

# RYCHLÁ A ÚČINNÁ IZOLACE ISO- $\alpha$ -HOŘKÝCH KYSELIN Z PIVA METODOU SPE

## EFFECTIVE AND EASY ISOLATION OF ISO-ALPHA ACIDS FROM BEER BY SPE METHOD

MARIE JURKOVÁ, VLADIMÍR KELLNER, JIŘÍ ČULÍK, TOMÁŠ HORÁK, PAVEL ČEJKA, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2

**Klíčová slova:** iso- $\alpha$ -hořké kyseliny, extrakce, SPE, HPLC

**Keywords:** iso-alpha-acids, extraction, SPE, HPLC

### 1 ÚVOD

Nespecifické spektrometrické stanovení jednotek hořkosti (metoda EBC 9.8.) plně neodráží skutečný sensorický vjem hořkosti piva. Lepších výsledků je možno dosáhnout, jestliže je hořkost piva vyjádřena jako koncentrace přítomných iso- $\alpha$ -hořkých kyselin [1, 2].

Specifické stanovení iso- $\alpha$ -hořkých kyselin je běžně prováděno metodami kapalinové chromatografie s UV detekcí při 270 nm (ECB 7.8 a EBC 7.4.2). Jedná se však o sloučeniny velice snadno podléhající oxidační degradaci, která je katalyzována stopovými množstvími kovů a dopadajícím světlem. Proto je úspěšnost stanovení iso- $\alpha$ -hořkých kyselin ovlivněna již počáteční fází izolačního postupu. Klasická extrakce kapalina-kapalina je vzhledem k uvedeným rizikům a zdlouhavosti postupu opouštěna a nahrazována šetrnější extrakcí na tuhé fázi (technika SPE), kde zatím největší uplatnění našly sorbenty s různými reverzními fázemi obvykle vázanými na silikagel [3]. Pro ještě účinnější extrakci organických sloučenin se stále více uplatňují sorbenty na polymerní bázi. Při izolaci iso- $\alpha$ -hořkých kyselin byla použita fáze s obchodním názvem STRATA X [4].

### 2 METODIKA

#### 2.1 Metoda HPLC

Analýza extraktů iso- $\alpha$ -hořkých kyselin z piva byla provedena metodou kapalinové chromatografie s UV detekcí při vlnové délce 270 nm. Byl použit modulární kapalinový chromatograf TSP 1000 (USA) vybavený detektorem s diodovým polem.

Analyty byly separovány na chromatografické koloně Nucleosil 100 C 18 Hop, 250 x 4 mm, zrnění 5  $\mu$ m s předkolonkou Nucleosil 100-5 C 18 Hop (Macherey Nagel). Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu (Merck) s vodou čistoty pro HPLC (Millipore) a kyselinou fosforečnou p.a. (Lachema): v:v:v/methanol:voda:kyselina fosforečná/640:345:14. K mobilní fázi byl přidán 1 ml EDTA ( $c=0,1$  mol.l<sup>-1</sup>), aby bylo zabráněno případnému katalytickému působení stopových kovů.

Iso- $\alpha$ -hořké kyseliny byly eluovány v isokratickém režimu. Pokud měly být stanoveny současně i zbylé (neisomerizované)  $\alpha$ -hořké kyseliny, následoval k jejich eluci gradient s methanolem vy-

kazujícím silnější eluční účinky. Teplota kolony byla udržována na 35 °C.

Použitá metoda splňuje požadavky klasické metody EBC 7.8.

#### 2.2 Příprava vzorků k analýze

Extrakce iso- $\alpha$ -hořkých kyselin na různých koncentračních úrovních z piva byla provedena pomocí nově navržené SPE metody pracující s polymerním sorbentem STRATA X (Phenomenex). Účinnost tohoto způsobu extrakce iso- $\alpha$ -hořkých kyselin byla porovnána s výsledky dosaženými klasickým extrakčním postupem v systému kapalina-kapalina na stejných pivech.

