ÚVOD

Historicky nejdéle a v současnosti také nejčastěji analyzovanými složkami chmele jsou  $\alpha$ -hořké kyseliny (dále  $\alpha$ -kyseliny). Obsah těchto látek je základním parametrem (vedle jiných senzoricky aktivních látek) pro určení kvality chmele, neboť především jejich obsah určuje prodejní cenu chmele. Proto je analytickým metodám stanovení obsahu  $\alpha$ -kyselin ve chmelu věnována velká pozornost. V průběhu posledního desetiletí byl zaznamenán přechod od méně specifických titračních metod k metodám více specifickým založeným na kapalinové chromatografii. Postup stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin (dále  $\beta$ -kyselin) kapalinovou chromatografií je od r. 1997 normalizován a je zakotven spolu s ostatními metodami užívanými ke zkoušení chmele v ČR v normě ČSN 46 2520 v části 17. Tato norma vesměs vychází z metod EBC nebo MEBAK. V kapalinové chromatografii lze stanovit vedle  $\alpha$ - i  $\beta$ -kyselin, které mají odlišný charakter od  $\alpha$ -kyselin, a jejich vlastnosti a chování jsou v současné době předmětem výzkumu. V ČR v této oblasti úzce spolupracuje VÚPS, a.s. s Chmelařským institutem, s.r.o., a výsledky budou teprve publikovány.

## ■ 1 INTRODUCTION

$\alpha$ -Acids have been the most frequently analyzed hop compounds ever since their discovery. The content of  $\alpha$ -acids together with the other sensorially active compounds is the basic parameter for hop quality determination, because their concentration largely determines the sale prices of hop. Therefore considerable attention is paid to analytical methods for determination of  $\alpha$ -acids in the hop. The last decade witnessed the transition from less specific titration methods to a more specific method based on liquid chromatography. Since 1997, the method of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids determination has been normalized and embodied together with the other methods for hop testing in the CSN 46 2520 standard, part 17. This standard comes from EBC and MEBAK conventions. An advantage of liquid chromatography methods is the possibility to determine not only  $\alpha$ - but also  $\beta$ -acids. Their character, which is different compared with  $\alpha$ -acids, is presently the subject of collective research at the Research Institute of Brewing and Malting, PLC and Hop Research Institute Co., Ltd., Saaz and their results will be published later.

Ve všech typech analýz je prvním krokem extrakce  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin (měkkých pryskyřic) do nepolárního rozpouštědla. Titrační metoda využívala zpočátku extrakci do toluenu (Analytica-EBC, 2005a), ale později byl tento extrakční krok nahrazen extrakcí do diethyletheru v kyselém prostředí (Analytica-EBC, 2005b). Extrakt je titrován octanem olovnatým za vzniku komplexů s hořkými kyselinami, přičemž změna vodivosti systému je sledována konduktometricky. Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin ve chmelu je vyjádřen v hmotnostních procentech hodnotou KH (konduktometrická hodnota). Tato hodnota zahrnuje obsah hořkých  $\alpha$ -kyselin, ale v důsledku přítomnosti některých látek reagujících také s octanem olovnatým je tato reakce méně specifická a stanovená hodnota méně správná. Podíl  $\beta$ -kyselin je přibližně rozdíl celkového obsahu měkkých pryskyřic a hodnoty KH.

Etherický extrakt lze také po centrifugaci a naředění v methanolu analyzovat metodou HPLC. Chromatografická metoda umožňuje buď úplné, nebo částečné oddělení zón odpovídajících jednotlivým  $\alpha$ -kyselinám, kohumulonu, n-humulonu a adhumulonů v závislosti na volbě kolony a mobilní fáze. Obdobně jsou oddělené zóny  $\beta$ -kyselin, kolupulon, n-lupulon a adlupulon. Na rozdíl od titračních metod jsou metody HPLC vysoce specifické a poskytují hodnoty odpovídající více reálnému stavu.

