コンプリヘンシブ 2D-LC による各種ビールのフィンガープリンティング分析

Agilent 1290 Infinity 2D-LC システム

アプリケーションノート

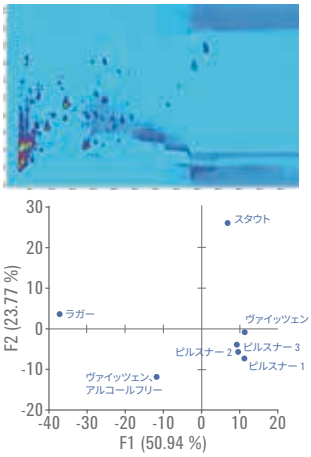
食品試験・農業

著者

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

ビールは成分が非常に複雑なアルコール飲料で、水、大麦または小麦を基本原料として製造されており、多くのビールにはホップも使われています。ビール独特の苦味は主に、麦汁煮沸中にホップに含まれるα酸から生成されるイソα酸に由来します。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity 2D-LC による各種ビールのコンプリヘンシブ 2D-LC 分析について説明します。一次元目および二次元目にそれぞれアルカリ性および酸性の pH 値で C18 カラムを使用することによって良好な直交性を得ることができました。ビールの苦味化合物は、標準物質と MS 検出による比較分析にもとづいて同定されました。ノンターゲット、マルチサンプル分析 (フィンガープリンティング分析) により、さまざまな種類のビールを分析して分類することができました。



Agilent Technologies

はじめに

ビールは、デンプンの糖化と、その結果得られた糖の発酵によって作られるアルコール飲料です。ビールの基本原料は、水、大麦または小麦で、多くのビールはホップも基本原料としています[1～2]。ビールの製造段階には製麦、醸造、発酵、熟成があります。ビールには 800 種類以上の有機化合物が含まれ、その成分は非常に複雑です。ビールごとに異なる特有の味わいは主に、水のミネラル含有量、使用した原材料の種類、醸造メソッドの違いによって決まります。また、ビールの発酵には 2 種類あり、エールやジャーマンヴァイッツェンビールなどの上面発酵によるものと、ラガーやジャーマンピルスナービールなどの下面発酵によるものがあります[1]。

ビールの苦味は、ホップ (*Humulus lupulus* L.) の実、ペレット、麦汁煮沸中の抽出物を加えることによって作り出されます。ホップは、主に *n*-、co-、ad-ホモログの形で存在するα酸 (フムロン) と β酸 (ルプロン) を含んでいます。ほぼ無味のホップα酸は麦汁煮沸中にビール独特の苦みや泡の安定を生み出すイソα酸 (イソフムロン) に変化します。イソα酸は光感応性があり、光曝露により異臭 (日光臭) を発生します[3～5]。このため醸造業界では、テトラヒドロイソα酸などの還元イソα酸を使用してビールの耐光性と泡の安定性を強化します。ドイツでは天然のホップ化合物のみの使用を命じる *Reinheitsgebot* (ビール純粋令) によって還元イソα酸の添加が禁止されています[4]。

ホップ製品に含まれるα酸とβ酸や、ビールに含まれるイソα酸および還元イソα酸は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と紫外線 (UV) 検出器または質量分析 (MS) 検出器によって分析できます[3～5]。以前のアプリケーションノートでは、ビール中のイソα酸および還元イソα酸の定量について説明しました[6]。

ホップはα酸およびβ酸のほかに多くのポリフェノール系化合物も含んでおり、いくつかはビール特有の苦味を作り出します。最も重要なポリフェノール系化合物は、キサントフモール、イソキサントフモール、デスメチルキサントフモールなどのプレニルフラボノイドです[3～5]。

図 1 は、イソα酸、還元イソα酸、キサントフモールに関連するプレニルフラボノイドの構造を示しています。

ビールは組成が非常に複雑であるため、ピークキャパシティが高いコンプリヘンシブ二次元液体クロマトグラフィー (コンプリヘンシブ 2D-LC) による包括的な分析が最適です。このアプリケーションノートでは、分析対象のビールのサンプルの分類を可能にするさまざまな種類のビールのフィンガープリンティング分析を説明します。

