



■ Abb. 1: Mit der Verwendung von Hopfen (*Humulus*), einer Pflanzengattung innerhalb der Familie der Hanfgewächse, im Brauprozess wurde eine wichtige Komponente für den Geschmack des Bieres eingeführt.

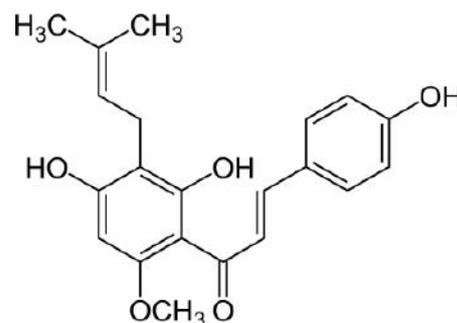
Mit UHPLC zur schnellen Biercharakterisierung

Hochdurchsatzanalyse von Xanthohumol und Humulinon in Bier

Für den Brauprozess, die Lagerung und den Charakter eines Bieres sind die Inhaltsstoffe des Hopfens wichtige Einflussfaktoren. Mittels UHPLC können diese für eine Abstimmung des Brauprozesses und zur Qualitätssicherung überwacht werden – und das in nur acht Minuten!

Die Geschichte des Bieres erstreckt sich über Jahrtausende und spiegelt die kulturelle, technologische und wirtschaftliche Entwicklung der Menschheit wider. Ursprünglich in antiken Zivilisationen wie Mesopotamien und Ägypten entwickelt, wurden im Laufe der Zeit das Bierbrauen und das Getränk selbst verfeinert, etwa von Mönchen im mittelalterlichen Europa.

Die Industrialisierung im 18. und 19. Jahrhundert brachte bedeutende technologische Fortschritte in der Bierproduktion mit sich und ebnete den Weg für die Massenproduktion und somit die Entstehung großer Biermarken. Weiterhin führten die Globalisierung im 20. Jahrhundert sowie das Aufkommen von Craft-Brauereien in den vergangenen Jahrzehnten zu einer Vielzahl



■ Abb. 2: Xanthohumol ist ein im Hopfen vorkommendes prenyliertes Flavonoid, dem wissenschaftliche Publikationen antioxidative, entzündungshemmende und antibakterielle Eigenschaften sowie eine Anti-Krebs-Wirkung zuschreiben.

Der Autor

Christopher Kuhlmann studierte Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster. Nach seinem Abschluss als Master of Science führte er seinen wissenschaftlichen Werdegang fort mit einer Promotion im Arbeitskreis für Analytische Chemie an der Universität Siegen. Als Produktspezialist für HPLC bei der Shimadzu Deutschland GmbH setzt er sein breites technisches und applikatives Wissen ein, um Kunden bei ihren analytischen Herausforderungen zu helfen.

von Veränderungen für die Bierindustrie. Heutzutage ist die Vielfalt an Biersorten, -stilen und -geschmacksrichtungen größer als je zuvor und die Kultur des Bierbrauens erlebt eine regelrechte Renaissance.

Hopfen – Geschmacksträger mit wichtigen Inhaltsstoffen

Mit der Verwendung von Hopfen (*Humulus*), einer Pflanzengattung innerhalb der Familie der Hanfgewächse, im Brauprozess wurde eine wichtige Komponente für den Geschmack des Bieres eingeführt. Im Hopfen befinden sich verschiedenste Inhaltsstoffe, die zum einen die Haltbarkeit des Bieres signifikant verbessern und zum anderen den Geschmack stark beeinflussen.

Xanthohumol ist eines der im Hopfen vorkommenden prenylierten Flavonoide. Ihm werden in wissenschaftlichen Publikationen zahlreiche Funktionen wie antioxidative, entzündungshemmende und antibakterielle Eigenschaften sowie eine Anti-Krebs-Wirkung zugeschrieben, die sich positiv auf die menschliche Gesundheit auswirken sollen [1]. Während des Würzekochens wird Xanthohumol allerdings zum Großteil zu Iso-xanthohumol isomerisiert [2], dem eine deutlich niedrigere krebshemmende Wirkung zugeschrieben wird. Hopfen enthält darüber hinaus weitere Inhaltsstoffe, wie z.B. Humulone, Iso- α - und β -Säuren, welche die Bitterkeit des Getränks beeinflussen und deshalb wichtige Parameter für den Biergeschmack sind.

Um die Zusammensetzung dieser wertvollen Verbindungen nach dem Brauprozess zu charakterisieren, wird in diesem Artikel eine Methode für die Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC) vorgestellt, in der Xanthohumol, Isoxanthohumol, Humulone, Iso- α -, α - und β -Säuren gleichzeitig analysiert werden können.