Je zřejmé, že správnost a přesnost stanovení obsahu  $\alpha$ -kyselin ve chmelu a chmelovém extraktu zasahuje do obchodních vztahů. Je proto zájmem všech subjektů, ať pivovarů nebo pěstitelů a obchodníků, aby výsledky analytických laboratoří byly správné a srovnatelné. Jednotnost a správnost měření výsledků v metodách HPLC je zajištěna používáním jednotného mezinárodního kalibračního standardu, v současné době již třetího v pořadí, s označením ICE3. Evropské laboratoře se řídí metodami Evropské Pivovarské Konvence (Analytica-EBC, 1998) a pravidelně se mohou zúčastňovat mezinárodních srovnávacích testů pořádaných organizací MEBAK. VÚPS, a.s., se pravidelně zúčastňuje dvakrát ročně kontrolních testů organizovaných pod záštitou MEBAK a 6x ročně mezinárodních testů BAPS (Brewing Analytes Proficiency Testing Scheme) a metody určené pro zkoušení chmele jsou akreditovány u Českého institutu pro akreditaci, o.p.s. (ČIA).

EBC metody pro stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin jsou vypracovány pro dosud nejrozšířenější HPLC systémy. S rozvojem v instrumentaci v kapalinové chromatografii si své místo však nalézají i systémy UHPLC, neboť poskytují ve srovnání s klasickou HPLC nejen podstatně zkrácení doby analýzy a úsporu rozpouštědla, ale také výsledky s mnohem menší nejistotou a lepší opakovatelností (Olšovská et al., 2012b). Podrobné informace o této nové technice jsme uveřejnili v předchozích číslech tohoto periodika (Olšovská et al., 2012a, 2012b). Celkový čas analýzy obsahu hořkých kyselin ve chmelu může být dále ještě redukován efektivním extrakčním postupem tlakové extrakce vypracovaným na VÚPS (Čulík et al., 2009). Rychlý extrakční postup v kombinaci s moderní UHPLC technikou by laboratořím přinesl možnost velmi rychlého získávání dat a obchodní veřejnosti v chmelářské oblasti významné zvýšení jistoty správnosti údajů o obsahu  $\alpha$ -kyselin.

## 2 MATERIÁL A METODY

Pro porovnání obou UHPLC a HPLC metod pro stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin byly použity vzorky chmele s obsahem  $\alpha$ -kyselin v rozmezí 1,4–8,5 hm. %.

Vzorky byly extrahovány a upraveny pro analýzy dle postupu popsaného v metodě EBC 7.7 (Analytica – EBC, červen 2005).

Pro kalibraci byl použit mezinárodní kalibrační standard ICE3 s celkovým obsahem  $\alpha$ -kyselin 44,64 % hm. a  $\beta$ -kyselin 24,28 % hm. Kalibrační roztok byl připraven navážením 0,5 g ICE3 s přesností na 0,1 mg a rozpuštěním do 100 ml methanolu a následným desetinnásobným zředěním methanolem čistoty pro gradient (Sigma Aldrich).

### Chromatografické podmínky HPLC

$\alpha$ - a  $\beta$ -kyseliny byly analyzovány na chromatografické koloně s reverzní fází C18-Hop (250 x 4 mm, velikost částic 5  $\mu$ m), Macherey Nagel, Německo. Separace probíhala v izokratickém režimu. Mobilní fáze byla tvořena 850 ml metanolu (pro HPLC, Sigma Aldrich), 190 ml vody (Millipore, čistota max. 5 ppb organických látek) a 5 ml kyseliny fosforečné (p.a., Merck). Teplota kolony byla udržována při 35 °C, průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a nástřik vzorku na kolonu byl 5  $\mu$ l.  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyseliny byly detekovány v UV oblasti podle Analytiky EBC při 314 nm.

K analýze byl použit kapalinový chromatograf SpectraSYSTEM (TSP, USA) s detektorem s diodovým polem (DAD). Sběr dat a vy-

The first step of all types of analyses is the extraction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids (soft resins) into a nonpolar solvent. At the beginning, the titration method used the extraction into toluene (Analytica-EBC, 2005a), but this solvent was later replaced by diethylether in acidic conditions (Analytica-EBC, 2005b). The extract is titrated with lead acetate leading to formation of complexes with  $\alpha$ -acids and the conductivity of this system is measured at the same time. The content of  $\alpha$ -acids in the hop is expressed as % (w/w) alias LCV (lead conductance value). This value summarizes the content of  $\alpha$ -acids, however, the reaction is less specific and the determined value is less accurate in the presence of any compounds reacting with lead acetate. The proportion of  $\beta$ -acids is approximately the difference between the total content of soft resins and the LCV value. Etheral extract can be analyzed by HPLC following its centrifugation and dilution in methanol. Chromatographic method enables either complete or partial separation of  $\alpha$ -acid zones, cohumulone, n-humulone, and adhumulone. The efficiency of the separation is dependent on the chromatographic column and mobile phase used. A similar chromatographic behavior was recorded in case of  $\beta$ -acids, colupulone, n-lupulone, and adlupulone. In contrast to titration methods, the HPLC methods are more specific and provide results better corresponding to real soft resins quantity.