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションは、次のモジュールで構成しました。

- 2 台の Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity オートサンプラ (G4226A)、1290 Infinity サーモスタット (G1330B) 付き
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 本の 60 µL ループを装着した 2 ポジション/4 ポートデュオバルブ (2D-LC バルブヘッド、1,200 bar (p/n 5067-4214)) を搭載
- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)、光路長 60 mm の Max-Light カートリッジセル (G4212-60007) を搭載

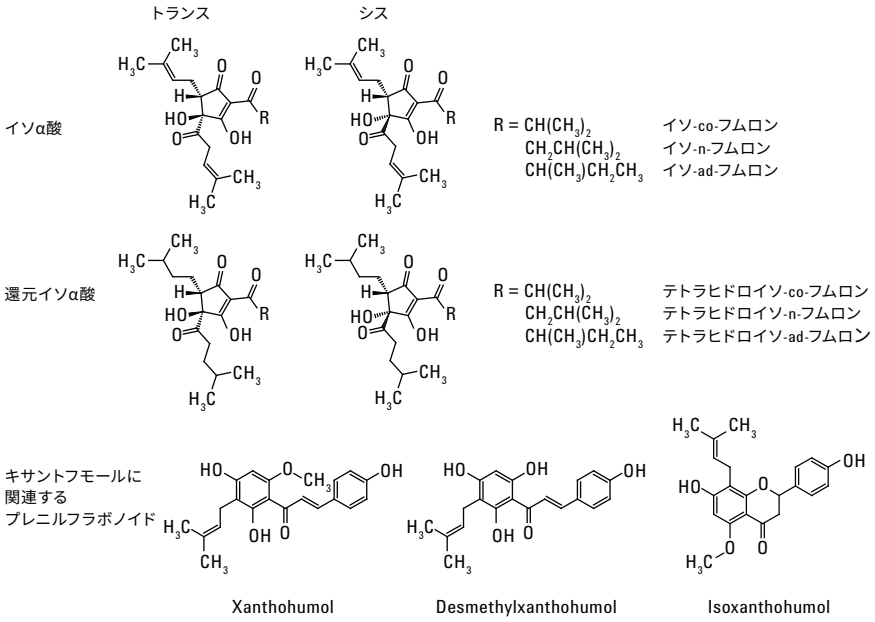


図 1. イソα酸、還元イソα酸、キサントフモールに関連するプレニルフラボノイドの構造

質量分析には、Agilent Jet Stream デュアルエレクトロスプレーイオンソース (G1958-65538) を装着した Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムを使用しました。

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition リビジョン C.01.06 [61] と Agilent 1290 Infinity 2D-LC Acquisition ソフトウェア製品、バージョン A.01.01 [26]
- Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア、Agilent 6200 シリーズ TOF/6500 シリーズ Q-TOF 用の LC/MS データ取り込み (バージョン B.05.01)、定性分析 (バージョン B.06.00)
- GC Image LCxLC Edition ソフトウェア、2D-LC データ分析用 (米国ネブラスカ州リンカーン、GC Image 社製)

カラム

一次元目

Agilent ZORBAX Extend-C18 ナローボア RR、2.1 × 100 mm、3.5 µm (部品番号 761753-902)

二次元目

Agilent Poroshell HPH-C18、4.6 × 50 mm、2.7 µm (部品番号 699975-702)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリルおよびエタノールは、Merck 社 (ドイツ、ダルムシュタット) から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブレンカートリッジを備えた Milli-Q Integral システム (米国マサチューセッツ州ベルリカ、Millipak、EMD Millipore 社) で精製しました。DCHA-ISO、ICS-I3 (精製調製されたトランスイソα酸のジシクロヘキシルアミン塩) と Tetra ICS-T2 (シス異性体とトランス異性体両方を含む精製調製されたテトラヒドロイソα酸) は、Labor Veritas AG 社 (スイス、チューリッヒ) から購入しました。酢酸アンモニウムはSigma-Aldrich 社 (ドイツ、シュタインハイム)、アンモニア溶液はMerck 社 (ドイツ、ダルムシュタット) から購入しました。ギ酸 (FA) は Agilent より調達しました (部品番号 G2453-86060)。