Robuste UHPLC-Methode

Für die Methodenentwicklung und die spätere externe Kalibration wurde ein Standardgemisch nach dem Schema in Abb. 3 (oben) angesetzt. Als Lösungsmittel diente angesäuertes Methanol. Für die hier gezeigten Analysen wurden folgen-



Abb. 3: Pipettierschema für die Herstellung der Standardlösung (oben) und für die Vorbereitung der Bierproben (unten).

de Konzentrationen der Standards verwendet: Xanthohumol 10 mg/l, Isoxanthohumol 10 mg/l, Humulon 20 mg/l, Iso- α -Säuren 10 mg/l, α -Säuren 20 mg/l und β -Säuren 12,5 mg/l. Für die externe Kalibration wurde eine Zehn-Punkte-Kalibration für die Analyten im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 20 mg/l vorbereitet, um den gesamten möglichen Konzentrationsbereich abzudecken. Das Bestimmtheitsmaß R² für die Kalibrationen lag bei >0,9990.

Für die Herstellung der Bierproben wurde fertig gebrautes Bier nach dem Schema in Abb. 3 (unten) vorbereitet. Nach dem Entgasen und Entfernen von Schwebstoffen wurde die Lösung lediglich filtriert und war im Anschluss fertig für die Analyse.

Im Anschluss an die Probenvorbereitung wurde eine UHPLC-Methode entwickelt, bei der Humulon und Iso- α -Säuren bei 270 nm mit einer Auslösung von ca. R=2 getrennt werden konnten. Die Chromatogramme für die finale analytische Methode sind in Abb. 4 (oben links) gezeigt. Isoxanthohumol (280 nm) taucht in diesen Chromatogrammen zwischen den Peaks von Humu-

lon und den Iso- α -Säuren auf, weist aber eine Auflösung von ca. R = 1,5 vom nächstgelegenen Peak auf. Die Peakgruppe der α - und β -Säuren (314 nm) eluiert im hinteren Teil des Chromatogramms und weist ebenfalls eine zufriedenstellende Auflösung auf. Lediglich bei einem Peakpaar, den α -Säuren, überlappen die Peaks mit einer Auflösung von ca. R=0,7. Abschließend wird Xanthohumol (370 nm) in der Mitte des Chromatogramms mit großem Abstand zu anderen Peaks identifiziert. Bemerkenswert ist, dass diese UHPLC-Methode eine Analysenzeit von nur acht Minuten benötigt und damit eine Analytik mit einem hohen Durchsatz ermöglicht. Die analytischen Parameter für diese Messmethode sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Für die anschließende Charakterisierung von unterschiedlichen Biersorten wurden diese Proben nach der in Abbildung 3 aufgeführten Probenvorbereitung hergestellt und analysiert. Im Vergleich zum Standardchromatogramm können die unterschiedlichen Anteile der Hopfeninhaltsstoffe in den Messungen für die Biere 1 bis 3 gut verglichen werden.

System	Nexera X3
Säule	Shim-pack™Velox C18 (50 mm × 3,0 mm I.D., 1,8 μ m)
Mobile Phase A	10 mmol/L (Natriumphosphatpuffer (pH 2,6) + 0,2 mmol/L EDTA*2 Na aq.
Mobile Phase B	Methanol
Flussrate	0,7 mL/min
Zeitprogramm	B Konz. 50% (0 min) – 90% (6 min) – 90% (7 min) – 50% (7,01-8 min)
Ofentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	5 μ L
Detektor	PDA (SPD-M40), UHPLC-Zelle

Tab. 1: Analytische Messbedingungen.