It is evident that accuracy and precision of determination of  $\alpha$ -acids in hop and hop extract affect the marketing and trade relations. Hence, all subjects as breweries, growers, and traders, are interested in accurate and comparable results of analytical laboratories. Good reproducibility and accuracy of results obtained by HPLC methods is ensured by using unified international calibration standard ICE3, which is presently already the third in a series. European laboratories follow the methods of European Beer Convention (Analytica EBC, 1998) and they can regularly participate in international proficiency testing organized by MEBAK. RIBM takes part in proficiency testing organized by MEBAK regularly two times a year and in BAPS (Brewing Analytes Proficiency Testing Scheme) regularly six times a year. Additionally, methods for hop analysis are accredited by the Czech Accreditation Institute (CIA).

EBC methods for  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids are developed for the most commonly used HPLC systems. In parallel with the development of liquid chromatography instrumentation the UHPLC systems start replacing it in the analytical field. The benefit of this new system is not only reduction of analysis time and consumption of organic solvents, but also more repeatable results with considerably lower uncertainty (Olšovská et al., 2012b). Information about UHPLC was described in more detail in previous issues of this journal (Olšovská et al., 2012a, 2012b). The total analysis time of the content of bitter acids in the hop could be eventually reduced by an effective pressure extraction procedure, which was developed also at RIBM (Čulík et al., 2009). The rapid extraction together with modern UHPLC technique could bring to laboratories the possibility of sample high-throughput, and, moreover it could ensure more accurate data on the content of  $\alpha$ -acids for traders in the hop commodity.

## 2 MATERIAL AND METHODS

Hop samples with the content of  $\alpha$ -acids ranging from 1.4 to 8.5 % (w/w) were used for comparison of UHPLC and HPLC methods. The samples were extracted and prepared for LC analysis according to EBC method 7.7 (Analytica – EBC, June 2005).

The international calibration standard ICE3 was used for the method calibration; the total content of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids was 44.64 % (w/w) and 22.28 % (w/w), respectively. The calibration solution was prepared as follows. ICE3 (0.5 g) was weighed with 0.1 mg precision, dissolved in 100 ml methanol, and diluted ten times with methanol (Gradient Grade, Sigma Aldrich).

### Chromatographic conditions HPLC

$\alpha$ - and  $\beta$ -acids were analyzed on chromatographic column with C-18 Hop reversed phase (250 x 4 mm, particle size 5  $\mu$ m), Macherey Nagel, Germany. The separation was in isocratic mode. The mobile phase was a mixture of 850 ml of methanol (for HPLC, Sigma Aldrich), 190 ml of water (Millipore, purity max. 5 ppb of organic compounds) and 5 ml of phosphoric acid (analytical grade, Merck). The column temperature was 35 °C, the flow rate was 0.8 ml/min, and the injection volume was 5  $\mu$ l.  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids were detected in UV at 314 nm according to Analytica EBC.

Analyses were performed on SpectraSYSTEM liquid chromatograph (TSP, USA) with diode array detector (DAD). The data collec-

hodnocení 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  $\mu\text{m}$ ), Waters, teplota kolony byla 25 °C, průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Dvousložková mobilní fáze byla tvořena vodným roztokem TFA - voda (0,1:99,9, v/v) (A) a acetonitrilem (B). Separace analytů byla provedena gradientovou elucí z 50 % (B) do 80 % (B) za 6 min zakončenou 2 min ekvilibračním krokem. Nástrík vzorku na kolonu byl 2  $\mu\text{l}$ .  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyseliny byly detekovány v UV oblasti při vlnové délce 314 nm.

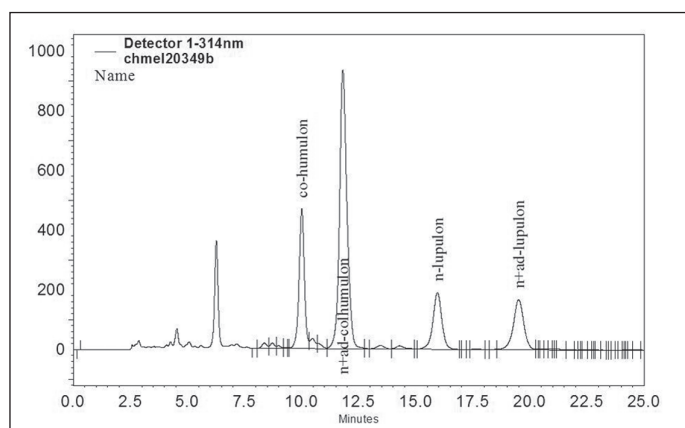
UHPLC analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Acquity UPLC™ (Waters) s 2996 PDA detektorem operujícím v rozmezí vlnových délek od 194 do 600 nm. Data byla vyhodnocována softwarem Empower 2 (Waters).