##### a) extrakční postup kapalina-kapalina

20 ml dokonale odpěněného piva bylo pipetováno do 100 ml Erlenmayerovy baňky se zábrusem obsahující 30 ml hexanu (Merck), 1 ml kyseliny chlorovodíkové ( $c=0,6$  mol.l<sup>-1</sup>) (Lachema) a 8–9 kousků tvrdého polyethylenu nebo skleněných kuliček zabraňujících vzniku emulze. Uzavřené baňky byly třepány po dobu 30 minut na orbitální třepačce (Bühler KS 15 A) při optimální rychlosti 250 kvůt za minutu. Po oddělení fází bylo 10 ml hexanové fáze odpipetováno do srdcovky a při 45 °C odpařeno na rotační vakuové odparce dosucha.

Odparek byl následně rozpuštěn v 1 ml methanolu a 10  $\mu$ l dávkováno na kolonu.

##### b) extrakční postup na polymerním sorbentu

Pro extrakci byl použit polymerní sorbent STRATA X 33  $\mu$ m 60 mg/3 ml.

Kolonka byla kondicionována 1,5 ml methanolu (Merck) a promyta 1,5 ml deionizované vody. Přes takto připravenou kolonku bylo přesáno 5 ml dokonale odpěněného piva. Kolonka byla promyta

1,5 ml roztoku 5 % methanolu v deionizované vodě. Poté byla vysušena ve vakuu (cca 30 s) a eluována methanolem (Merck) do výsledného objemu 1,5 ml. 10  $\mu$ l eluátu bylo dávkováno na kolonu.

#### 2.3 Standardy a způsob vyhodnocení

Pro kalibraci iso- $\alpha$ -hořkých kyselin byl použit mezinárodní kalibrační standard DCHA-Iso, ICS-I1 s obsahem 64,5 % iso- $\alpha$ -hořkých kyselin. Do 100 ml odměrky bylo naváženo přesně kolem 20 mg DCHA a doplněno po rysku methanolem (Merck) s 0,05% obsahem kyseliny fosforečné (85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Lachema). Na kolonu bylo dávkováno 10  $\mu$ l.

Pro kalibraci  $\alpha$ -hořkých kyselin byl použit mezinárodní kalibrační standard ICE2.

Vyhodnocení bylo provedeno změření ploch pík. Iso- $\alpha$ -hořké kyseliny eluují ve třech zónách odpovídajících iso-n-humulonu, iso-co-humulonu a iso-ad-humulonu. Iso- $\alpha$ -hořké kyseliny jsou vyhodnocovány společně po sečtení ploch pík.

V případě  $\alpha$ -hořkých kyselin jsou vyhodnocovány samostatně dva píky odpovídající co-humulonu a n+ad-humulonu.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci pořádání mezinárodní kruhové analýzy pro stanovení iso- $\alpha$ -hořkých kyselin byly na dodaná zahraniční piva aplikovány obě extrakční metody.

Tab. 1 podává jednak srovnání obou extrakčních postupů, jednak porovnání získaných výsledků s hodnotami mezinárodní kruhové analýzy.

Z tab. 1 je zřejmé, že hodnoty koncentrací iso- $\alpha$ -hořkých kyselin získané extrakcí na pevné fázi se méně odchylojí od reálného průměru. V případě

Tab. 1 Porovnání získaných výsledků stanovení iso- $\alpha$ -hořkých kyselin metodou SPE a klasickou extrakcí na základě kruhového testu

Vzorek č.	Klasická extrakce liq. – liq.	Extrakce SPE	Průměrný obsah dosažený v kruhovém testu	Směr. odchylka dosažená v kruhovém testu
[mg.l <sup>-1</sup> ]				
1	23,74	26,71	26,8	2,52
1	25,49	27,16		
2	5,96	7,03	7,7	1,77
2	5,09	7,44		
3	34,02	38,62	36,6	3,20
3	35,92	39,12		

vzorku č. 3 byla stanovena hodnota vyšší, než je mezinárodní průměr. Tato skutečnost může být vysvětlena poměrně velkým rozptylem udávaných hodnot jednotlivými laboratořemi, neboť postup způsobu izolace iso- $\alpha$ -hořkých kyselin nebyl dosud sjednocen a často jsou používány různé extrakční techniky včetně techniky extrakce kapalina-kapalina.

