

## LITERATURA / REFERENCES

1. Madigan, D., McMurrough, I.: Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection. *Analyst* **119**, 1994, 863–868.
2. Friedrich, W., Eberhardt, A., Galensa, R.: Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 2000, 56–64.
3. Moll, M., Fonknechten, G., Carnielo, M., Flayeux, R.: Changes in polyphenols from raw materials to finished beer. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **21**, 1984, 79–87.
4. Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G.: Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2006, 7277–7286.
5. Madigan, D., McMurrough, I.: Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection. *Analyst* **119**, 1994, 863–868.
6. Dvořáková, M., Dostálek, P., Hulín, P.: Analytické metody pro stanovení polyfenolů ve sladině, mladíně a pivu. *Kvasny Prum.* **52**, 2006, 111–114.
7. Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brooks, P. A., Stevens, R.: *Brewing: Science and practice*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 2004.
8. McMurrough, I., Madigan, D., Smyth, M. R.: Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1996, 1731–1735.
9. Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, M. J.: Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1999, 1625–1634.
10. Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, M. F.: Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2004, 5195–5200.
11. McMurrough, I., Malcom, J. L., Hennigan, G. P.: Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain. *J. Sci. Food Agric.* **34**, 1983, 62–72.
12. Whittle, N., Eldridge, H., Bartley, J.: Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical detection. *J. Inst. Brew.* **105**, 1999, 89–99.
13. McMurrough, I., Baert, T.: Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. *J. Inst. Brew.* **100**, 1994, 409–16.
14. McMurrough, I., Roche, G. P., Cleary, K. G.: Phenolic acid in beers and worts. *J. Inst. Brew.* **90**, 1984, 181–187.
15. Shahidi, F., Naczk, M.: *Food Phenolics; Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic publishing Co. Inc., Lancaster, PA, 1995, 10–13.
16. Graf, E.: Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 1992, 435–448.
17. Dvořáková, M.: Determination of phenolic compounds and their antioxidant capacity in barley, malt and beer. Dissertation thesis, Institute of Chemical Technology Prague, 2008.
18. Dvořáková, M., Moreira, M. M., Dostálek, P., Skulilová, Z., Guido, L. F., Barros, A. A.: Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography-ultraviolet detection-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1189**(1-2), 2008, 398–405.
19. Dvořáková, M., Guido, L. F., Dostálek, P., Skulilová, Z., Moreira, M. M., Barros, A. A.: Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 27–33.
20. Dvořáková, M., Douanier, M., Jurková, M., Kellner, V., Dostálek, P.: Comparison of antioxidant activity of barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt extracts with the content of free phenolic compounds measured by high performance liquid chromatography coupled with CoulArray detector. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 150–159.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 19. 12. 2009

Přijato k publikování / Accepted for publication: 2. 2. 2010

## Současné stanovení iso-alfa kyselin ve formě jejich cis- a trans- forem a tetrahydroiso-alfa kyselin

### *Simultaneous determination of iso-alpha acids in their cis- and trans- forms and tetrahydroiso-alpha acids*

MARIE JURKOVÁ, TOMÁŠ HORÁK, JIŘÍ ČULÍK, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER

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, 120 44 Praha 2, Czech Republic

e-mail: jurkova@beerresearch.cz

**Jurková, M. – Horák, T. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Současné stanovení iso-alfa kyselin ve formě jejich cis- a trans- forem a tetrahydroiso-alfa kyselin.** *Kvasny Prum.* **56**, 2010, č. 3, s. 163–166.

Vypracovaná metoda umožňuje i bez použití komplikovaných mobilních fází velice šetrným způsobem bez použití pufrů vedle sebe stanovit stereoisomerní formy iso-alfa kyselin a zároveň stanovit koncentraci případně přítomných tetrahydroiso-alfa kyselin jejich separací na koloně s reverzní fází C18. Jednotlivé skupiny látek se eluují v oddělených skupinách. Zbytky alfa kyselin, které nepřešly na iso-alfa kyseliny, stanovení v podstatě neruší.