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Na obr. 1 je uveden chromatogram HPLC analýzy podle metody EBC 7.7, kde  $\alpha$ -kyseliny eluují ve dvou zónách (kohumulon v samostatné zóně a n-humulon s adhumulonem ve společné zóně). Obdobný profil elučních zón v obou systémech měly i  $\beta$ -kyseliny. Po optimalizaci metody UHPLC, kdy bylo použito zcela jiného typu kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ , neboli „sub-2-  $\mu\text{m}$ “, a o kterém jsme podrobněji psali v předchozích článcích (Olšovská et al., 2012a), bylo dosaženo v kombinaci se změnou mobilní fáze obsahující větší podíl polárnější složky úplné separace všech tří zón  $\alpha$ - i  $\beta$ -kyselin (viz obr. 2). Běžně se v analytických pracích setkáváme s fenoménem mnohanásobné účinnosti UHPLC kolon oproti klasickým HPLC kolonám, ale většinou se jedná o zlepšení separace píků, které se i v klasickém módu alespoň částečně dělily. V případě dělení n-humulonu od adhumulonem (a stejně n-lupulonu od adlupulonu) se podařilo novou UHPLC metodou separovat dvě zóny, které v HPLC metodě nevykazovaly ani náznak dělení. Navíc došlo k významnému zkrácení doby analýzy  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin z 25 minut na 8 minut. To se odrazí ve vysoké průchodnosti vzorků laboratoří s podstatně sníženými náklady na spotřebu rozpouštědel. V UHPLC módu byla použita velice jednoduchá mobilní fáze, a to voda s přídavkem 0,1 % (v/v) TFA a acetonitril. Spotřeba této organické fáze vzhledem k rychlosti analýzy je minimální (asi 2 ml na jednu analýzu včetně ekvilibrace), což metodu výrazně zlevňuje. V případě HPLC je na jednu analýzu spotřebováno 17 ml organické fáze (methanolu).

Obr. 1 HPLC chromatogram extraktu chmele (odrůda Sládek)  
Chromatografické podmínky: Kolona C18-Hop (250 x 4 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ), Macherey Nagel; teplota kolony 35 °C; průtok mobilní fáze 0,8 ml/min; mobilní fáze 850 ml methanolu, 190 ml vody a 5 ml kyseliny fosforečné; izokratická eluce; objem nástríku 5  $\mu\text{l}$ ; UV detekce 314 nm

Fig. 1 HPLC chromatogram of hop extract (Sladek variety)  
Chromatographic conditions: Column C18-Hop (250 x 4 mm, particle size 5  $\mu\text{m}$ ), Macherey Nagel; column temperature 35 °C; mobile phase flow 0,8 ml/min; mobile phase composition 850 ml of methanol, 190 ml of water and 5 ml of phosphoric acid; isocratic elution; injection volume 5  $\mu\text{l}$ ; UV detection at 314 nm



tion was carried out using chromatography software ChromQuest for Windows NT.

### Chromatographic conditions UHPLC

UHPLC analyses were performed on BEH C18 Waters column (2.1 x 50 mm I.D., particle size 1.7  $\mu\text{m}$ ), column temperature was 25 °C, and mobile phase flow was 0.4 ml/min. The two-component mobile phase was formed by aqueous solution of TFA-water (0.1:99.9 v/v) (A) and acetonitrile (B). The separation of analytes was carried out by gradient elution from a starting point at 50 % (B) to 80 % (B) within 6 min. The analytical run was terminated with an equilibration step of 2 min. The injection volume was 2  $\mu\text{l}$ .  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids were detected by UV at 314 nm.