サンプルとサンプル前処理

各種ビールは地域の小売店で購入しました (ドイツ)。ビールのサンプルは、攪拌し (10 分) 超音波処理 (10 分) して脱気しました。サンプルは HPLC システムへ注入する前に 1 mL プラスチックシリンジと Captiva プレミアムシリンジフィルタ、再生セルロース、15 mm、0.45 µm (部品番号 5190-5109) を使用してろ過しました。

コンプリヘンシブ 2D-LC メソッド

一次元目のポンプ	
溶媒 A	5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、アンモニアで pH = 9.95 に調整
溶媒 B	アセトニトリル/エタノール (60/40、v/v)
流量	0.075 mL/min
グラジエント	0 分 – B 2 % 10 分 – B 2 % 40 分 – B 40 % 60 分 – B 50 % 61 分 – B 95 % 70 分 – B 95 %
ストップタイム	70 分
ポストタイム	15 分
二次元目のポンプ	
溶媒 A	水 + 0.25 % ギ酸
溶媒 B	アセトニトリル + 0.25 % ギ酸
流量	4.0 mL/min
グラジエントおよびグラジエントモジュレーション	0.00 分 B 5 %、20 分 B 5 %、43 分 B 30 %、44 分 B 70 %、49 分 B 70 %、50 分 B 55 % 0.24 分 B 40 %、20 分 B 40 %、43 分 B 85 %、44 分 B 92 % 0.25 分 B 5 %、20 分 B 5 %、43 分 B 30 %、44 分 B 70 %、49 分 B 70 %、50 分 B 55 % 0.35 分 B 5 %、20 分 B 5 %、43 分 B 30 %、44 分 B 70 %、49 分 B 70 %、50 分 B 55 %

一次元目と二次元目のグラジエントを図 2 に示します。

カラムコンパートメント

- 右側の一次元目のカラムは 25 ° C
- 左側の二次元目のカラムは 30 ° C

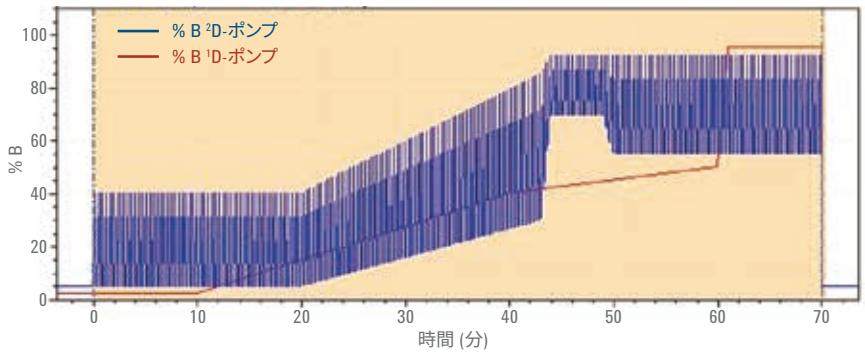


図 2. 一次元目と二次元目のグラジエント

2 ポジション/4 ポートデュオバルブ

2 ポジション/4 ポートデュオバルブは、二次元目の 21 秒のモジュレーションサイクルが終了するたびに自動的に切り替えました。ループは並流方式で使用しました (ループに対する充填と溶出が同じ方向)。

オートサンプラ

注入量	10 µL
サンプル温度	6 °C
ニードル洗浄	6 秒、メタノール

ダイオードアレイ検出器

検出前に、二次元目のカラムからの溶出液は T ピースで DAD と MS に約 7:1 の比で分配し、ピークの広がりを最小にするために、T ピースから MS への接続には内径 0.075 mm のキャピラリ (長さ 340 mm) を使用しました。

波長	270 nm/4 nm、参照値 395 nm/100 nm
データレート	80 Hz

質量分析計

6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムは、ネガティブイオン化モード、取り込みレート 10 スペクトル/秒、および次の Agilent Jet Stream ESI ソース条件で使用しました。

ガス温度	300 °C
ガス流量	9 L/min
ネブライザ	50 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリ	-3,000 V
ノズル	-1,000 V