**Jurková, M. – Horák, T. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Simultaneous determination of iso-alpha acids in their cis- and trans- forms and tetrahydroiso-alpha acids.** *Kvasny Prum.* **56**, 2010, No. 3, p. 163–166.

The elaborated method enables the simultaneous determination of stereoisomer forms of iso-alpha acids and tetrahydroiso-alpha acids using very modest way of separation on reverse phase on C18 column mobile phase without buffers. The groups of analysed compounds elute separately. The rests of untransformed alpha acids to iso-alpha acids do not obstruct the analysis.

**Jurková, M. – Horák, T. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Die zeitgenössische Bestimmung der Iso-Alfa Säuren in der Cis- und Trans- Formen und Tetra Hydro Iso-Alfa Säuren.** *Kvasny Prum.* **56**, 2010, Nr. 3, S. 163–166.

Die ausgearbeitete Methode ermöglicht auch ohne Anwendung von komplizierten Mobilphasen und ohne Pufferanwendung auf einer sehr schonenden Weise die Stereo Isomer Formen der Iso-Alfa Säuren zu bestimmen und gleichzeitig durch die Separation auf der Kolonne mit Reversphase C 18 die Konzentration von zufällig anwesenden Tetrahydroiso-Alfa Säuren festzustellen. Die einzelnen Stoffgruppen werden in den separaten Gruppen eluiert. Die Reste von Alfa-Säuren, die auf Iso-Alfa Säuren nicht überstiegen sind, das Messen im Grunde nicht stören.

**Klíčová slova:** stereoisomery iso-alfa kyselin, tetrahydroiso-alfa kyselin, HPLC/UV, pivo

**Keywords:** stereoisomers, iso-alpha acids, tetrahydroiso-alpha acids, HPLC/UV, beer

## 1 ÚVOD

Při varném procesu alfa hořké kyseliny přecházejí na iso-alfa kyseliny zodpovědné za hořkou chuť piva. Iso-alfa kyseliny jsou formovány do dvou prostorových isomerů: cis- a trans-, a to ve prospěch cis- formy (poměr cis-/trans- forem bývá 68/32) [1]. Během stárnutí piva je i forma cis- stabilnější na rozdíl od formy trans-, která podléhá snadněji oxidačním reakcím vedoucím k tvorbě těkavých sloučenin, včetně 2-ketonů, které dále podléhají kondenzačním reakcím aldolového typu s aldehydy. Vznikající sloučeniny podstatně ovlivňují senzorické vlastnosti piva. Je proto důležité sledovat souvislosti nejen mezi počáteční přeměnou alfa-kyselin na iso-alfa kyseliny, ale také dále sledovat koncentrace iso-alfa kyselin ve vyrobeném pivu a jejich stabilitu během skladování [2]. Sledování jednotlivých forem cis- a trans- iso-alfa kyselin má význam pro sledování stárnutí piva, kdy forma trans-, která je náchylnější k oxidaci, vypovídá také o časové stabilitě hořkosti piva.

Problém úbytku iso-alfa kyselin a stability hořkosti piva může být řešen přidáváním stabilních hydrogenovaných iso-alfa kyselin. V některých státech EU se proto redukováné iso-alfa-kyseliny (zejména tetrahydroiso-alfa-kyseliny) ve formě komerčních preparátů do piva přidávají.

Dosud používaná HPLC metoda EBC 7.9 pro stanovení iso-alfa kyselin v pivu nebo v isomerizovaných chmelích neumožňuje rozlišení jednotlivých cis- a trans-stereoisomerů iso-alfa kyselin. Je proto snahou mnoha autorů vypracovat postupy, které by umožnily nejen rozlišení jednotlivých forem iso-alfa kyselin, ale i identifikovat jednotlivé složky přidávaných hydrogenovaných iso-alfa kyselin [3].

Cílem této práce bylo vypracovat metodu pro rozlišení cis- a trans- forem iso-alfa kyselin a jejich současné stanovení vedle případně přítomných tetrahydroiso-alfa kyselin. Příprava vzorku k analýze vychází z předchozí práce [4].