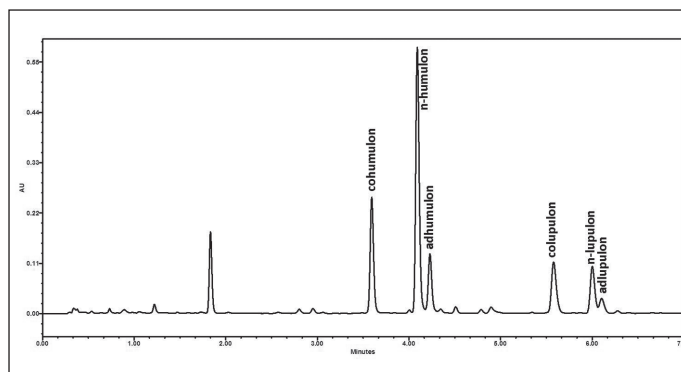
The Acquity UPLC™ (Waters) chromatograph was used for the analyses together with 2996 PDA detector operating at wavelengths ranging from 194 to 600 nm. Data were processed by Empower 2 (Waters) software.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

HPLC chromatogram obtained according to EBC 7.7 method is depicted in Fig. 1.  $\alpha$ -Acids elute in two zones; cohumulone elutes in a discrete zone whilst n-humulone and adhumulone co-elute in a common zone. A very similar elution profile was obtained when  $\beta$ -acids were separated. When the UHPLC method was optimized, a complete separation of all three zones was obtained for  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids (see Fig. 2). An absolutely different type of column was used in UHPLC mode compared to HPLC. This column is based on the principle of “sub-2  $\mu\text{m}$ ” and we described this special column type in our previous article (Olšovská et al., 2012a). In the literature one can usually encounter the phenomenon of multiple increase of performance of UHPLC columns as compared with HPLC columns. Using of a new UHPLC method with modified mobile phase (with a higher content of more polar component) lead to a total separation of peaks in the case of n-humulone and adhumulone (and analogously n-lupulone and adlupulone), which were not at all separated in HPLC. Furthermore, analysis time significantly decreased from 25 min in HPLC to 8 min; this facilitates high-throughput of samples and cost reduction of solvent consumption. A very simple mobile phase, 0.1 % TFA in water (v/v) and acetonitrile, was used in the UHPLC mode. The consumption of organic modifier was minimal due to the speed of analysis (approximately 2 ml per one analysis including equilibration step), which leads to the price reduction of

Obr. 2 UHPLC chromatogram extraktu chmele (odrůda Sládek)  
Chromatografické podmínky: Kolona BEH C18 (2,1 x 50 mm I.D., velikost částic 1,7  $\mu\text{m}$ ), Waters; teplota kolony 25 °C; průtok mobilní fáze 0,4 ml/min; mobilní fáze (A) TFA-voda (0,1:99,9, v/v), (B) acetonitril; gradientová eluce z 50 % (B) do 80 % (B) za 6 min, ekvilibrace 2 min; objem nástríku 2  $\mu\text{l}$ ; UV detekce 314 nm

Fig. 2 UHPLC chromatogram of hop extract (Sladek variety)  
Chromatographic conditions: Column BEH C18 (2.1 x 50 mm I.D., particle size 1.7  $\mu\text{m}$ ), Waters; column temperature 25 °C; mobile phase flow 0,4 ml/min; mobile phase composition (A) TFA-water (0.1:99.9, v/v), (B) acetonitrile; gradient elution from 50 % (B) to 80 % (B) within 6 min, equilibration 2 min; injection volume 2  $\mu\text{l}$ ; UV detection at 314 nm