結果と考察

ビールのフィンガープリンティング分析のためのコンプリヘンシブ 2D-LC メソッドを開発することができました。以前に記述されたビール中のイソα酸と還元イソα酸の分析と同様に、一次元目の分離ではアルカリ pH で Agilent ZORBAX Extend-C18 カラムを使用しました [4]。二次元目では酸性 pH で Agilent Poroshell HPH-C18 カラムを使用しました。一次元目と二次元目の分離における pH 値の違いにより異なる選択性を得て直交性を強化しました。モジュレーションサイクルごとに二次元目のカラムに一次元目のアルカリ性溶出物を注入するため、二次元目ではアルカリ性の条件下で安定したカラムを使用しました。

開発したコンプリヘンシブ 2D-LC メソッドを使用し、7 種類のビールサンプル (3 種類のジャーマンピルスナービール、1 種類のジャーマンヴァイツェンビール、1 種類のアルコールフリーのジャーマンヴァイツェンビール、1 種類のアイリッシュスタウトビール、1 種類のアメリカンラガービール) を 3 回分析しました。図 3 は、1 種類のジャーマンヴァイツェンビール、1 種類のジャーマンピルスナービール、1 種類のアメリカンラガービールを波長 270 nm で UV 検出したクロマトグラムを示しています。一次元目および二次元目の分離においてそれぞれアルカリ pH 値および酸性 pH 値で C18 カラムを使用することによって、適切な範囲の二次元分離空間を実現できたことが分かります。さらに、3 種類のビールに対してピークパターン (フィンガープリント) の違いも観察できます。

図 3 では、イソα酸および還元イソα酸のピークにマークを付けています。標準物質 (トランスイソα酸の混合物と還元シスイソα酸およびトランスイソα酸の混合物を分析) と MS 検出

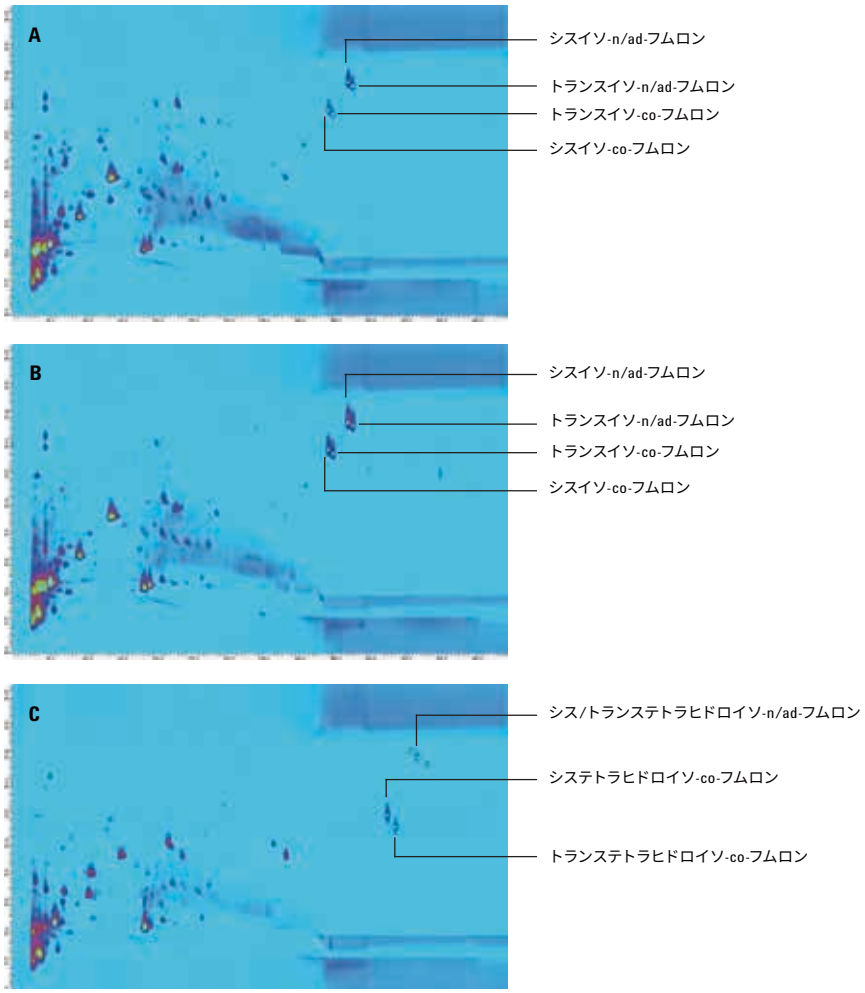


図 3. 270 nm で UV 検出し、各種ビールサンプルの分析から得られたクロマトグラム。
A) ジャーマンヴァイツェンビール、B) ジャーマンピルスナービール、C) アメリカンラガービール