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Extrakce iso-alfa kyselin

5 ml odpěněného piva (odpěnění za pomoci ultrazvuku) se po opad-

## 1 INTRODUCTION

The bitter alpha acids changed into iso-alpha acids during boiling process and the established iso-alpha acids are accountable for a beer bitterness. The iso-alpha acids formed two stereoisomers: cis- and trans- on the behalf of cis- form (the ratio of cis-/trans- forms is usually 68/32) [1]. The cis-form more stable than a trans-form which undergoes readily to oxidative reactions yielding to formation of volatile compounds including of 2-ketones, which could undergo aldol-type condensations with aldehydes. The rising compounds influence the sensory features of beer significantly. Due to it the study of relationships of initial conversion of alpha acids to iso-alpha acids are very important and also further checking of concentrations of iso-alpha acids in produced beer and their stability during storage [2]. The monitoring of individual forms cis- and trans- iso-alpha acids is important for checking of beer ageing, when the trans-form more prone to oxidation predicates to the time stability of beer bitterness.

The problem of decomposition of iso-alpha acids and stability of beer bitterness can be solved by addition of stable hydrogenated iso-alpha acids. The reduced iso-alpha acids (namely tetrahydroiso-alpha acids) are therefore added to beer in form of commercial products in some EU countries.

Currently used HPLC EBC 7.9 method for determination of iso-alpha acids in beer or in isomerised hops does not allow resolution of individual cis- and trans- isomers of iso-alpha acids.

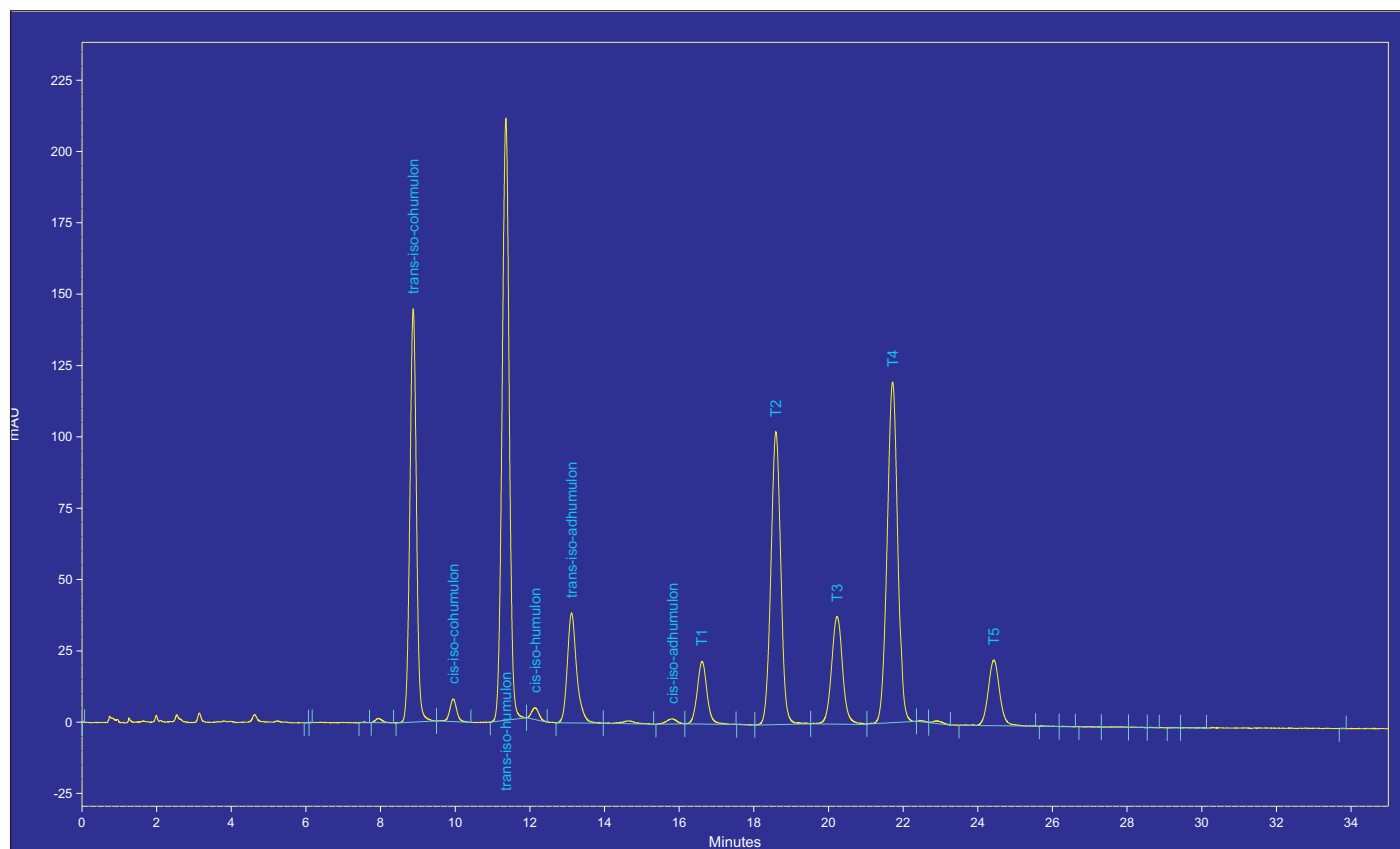
There are efforts of many authors to elaborate some methods for resolution not only the individual forms of cis- and trans- isomer but also to identification components of added hydrogenated iso-alpha acids [3].