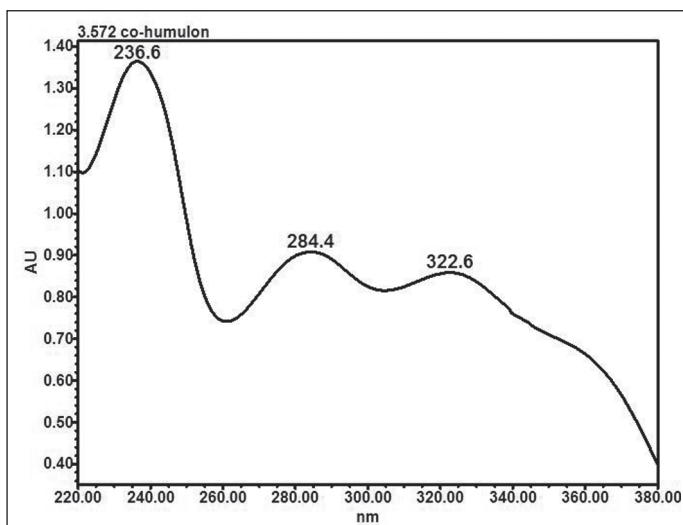
$\alpha$ -Kyseliny vykazují v UV spektru tři maxima 237, 285 a 322 nm (obr. 3). Podle metody EBC 7.7 je k detekci hořkých kyselin použita vlnová délka 314 nm. Dále tato metoda předepisuje jednobodovou kalibraci procházející počátkem. Za těchto podmínek byly vyhodnoceny obsahy  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin metodami HPLC a UHPLC v 11 vzorcích chmele. V tab. 1 je uveden přehled analyzovaných vzorků chmele společně s konduktometrickou hodnotou KH. V tab. 2 jsou uvedeny výsledky měření celkového obsahu  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin oběma srovnávanými metodami a rozdíl  $\Delta$  mezi výsledky obou metod. V posledním sloupci je uvedena teoretická hodnota meze opakovatelnosti  $r_{95}$  vypočítaná pro jednotlivé hladiny (maximální povolený rozdíl mezi dvěma stanoveními v jedné laboratoři) vycházející z metodiky EBC, kap. 7.7. Hodnoty skutečného a teoretického rozdílu vycházejícího z opakovatelnosti metody byly spolu porovnány. Z tab. 2 je patrné, že v případě  $\alpha$ -kyselin dává metoda UHPLC mírně vyšší výsledky (v průměru o 0,13 % hm.), avšak tyto rozdíly jsou pro všechny vzorky (kromě jednoho) nižší než povolená opakovatelnost. U  $\beta$ -kyselin jsou rozdíly kladné i záporné, avšak opět (kromě jednoho vzorku) pod teoretickou mezí opakovatelnosti. Lze tedy prohlásit, že obě metody jsou srovnatelné.

Obr. 3 UV spektrum kohumulonu

UV spectrum bylo naměřeno pomocí UHPLC-DAD detektoru během separace  $\alpha$ -kyselin za podmínek uvedených v části Materiál a metody. Ostatní  $\alpha$ -kyseliny měly shodné UV spektrum s maximy 237, 285 a 322 nm

Fig. 3 UV spectrum of cohumulone

The UV spectrum was measured using UHPLC-DAD detector during the separation of  $\alpha$ -acids under conditions mentioned in Materials and Methods. The other  $\alpha$ -acids had the same UV maxima at 237, 285 a 322 nm



the method. When bitter acids were analyzed by HPLC, 17 ml of organic modifier (methanol) was used.

The UV spectrum of  $\alpha$ -acids shows three maxima at 237, 285, and 322 nm (see Fig. 3). The wavelength of 314 nm and one-point calibration was used according to EBC. 7.7. The content of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids was measured by HPLC and UHPLC under these convention conditions in 11 hop samples. Tab. 1 gives an overview of analyzed hop samples together with LCV values. The values of total  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids content obtained by the two chromatographic methods together with their difference  $\Delta$  are summarized in Tab. 2. The theoretical value of repeatability  $r_{95}$  calculated for individual levels follows from EBC 7.7 and expresses the permitted difference between two parallel results in one laboratory. The values of real and theoretical difference derived from method repeatability were compared. As shown in Tab. 2, UHPLC gives moderately higher results in case of  $\alpha$ -acids (on average 0.13% higher). Nevertheless, for all samples (except for one case) these differences are lower than the permitted repeatability. Both positive and negative differences were found with  $\alpha$ -acids; except for one case they were again below theoretical repeatability. The two methods can thus be considered comparable.

Two hop samples (Sládek and Saaz) with different concentration levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids were chosen for comparison of validation parameters. Both hop samples were measured repetitively (n=8)

Tab. 1 Přehled testovaných vzorků chmele a jejich konduktometrická hodnota KH / An overview of tested hop samples and their lead conductance value (LCV)

Vzorek chmele / Hop sample		$KH_{přv} / LCV_{orig}$	$KH_{sus} / LCV_{dry}^*$
1	Sládek/Sládek	10.18	11.05
2	Premiant/Premiant	9.74	10.76
3	Žatec/Zatec	3.43	3.71
4	Bor/Bor	8.80	9.39
5	ŽPČ/Saaz	2.21	2.42
6	ŽPČ/Saaz	2.12	2.28
7	Žatec/Zatec	3.38	3.65
8	ŽPČ/Saaz	3.31	3.57
9	ŽPČ/Saaz	2.27	2.45
10	Bor/Bor	8.89	9.55
11	ŽPČ/Saaz	3.52	3.80