による比較分析をもとに同定しました。図 4 に例として、還元シスおよびトランスイソα酸の標準混合物の分析 (A) とアメリカンラガービールの分析 (B) から得られたシステトラヒドロイソ-co-フムロンのピークの質量スペクトルを示しています。質量スペクトルはきわめて類似しており、$[M-H]^-$ ピークは標準混合物およびアメリカンラガービールのそれぞれの分析について 0.9 ppm および 0.6 ppm の質量差を示しました。

また、ジャーマンビールおよびアイリッシュスタウトビールはすべてイソα酸を含んでいましたが還元イソα酸は含まれていませんでした。これはドイツの *Reinheitsgebot* (天然ホップ化合物のみの使用を許可) に準拠したビール醸造から予測できるとおりです。逆に、アメリカンラガービールには還元イソα酸が含まれており、イソα酸は検出されませんでした。

以前のアプリケーションノートに記載されているように、さまざまなサンプルの比較分析と分類には、LCxLC ソフトウェアを使用して各サンプルに含まれるすべての成分を比較するノンターゲット、マルチサンプル分析を実行できます [7]。ノンターゲット、マルチサンプル分析ではリテンションタイムおよびピークボリュームにおいて良好な再現性が必要です。Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションはこの良好な再現性を提供します [8]。

各種ビールの比較と分類のために、コンプリヘンシブ 2D-LC 分析と波長 270 nm での UV 検出器から得られたクロマトグラムを使用しました。LCxLC ソフトウェアを用いてベースライン補正とピーク検出により各クロマトグラムを処理した後、Image Investigator ソフトウェア (LCxLC ソフトウェアの機能の一部) を使用してクロスサンプル特徴マッチングを実行しました。この処理中、すべてのクロマトグラムがアライメントされ、合成クロマトグラムが作成されました。合成クロマトグラムにはすべてのクロマトグラムからのすべてのピークが表示され、ピーク領域の特徴 (特徴領域) の決定に使用することができます。各クロマトグラムについて、決定した特長領域それぞれのパーセントレスポンスが計算されます。各特徴領域とそれぞれのパーセントレスポンスを使用して各種ビールの比較分析と分類ができます。

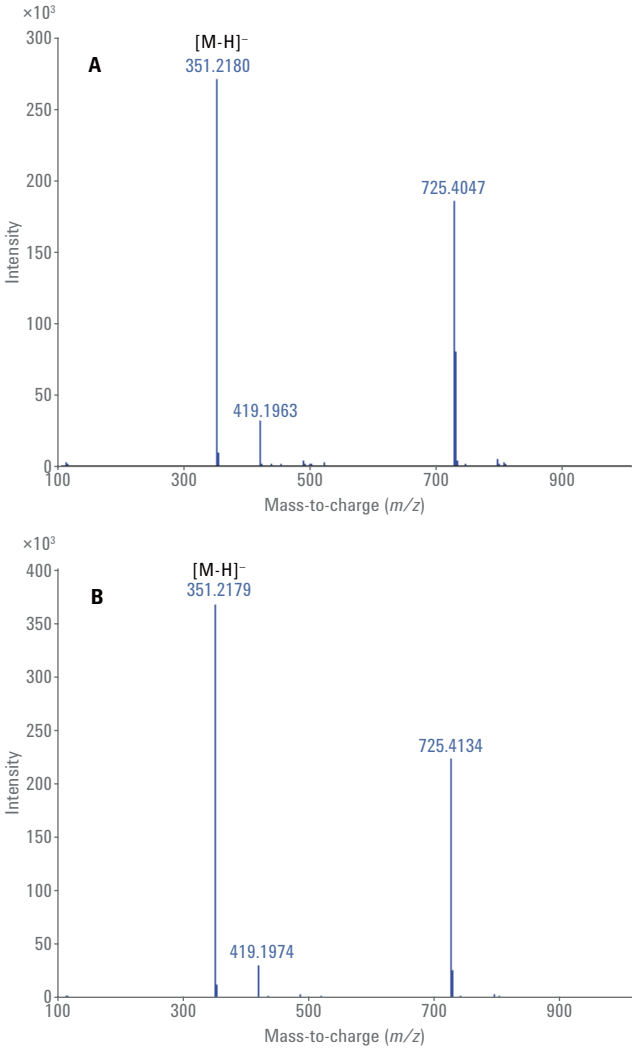


図 4. 還元シスおよびトランスイソα酸の標準混合物の分析 (A) とアメリカンラガービールの分析 (B) から得られたシステトラヒドロイソ-co-フムロンのピークの質量スペクトル