The aim of this study was to work up a method for separation of cis- and trans-form of iso-alpha acids and their simultaneous determination with tetrahydroiso-alpha acids present eventually. The sample preparation is the same as in the previous work [4].

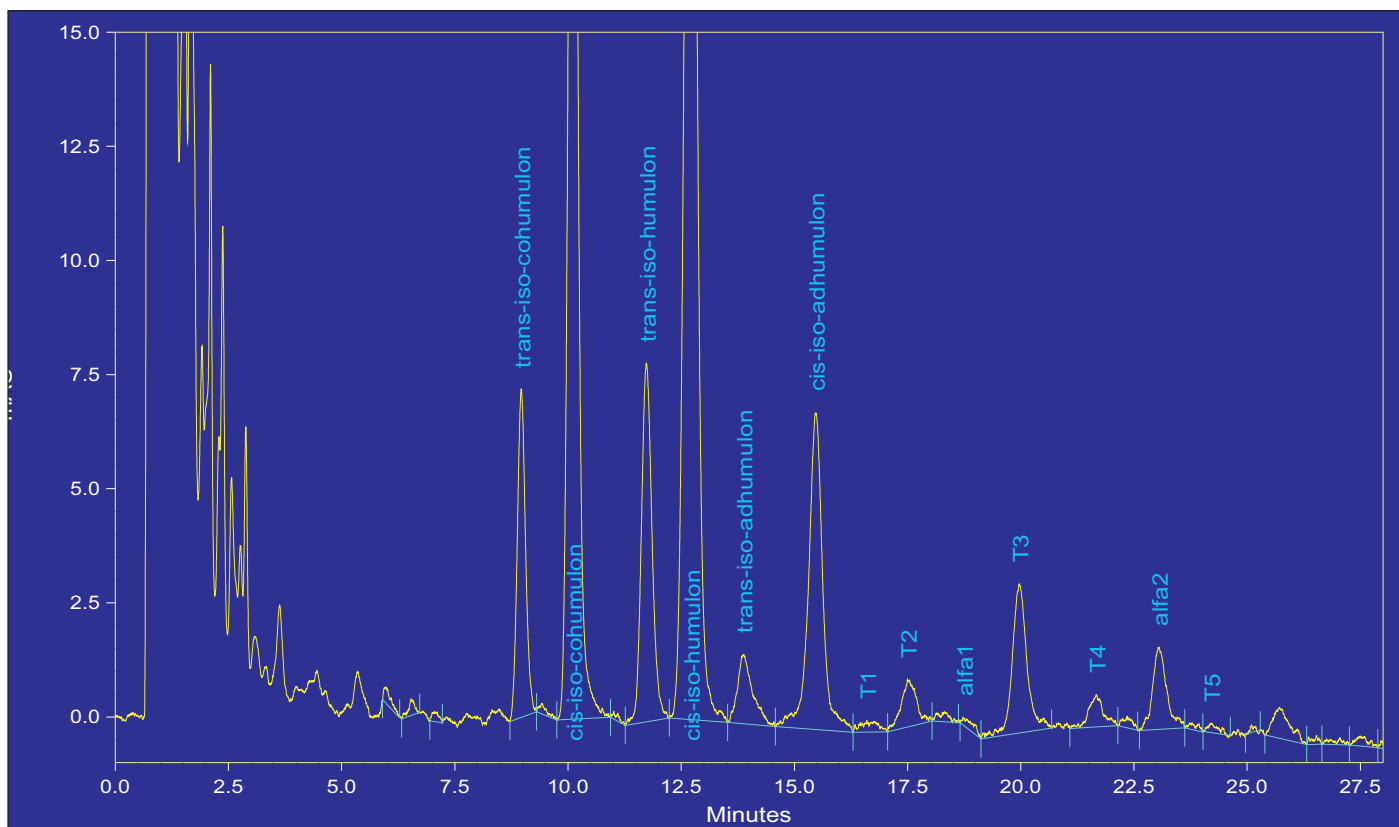
## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Extraction of iso-alpha acids