Na rozdíl od extrakce do kapalné fáze, která je zákonitě zatížena chybami (dlouhodobější vliv rizikových faktorů a zdoluhavost operace), což vede k nižší výtěžnosti a většímu rozptylu výsledků, vykazuje extrakce na pevné fázi nižší časovou náročnost a menší rozptyl výsledků, neboť jsou zde analyty při extrakci na pevné fázi vystaveny rizikovým faktorům relativně krátkou dobu. Určitou nevýhodou jsou pozorované rozdíly v kvalitě jednotlivých šarží SPE kolonek. Proto v současné době pokračuje na mezinárodní úrovni testování nové metody ohledně dosažené opakovatelnosti a reprodukovatelnosti v závislosti na použitých šaržích extrakčních kolonek.

#### Literatura

- [1] Forster, A., Beck, B., Koberlein, A., Schmidt, R.: Highly dissolving gradient HPLC with diode array detector for improved separation of hop bitter substances. Poster, 26. EBC-Congres, Maastricht, 1997.
- [2] De Keukeleire, D., Vindevogel, J., Szucs, R., Sandra, P.: The history and analytical chemistry of beer bitter acids. Trends in Analytical Chemistry 11, 1992, s. 275.
- [3] Simpson, N.: Solid-phase extraction. International Chromatography Laboratory 11, 1992, s. 7.
- [4] [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)

*Podle posteru na 20. PS dnech,  
9.–10. 10. 2003, Frýdek-Místek  
Do redakce došlo 7. 8. 2003*

**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, č. 9, s. 258–259.

Zatímco se pivovarská analytická veřejnost shodla na chromatografické metodě stanovení iso- $\alpha$ -hořkých kyselin v pivu (v mezilaboratorních testech je doporučována metoda EBC 7.8), pro vlastní izolaci iso- $\alpha$ -hořkých kyselin neexistuje žádné závazné ustanovení a každá laboratoř provádí extrakci těchto analytů svou metodou. Vedle klasické extrakce kapalina-kapalina se uplatňují též jiné způsoby izolace, zejména SPE.

Nový polymerní sorbent STRATA X, na rozdíl od dosud používaných reverzních fází

na bázi modifikovaného silikagelu, vyniká vysokou kapacitou a univerzálností použití. Je vhodný pro sloučeniny kyselé, basické i neutrální. Příprava extraktů k analýze je velmi rychlá a jednoduchá. Jako rozpouštědlo v případě izolace iso- $\alpha$ -hořkých kyselin stačí voda a methanol, případně jejich směs.

Práce předkládá použitý postup izolace, jako validační charakteristiky opakovatelnosti (variační koeficient 3,6 %) a výtěžnost metody (71 % pro mladé pivo).

Vypracovaný extrakční postup pro izolaci iso- $\alpha$ -hořkých kyselin z piva bude použit v mezinárodním kruhovém testu pro stanovení iso- $\alpha$ -hořkých kyselin v pivu, pořádaném analytickou laboratoří VÚPS Praha v rámci sdružení MEBAK.

**Jurková, M. – Kellner, V. – Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P.: Effective and easy isolation of iso-alpha acids from beer by SPE method.** Kvasny Prum. 49, 2003, No. 9, p. 258–259.

While the analytical public agreed on the chromatographic method for determination of iso-alpha acids in beer (the EBC 7.8. method is used in international trials) there is no obligatory method for extraction these compounds and every laboratory uses its own procedure.

Beside the classical liquid-liquid extraction many different ways are used to isolate target compounds, especially the SPE.

Unlike the reverse phases used based on modified silicagel, a new polymeric sorbent STRATA X exceeds by higher capacity and versatility has been tried. It is applicable to a wide spectrum of compounds: acidic, basic and neutral. The preparing of the samples to analyse is very quick and easy. In case of isolation of iso-alpha acids are sufficient solvents methanol, water and their mixtures.

This paper brings a method of isolation of iso-alpha acids from beer. Recovery (71 % for young beer) and reproducibility (3,6 %) are validation characteristics in this procedure.

This elaborated technique for extraction of iso-alpha acids from beer will be used by international trial analysis organized by the analytical laboratory of the Research Institute of Brewing and Malting in Prague for members of associations EBC and MEBAK.