分析したビールサンプルを主成分分析 (PCA) によって分類しました。このために、3 回の繰り返し分析から各ビールサンプルの特徴領域の平均パーセントレスポンスが計算されました。図 5 に示すように、PCA を用いてビールの種類に対応してビールサンプルを分類できます。主要な 3 つの成分 (F1 ～ F3) によって約 88 % のデータの分散が説明されます。F1 と F2 を使用すると、アメリカンラガービール、アイリッシュスタウトビール、アルコールフリーのヴァイツェンビールは相互に、かつ分析した 3 種類のピルスナービールおよびヴァイツェンビールのグループとは明確に区別することができます。さらに F3 により、近くにグループ化される 3 種類のピルスナービールとヴァイツェンビールを区別できます。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity 2D-LC による各種ビールのコンプリヘンシブ 2D-LC 分析について説明しました。一次元目および二次元目にそれぞれアルカリ性および酸性の pH 値で C18 カラムを使用することによって良好な直交性が得られました。苦いビールの化合物 (イソα酸および還元イソα酸) の同定は、標準物質および MS 検出による比較分析をもとに実施されました。LCxLC ソフトウェアによるノンターゲット、マルチサンプル分析とその後の主成分分析によって、分析した各種ビールを分類できました。

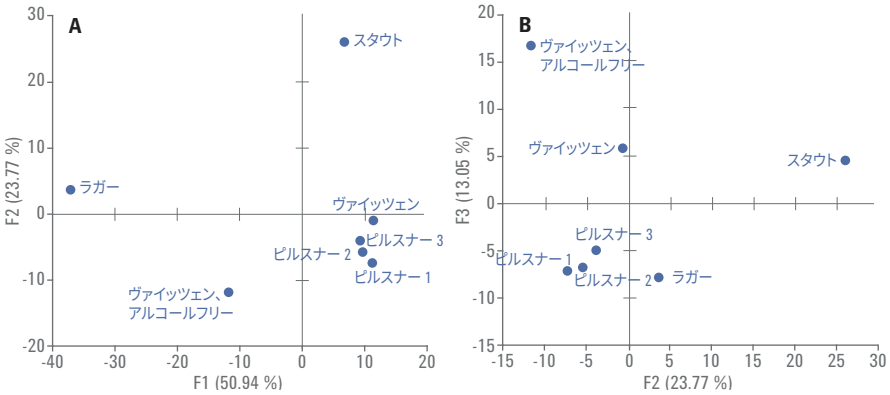


図 5. 7 種類のビールサンプルの主成分分析。最初の 3 つの主成分 (F1～F3) により、データの分散の約 88 % が説明されました。

参考文献

1. Araujo, A. S; *et al.* Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. *Analyst* 2005, *130*, 884-889.
2. Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Beer (accessed October 15, 2014)
3. Intelmann, D; *et al.* LC-MS/MS Quantitation of Hop-Derived Bitter Compounds in Beer Using the ECHO Technique. *J. Agric. Food Chem*. 2009, *57*, pp 1172-1182.
4. Vanhoenacker, G; *et al.* Analysis of iso-alpha-acids and reduced iso-alpha-acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2004, *1035*, pp 53-61.
5. Ceslova, L.; *et al.* Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, pp 7249-7257.
6. S. Schneider, Onsite Quality Control of Beer, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-3474EN, 2013.
7. S. E. Reichenbach, E. Naegele, 2-Dimensional separation of polyphenols in beverages using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution and software-assisted 2D-LC data analysis for comparison of ingredients, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-1455EN, 2013.
8. E. Naegele, Performance evaluation of the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution for comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0138EN, 2012.

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan, February 1, 2015
5991-5521JAJP

Agilent Technologies