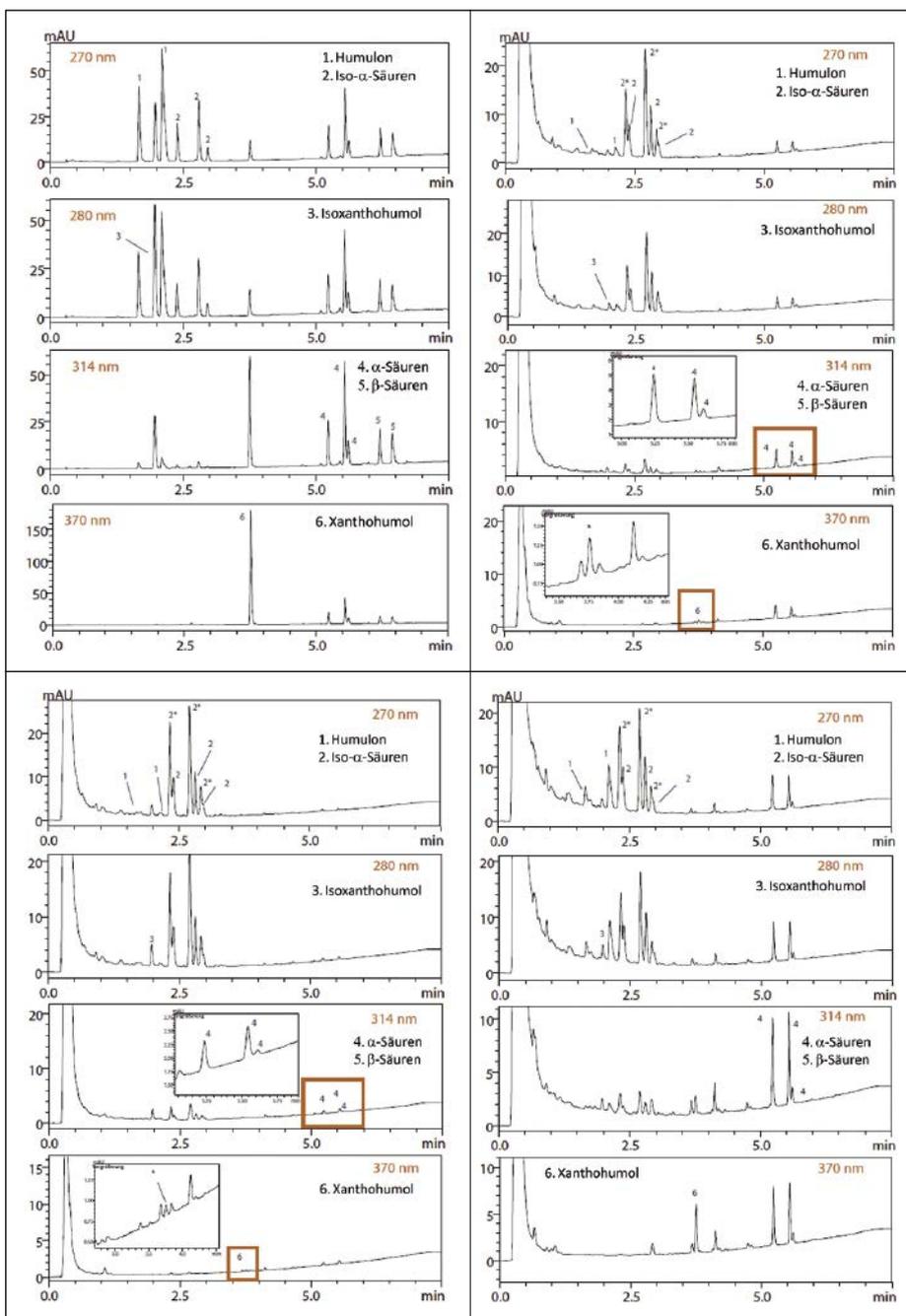


Abb. 4: Chromatogramme des Standardmix (oben links), von Bier 1 (oben rechts), Bier 2 (unten links) und Bier 3 (unten rechts).

Die erhöhte bzw. unruhigere Basislinie in den Chromatogrammen der Proben wird durch die Getränkematrix verursacht und der am Anfang des Chromatogramms auftauchende Peak wird durch andere Verbindungen im Bier hervorgerufen, die nur schlecht mit der stationären Phase interagieren. Aus dem Vergleich der Biere wird offensichtlich, dass der Anteil von Humulon und Iso- α -Säuren bei allen drei Biere deutlich ausgeprägt und komplex ist. Unterschiede bei den Biere zeigen sich deutlicher bei den Konzentrationen der α -Säuren (Bier 1: 3,86 mg/l, Bier 2: 1,39 mg/l, Bier 3: 9,65 mg/l) und beim Anteil des Xanthohumols (Bier 1: 0,052 mg/l, Bier 2: 0,012 mg/l, Bier 3: 0,594 mg/l).

Vor allem bei Bier 2 (Abb. 4, unten links) sind beide Substanzgruppen nur gering vertreten, wäh-

rend bei Bier 3 (Abb. 4, u.r.) sowohl die α -Säuren als auch das Xanthohumol deutlich höhere Konzentrationen aufweisen. Zusätzlich zur Quantifizierung wurden für die Hopfeninhaltsstoffe ein Probenwiederfindungstest und ein Reproduzierbarkeitstest durchgeführt (jeweils sechs Wiederholungsmessungen). Hierbei konnte über alle Substanzgruppen hinweg eine Wiederfindung von <9% erzielt werden und das Ergebnis des Reproduzierbarkeitstests lag bei 8% und besser.

Fazit

Die Inhaltsstoffe aus dem Hopfen und deren Anteile spielen für die Charakterisierung und Qualitätssicherung von Bier eine entscheidende



© Marina Lohrbach - stock.adobe.com

Rolle und beeinflussen den Geschmack und die Haltbarkeit des Getränks deutlich. Mit der vorgestellten UHPLC-Methode ist es möglich, die Verbindungen Xanthohumol, Isoxanthohumol, Humulon, Iso- α -Säuren und α - β -Säuren im Bier zu analysieren und zu quantifizieren – und das in nur acht Minuten Laufzeit je Messung.

Autor: Dr. Christopher Kuhlmann, Produktspezialist HPLC, Shimadzu Deutschland

Kontakt:
Shimadzu Deutschland GmbH
Duisburg
Dr. Christopher Kuhlmann
Tel.: +49 203/7687-0
info@shimadzu.de
www.shimadzu.de/analytics

Literatur:
[1] C. Gerhäuser, A. Alt, E. Heiss et al.: Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. In: Molecular Cancer Therapeutics. 1. Jahrgang, Nr. 11, September 2002, S. 959–969.
[2] A. Forster, A. Gahr, M. Ketterer, B. Beck und S. Massinger: Xanthohumol in Bier – Möglichkeiten und Grenzen einer Anreicherung. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 55(9/10): 184–194, 2002.