5 ml of degassed beer (ultrasonic degassing) after falling off the



Obr. 1 Chromatogram stereoisomerů iso-alfa kyselin a tetrahydroiso-alfa kyselin (T1-T5). / Fig. 1 Chromatogram of stereoisomers of iso-alpha acids and tetrahydroiso-alpha acids (T1-T5)



Obr. 2 Chromatogram stereoisomerů iso-alfa kyselin a tetrahydroiso-alfa kyselin společně (T1-T5) s alfa kyselinami. / Fig. 2 Chromatogram of stereoisomers of iso-alpha acids and tetrahydroiso-alpha acids (T1-T5) together with alpha acids

nutí pěny nanese na kondicionovanou extrakční kolonku (STRATA X 33  $\mu\text{m}$ /60 mg – Phenomenex).

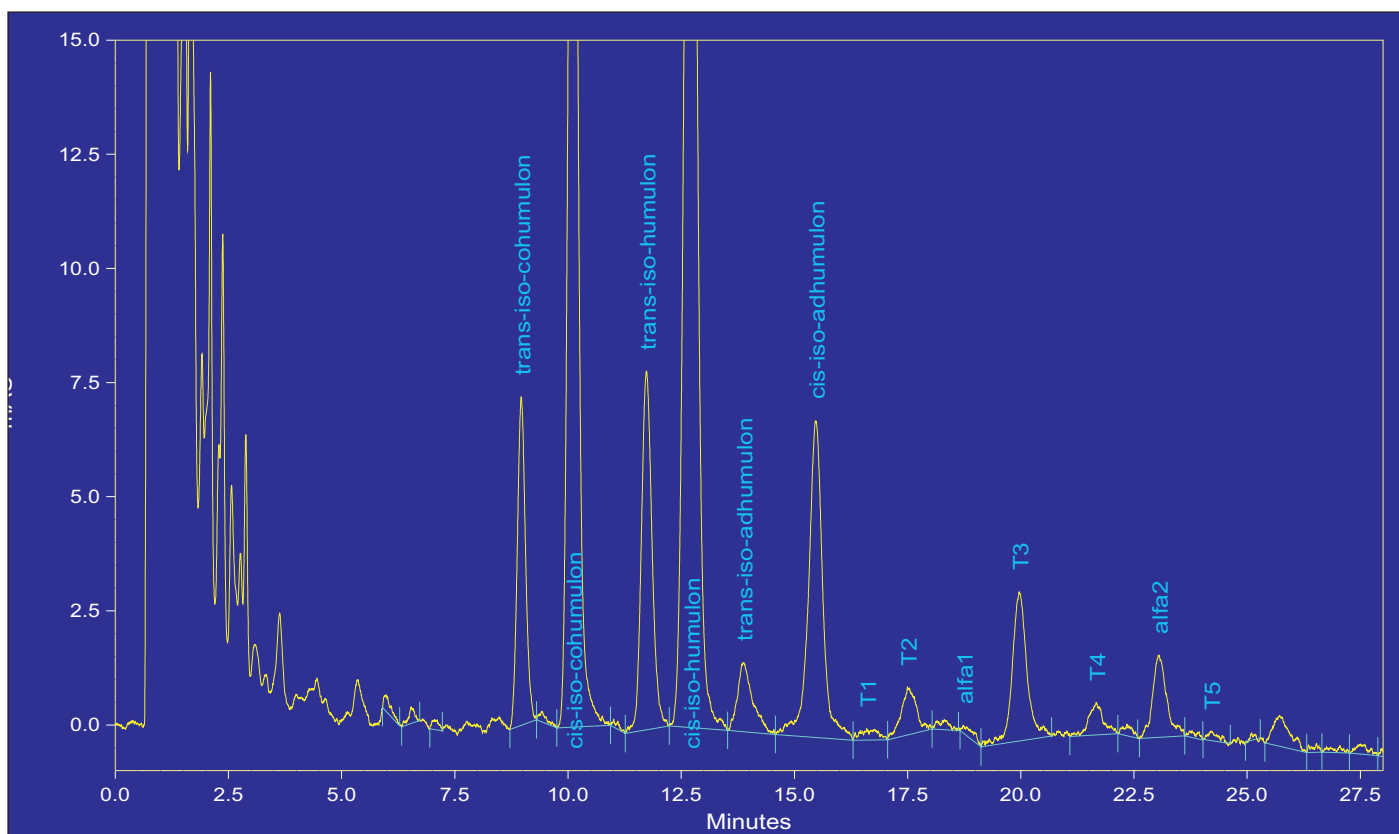
Kondicionace: 1,5 ml methanolu (Sigma Aldrich), potom 1,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (ultračistá, Millipore).

Po průchodu piva kolonkou se tato promyje 1,5 ml 5% vodným roztokem methanolu za účelem odstranění polárnějších sloučenin. Po-

foam are applied on conditioned extraction columns (STRATA X 33  $\mu\text{m}$ /60mg – Phenomenex).