\* KH přepočtená na sušinu / \* LCV recalculated to dry material

Tab. 2 Srovnání obsahu  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin ve vybraných vzorcích chmele získaného metodou HPLC a UHPLC / Comparison of the content of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids in tested hop samples obtained by HPLC and UHPLC

$\alpha$ -kyseliny (% hm.) / $\alpha$ -acids (% w/w)					$\beta$ -kyseliny (% hm.) / $\beta$ -acids (% w/w)				
	HPLC	UHPLC	$\Delta$	$r_{95}$	HPLC	UHPLC	$\Delta$	$r_{95}$	
1	8.67	8.54	0.13	0.37	3.88	3.87	0.01	0.22	
2	8.35	8.15	0.20	0.36	5.02	4.58	<b>0.44</b>	<b>0.25</b>	
3	2.95	2.76	0.19	0.19	5.26	5.21	0.05	0.27	
4	7.15	7.13	0.02	0.33	5.14	5.23	-0.09	0.27	
5	1.72	1.59	0.13	0.15	3.62	3.63	-0.01	0.22	
6	1.51	1.37	0.14	0.14	3.43	3.50	-0.07	0.21	
7	2.81	2.57	<b>0.24</b>	<b>0.18</b>	5.21	5.14	0.07	0.26	
8	2.75	2.67	0.08	0.19	5.31	5.47	-0.16	0.28	
9	1.88	1.81	0.07	0.16	3.77	3.88	-0.11	0.22	
10	7.63	7.55	0.08	0.34	5.41	5.35	0.06	0.27	
11	2.92	2.78	0.14	0.19	5.30	5.52	-0.22	0.28	

Tab. 3 Srovnání validačních charakteristik HPLC a UHPLC metody / The comparison of HPLC and UHPLC validation parameters

Sládek – validační parametry / Sladek – validation parameters	HPLC	UHPLC
Mez opakovatelnosti (% hm.) $r_{95}$ pro $\alpha$ -kyseliny / Repeatability (% w/w) $r_{95}$ for $\alpha$ -acids	0.22	0.03
Mez opakovatelnosti (% hm.) $r_{95}$ pro $\beta$ -kyseliny / Repeatability (% w/w) $r_{95}$ for $\beta$ -acids	0.22	0.06
Odhad nejistoty (%) pro $\alpha$ -kyseliny / Uncertainty estimate (%) for $\alpha$ -acids	4.6	0.26
Odhad nejistoty (%) pro $\beta$ -kyseliny / Uncertainty estimate (%) for $\beta$ -acids	4.8	1.04

ŽPČ – validační parametry / Saaz – validation parameters	HPLC	UHPLC
Mez opakovatelnosti (% hm.) $r_{95}$ pro $\alpha$ -kyseliny / Repeatability (% w/w) $r_{95}$ for $\alpha$ -acids	0.22	0.03
Mez opakovatelnosti (% hm.) $r_{95}$ pro $\beta$ -kyseliny / Repeatability (% w/w) $r_{95}$ for $\beta$ -acids	0.22	0.06
Odhad nejistoty (%) pro $\alpha$ -kyseliny / Uncertainty estimate (%) for $\alpha$ -acids	4.6	0.74
Odhad nejistoty (%) pro $\beta$ -kyseliny / Uncertainty estimate (%) for $\beta$ -acids	4.8	0.80

Pro srovnání validačních parametrů HPLC a UHPLC metod na dvou koncentračních hladinách byly vybrány dva vzorky chmele (Sládek a ŽPČ) s rozdílnou hladinou  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin. Oba vzorky chmele byly změřeny opakovaně ( $n=8$ ) a z naměřených dat byla vyčíslena mez opakovatelnosti a odhad relativní nejistoty ( $k=2$ ) pro  $\alpha$ - i  $\beta$ -kyseliny. Odrůda Sládek (KH 10,18) obsahovala  $8,57 \pm 0,1$  hm. %  $\alpha$ -kyselin a  $3,81 \pm 0,04$  hm. %  $\beta$ -kyselin. Odrůda Žatecký poloraný červeňák (KH 3,52) obsahovala  $2,81 \pm 0,03$  hm. %  $\alpha$ -kyselin a  $5,57 \pm 0,06$  hm. %  $\beta$ -kyselin. Z tab. 3 je patrné, že meze opakovatelnosti i odhady nejistoty pro  $\alpha$ - i  $\beta$ -kyseliny jsou v případě použití UHPLC metody významně nižší, ve všech případech až o jeden řád.