**Jurková, M. – Kellner, V. – Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P.: Schnelle und wirkungsvolle Isolierung der Iso- $\alpha$ -Säuren vom Bier durch SPE Methode.** Kvasny Prum. 49, 2003, Nr. 9, S. 258–259.

Während der Iso- $\alpha$ -Bittersäurenbestimmung im Bier durch die chromatographische Methode ist die Bierfachöffentlichkeit vereinbart worden (in den Zwischenlaborprüfungen wird eine EBC Methode 7,8 empfohlen), über die eigene Iso- $\alpha$ -Isolierung von bitteren Säuren gibt es kein verpflichten-

des Verfahren und jedes Labor übt eine eigene Methode der Extraktion von diesen Komponente aus. Neben der klassischen Extraktion Flüssigkeit – Flüssigkeit werden auch andere Methoden der Isolierung, insbesondere SPE Methode, eingesetzt.

Zum Unterschied von bisher angewandten reversen Phasen auf Basis eines modifizierten Silikagels wird durch eine hohe Kapazität und Universalbarkeit der Anwendbarkeit ein neuer Polymersorbent STRATA X geprägt. Seine Anwendung ist für saure, alkalische und neutrale Verbindungen geeignet. Die Vorbereitung von Extrakten zur Analyse ist sehr schnell und einfach. Im Falle der Isolierung von Iso- $\alpha$ -Bittersäuren langt Wasser und Methanol bzw. ihre Vermischung als ein Lösungsmittel.

Der Artikel bringt das angewandte Isolierungsverfahren bei, als validation Charakteristik werden Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient 3,6 %) und Ausbeute der Methode (71 % für junges Bier) angeführt. Das für Iso- $\alpha$ -Säureisolierung vom Bier verarbeitete Verfahren wird in einem internationalen Kreistest durch das Analytische Labor des Forschungsinstitutes für Brauereien und Mälzereien (VUPS Prag) im Rahmen der Assoziation MEBAK angewandt.

**Юркова, М. – Келлер, В. – Чулик, Й. – Горак, Т. – Чейка, П.: Быстродействующее и эффективное изолирование изо-альфа кислот в пиве методом SPE.** Kvasny Prum. 49, 2003, No. 9, стр. 258–259.

Между тем как специалисты согласовали хроматографический метод для определения изо-альфа кислот в пиве (для межлабораторных тестов рекомендуется метод EBC 7.8), для собственной изоляции изо-альфа горьких кислот не существует обязательное положение – каждая лаборатория проводит экстрагирование этих аналитов собственным методом. Рядом с классическим экстрагированием жидкость-жидкость применяются также другие методы изолирования, именно SPE.

Новый полимерный сорбент STRATA X, в разницу от до сих пор применяемых реверсивных фаз на базе модифицированного силикагеля, отличается высокой емкостью и универсальными возможностями использования. Он подходит для соединений кислотных, основных и нейтральных. Подготовка экстрактов для анализа проходит быстро и просто. В качестве растворителя для изолирования изо-альфа кислот хватит вода и метанол, или их смесь.

В работе приводится используемая последовательность изолирования изо-альфа кислот. Характеристики действенности следующие: Повторимость (вариационный коэффициент 3,6 %) и степень извлечения (71 % для молодого пива).

Разработанная последовательность экстрагирования для изолирования изо-альфа кислот в пиве будет использована в международном тесте определения изо-альфа кислот в пиве, организованном аналитической лабораторией НИИ по пиву и солоду Прага в рамках MEBAK.

V článku autorů Josef Krýsl – Jiří Faměra „Negativní vliv vzduchu jako hnacího plynu na kvalitu čepovaného piva“ (Kvasný průmysl 7–8/2003) došlo v tabulce 2 na str. 186 u obsahu NO<sub>x</sub> ve vzduchu k uvedení chybného rozměru veličiny – místo g/m<sup>3</sup> má být správně μg/m<sup>3</sup>. Prosím čtenáře, aby si tuto chybu opravili a jim i autorům se omlouvám.

František Frantík, šéfredaktor