Condition: 1.5 ml of methanol (Sigma Aldrich), after it 1.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (ultraclean, Millipore)

After passing of beer the extraction column is rinsed by 1.5 ml 5% methanol solution in water in order to remove more polar compounds.



Obr. 3 Chromatogram iso-alfa kyselin, tetrahydro-iso-alfa kyselin a alfa-kyselin ve vzorku zakoupeného piva / Fig. 3 Chromatogram of iso-alpha acids, tetrahydro-iso-alpha acids and alpha-acids in the purchased sample of beer

tom se kolonka vysuší pod proudem dusíku a vyluuje se do odměrné baňky o objemu 5 ml methanolem.

Methanolem se doplní po značku a promíchá.

Z takto upraveného vzorku se na kolonu nastříkuje 10  $\mu$ l.

## 2.2 Chromatografická separace a stanovení

K analýze byla zvolena kolona s reverzní fází (Alltima C18, 5  $\mu$ m, 150x4,6 mm, Alltech) s předkolonkou C18 4x3 mm (Phenomenex).

Mobilní fáze je dvousložková: A je ultračistá voda (Millipore) s obsahem max. 5 ppb organických látek, okyselená kyselinou fosforečnou na hodnotu pH 2,8, B je acetonitril (ACN) kvality gradient grade (Sigma Aldrich).