#### 4 ZÁVĚR

Tato studie uzavírá trojdílný seriál článků, které se zabývaly novou generací chromatografických kolon a s nimi spojenou instrumentací kapalinové chromatografie, rozšířenou pod názvem ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC). V prvním díle jsme představili tuto novou technologii a popsali její přínos v porovnání s klasickými metodami HPLC, který vyplývá ze základního principu této instrumentace a který se bezesporu pozitivně promítá do ekonomických nákladů na analýzu. Pro ověření tohoto tvrzení byly vypracovány dvě aplikační studie v oboru pivovarské analytiky.

Na příkladu stanovení iso- $\alpha$ -kyselin v pivu a dále na stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin ve chmelu bylo potvrzeno, že kromě ekonomických přínosů (úspora času a energií a rozpouštědel v důsledku významného zkrácení doby analýzy) poskytuje tato metoda měření s menším rozptylem výsledků. Metody pivovarské analytiky vycházejí z určitých konvencí, které zatím předpokládají použití starších typů HPLC přístrojů. Na základě obou studií lze však konstatovat, že použití UHPLC dává při zachování definovaných parametrů měření (způsob detekce, kalibrace a kvantifikace) srovnatelné výsledky s metodou HPLC, a proto lze používat oba typy instrumentálních technik, aniž by byla ohrožena správnost výsledků.

#### Poděkování

Tato práce je součástí Výzkumného záměru MSM6019369701.

Autoři děkují firmě Waters za laskavé zapůjčení kapalinového chromatografu Acquity UPLC™.

#### Literatura / References

- Analytica EBC, 1998: kap. 7.7, EBC Analysis Committee-Nürnberg: Carl Getranke-Fachverlag, 1998.  
 Analytica EBC, 2005a: kap. 7.4, EBC Analysis Committee-Nürnberg: Carl Getranke-Fachverlag, 2005.  
 Analytica EBC, 2005b: kap. 7.6, EBC Analysis Committee-Nürnberg: Carl Getranke-Fachverlag, 2005.  
 Čulík, J., Jurková, M., Horák, T., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Karásek, P., Roth, M., 2009: Extraction of bitter acids from hops and hop products using pressurized solvent extraction (PSE). J. Inst. Brew. **115**, 2009: 220–225.  
 Olšovská, J., Jurková, M., 2012a: Nové trendy v kapalinové chroma-

and the repeatability and relative uncertainty estimate ( $k=2$ ) were calculated. The Sladek variety (KH 10.18) contained  $8.57 \pm 0.1$  % (w/w) and  $3.81 \pm 0.04$  % (w/w) of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids, respectively. The Saaz variety contained  $2.81 \pm 0.03$  % (w/w) and  $5.57 \pm 0.06$  % (w/w) of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids, respectively. As follows from Tab. 3, the repeatability and relative uncertainty estimate for  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids are significantly (more than ten times) lower in all cases when the UHPLC is used.

#### 4 CONCLUSIONS

This study is the last of a series of three studies, which dealt with a new generation of chromatographic columns and related liquid chromatography instrumentation known as Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). In the first part, we introduced this new technology and described its enormous advantages over the classical HPLC method, which result from the basic principle of UHPLC instrumentation, and which will undoubtedly positively reflect in economical costs per analysis. Two useful studies were performed in the area of beer analysis to verify this claim.

The usefulness of the new method was confirmed on the example of iso- $\alpha$ -acid determination in beer and further on determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids in hop. Besides an economic benefit (reduction of time, energy and organic solvents as a result of significant analysis time reduction) this method affords measurement with lower variance of results. The current methods of beer analysis are based on some conventions that presume the use of old HPLC instrument types. Based on both studies it is possible to state that the use of UHPLC provides comparable results with HPLC, when defined measure parameters (the way of detection, calibration and quantification) are maintained. Therefore, both types of LC can be used without compromising the accuracy of the results.

#### Acknowledgements

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

tografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. Kvasný Prům. **58**: 34–39.  
 Olšovská, J., Jurková, M., Čejka, P., 2012b: Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 2. Stanovení cis/trans- izomerů iso- $\alpha$ -hořkých kyselin v pivu metodou Ultraúčinné kapalinové chromatografie. Kvasný Prům. **58**: 94–99.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 1. 4. 2012

Přijato k publikování / Accepted for publication: 4. 6. 2012