Použitý gradient pro separaci: 0. min. 52% ACN, 40. min 72% ACN.

Analýza trvá 40 minut s ekvilibračním časem 15 minut.

Jednotlivé složky byly detekovány v oblasti UV, v případě iso-alfa-kyselin při 275 nm, v případě tetrahydro-iso-alfa kyselin při 253 nm.

Teplota kolony byla 35 °C, průtok byl 1,5 ml/min a nástřik 10  $\mu$ l.

K analýze byl použit stavebnicový kapalinový chromatograf SpectraSYSTEM (TSP, USA) s UV detekcí s diodovým polem. Sběr dat a vyhodnocení byly zajištěny chromatografickým softwarem ChromQuest pro Windows NT.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Iso-alfa kyseliny byly eluovány v 6 elučních zónách, kde 3 pásy odpovídaly trans – formám co-humulonu, n-humulonu a ad-humulonu a 3 pásy cis – formám co-humulonu, n-humulonu a ad-humulonu. Odděleně za skupinou elučních zón iso-alfa kyselin byly eluovány tetrahydroiso-alfa kyseliny (obr. 1).

Při popsání separačních podmínek byly tetrahydro-iso-alfa kyseliny eluovány pouze v 5 zónách. V oblasti tetrahydroiso-alfa kyselin eluují též alfa kyseliny, jejich případnou přítomnost ve vzorku musíme předpokládat (obr. 2).

Pík označený T4 za těchto separačních podmínek koeluuje s jednou z prostorových forem odpovídající poslednímu píku T5.

Alfa kyseliny eluují ve 2 výraznějších zónách, které neinterferují s tetrahydro-iso-alfa kyselinami, a v jedné nevýrazné zóně, která vykazuje částečný překryv s poslední zónou tetrahydroiso-alfa kyselin. Tato skutečnost nebrání při kvalitativním důkazu přítomnosti tetrahydro-iso-alfa kyselin vedle iso-alfa-kyselin, avšak při kvantitativním stanovení by měla být tato skutečnost zahrnuta do nejistoty stanovení.

Metoda byla odzkoušena vzhledem ke stanovení cis-a trans- forem iso-alfa kyselin na řadě výzkumných vzorků a některých vzorků z obchodní sítě. U některých zakoupených vzorků piva byla nalezena při HPLC analýze retenční shoda píků s tetrahydroiso-alfa kyselinami (obr. 3). Vzhledem k relativní hořkosti tetrahydroiso-alfa kyselin 1,5–1,9 (relativní hořkost iso-alfa kyselin je 1,00) [1,5] může již přídavek několika mg/l tetrahydroiso-alfa kyselin zlepšovat senzorní vlastnosti piva. Například ve studii sledování stability trans-iso-alfa hořkých kyselin [5] a kontroly hořkosti byly nalezeny v zahraničních ležáckých pivech již hodnoty od 2,9 mg/l přidaných tetrahydroiso-alfa kyselin pro zachování hořkosti během jejich skladování.

Jelikož analyzované iso-alfa kyseliny a tetrahydroiso-alfa kyseliny eluují v šesti resp. pěti elučních zónách, jsou při kvantitativním vyhodnocení použity odezvové faktory vypočítané jako poměr koncentrace standardu (mg/l) a součtu ploch všech píků příslušného standardu. Jedná se o kalibraci konvenčně používanou v pivovarství pro stanovení iso-alfa kyselin (metoda EBC 7.9).

Mez stanovení je podstatně ovlivněna kvalitou detektoru, tedy jeho poměrem signálu k šumu.

### Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky 1M0570 „Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele“.

## LITERATURA / REFERENCES

1. Karabín, M., Brányik, T., Kruliš, M., Dvořáková, M., Dostál, P.: Využití chemicky modifikovaných hořkých látek v pivovarství. Chem. Listy **103**, 2009, 721–728.
2. De Cooman, L., Aerts, G., Overmeire, H., De Keukeleire, D.: Alterations of the profiles of iso- $\alpha$ -acids during beer ageing, marked instability of trans-iso- $\alpha$ -acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso- $\alpha$ -acids. J. Inst. Brew. **106**, 2000, 169–178.

The column is after that dried under nitrogen stream and is washed by methanol to 5 ml flask and adjusted by methanol to graduated mark and mixed up.

10  $\mu$ l of this sample are injected on the column.

## 2.2 Chromatographic separation and determination

The column with reverse phase (Alltima C18, 5  $\mu$ m, 150x4,6 mm, Alltech) with precolumn C18 4x3 mm (Phenomenex) was chosen to analysis.

Mobile phase consist of two component part: A is ultraclean water (Millipore) with content max. 5 ppb organic compounds, acidified by phosphoric acid to pH 2.8, B is acetonitril (ACN) gradient grade quality (Sigma Aldrich).

The gradient used to separation: 0. min. 52% ACN, 40. min. 72% ACN.

The analysis takes 40 minutes including 15 minutes of equilibration.

Individual components were detected in UV area, in the case of iso-alfa acids it was 275 nm and in case of tetrahydroiso-alfa acids it was 253 nm.

The column temperature was 35 °C, the flow was 1.5 ml/min and 10  $\mu$ l were injected on the column.

The modular liquid chromatograph SpectraSYSTEM (TSP, USA) with DAD was used to analysis. Data acquisition and evaluation were realised by chromatographic software ChromQuest for Windows NT.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

The iso-alfa acids are eluted in 6 zones, where 3 zones agreed with trans- forms of co-humulone, n-humulone and ad-humulone and 3 zones agreed with cis- forms co-humulone, n-humulone and ad-humulone. The group of tetrahydroiso-alfa acids was eluted behind the group of iso-alfa acids separately (Fig. 1).

The tetrahydroiso-alfa acids are eluted only in 5 zones in described experimental conditions. The alpha acids, their possible presence we suppose, elute in the area of tetrahydroiso-alfa acids (Fig. 2)

The peak T4 coelutes with one form belonging to peak T5.

The alpha acids elute in two conspicuous zones without any interferences with tetrahydroiso-alfa acids and in one peak zone with interference with the last zone of tetrahydroiso-alfa acids. This fact does not hinder to qualitative evidence of tetrahydroiso-alfa acids besides the iso-alfa acids, but by quantitative determination this fact should be mentioned by calculation of an uncertainty of the determination.

The method was successfully used for the determination of cis- and trans-iso-alfa acids for many research samples and some commercial samples. The retention time of HPLC peaks in commercial beer samples were identical with peaks of tetrahydroiso-alfa acids (Fig. 3). With regard to relative bitterness value of tetrahydroiso-alfa acids 1.5–1.9 (relative bitterness of iso-alfa acids is 1.00) an addition of few mg/l of tetrahydroiso-alfa acids can improve sensory features of beer. For example the values from 2.9 mg/l of tetrahydroiso-alfa acids were found during storage in foreign lager beers by monitoring of bitter acids [5].

Due to the elution of iso-alfa acids and tetrahydroiso-alfa acids 6 and 5 zones respectively, the response factors are used as the ratio of standard concentrations and all areas corresponding standard. This calibration mode is used in brewing analytics conventionally (method EBC 7.9).

The limit of determination is influenced by a quality of detector namely by ratio signal / noise.

### Acknowledgements

This contribution has been supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the Research Centre 1M0570 “Research Centre for studies on component parts of barley and hop”.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 19. 11. 2009

Přijato k publikování / Accepted for publication: 4. 1. 2010

3. Harms, D., Nitzsche, F.: 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**, 2001, 28–31.
4. Jurková, M., Kellner, V., Čulík, J., Horák, T., Čejka, P.: Rychlá a účinná izolace iso- $\alpha$ -hořkých kyselin z piva metodou SPE. Kvasny Prum. **49**, 2003, 258–259.
5. De Keukeleire, D.: Fundamentals of beer and hop chemistry. Química Nova, **23**, 2000, 108–112.