



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Studies of iso-alpha-acids: analysis, purification, and stability.

Khatib, Alfi

Citation

Khatib, A. (2006, October 10). *Studies of iso-alpha-acids: analysis, purification, and stability*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4860>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4860>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Hop (*Humulus lupulus* L.) is een klimmende kruidachtige plant, behorende tot de familie van de Cannabaceae. De vrouwelijke bloemen van hop zijn een ingrediënt van bier, en geven de typische bittere smaak, en dragen bij aan de stabiliteit van het schuim en de kleur. De bestanddelen van hop die met name verantwoordelijk zijn voor deze eigenschappen zijn de α -zuren. De belangrijkste daarvan zijn: humulone, cohumulone en adhumulone. Tijdens het brouwproces van bier worden deze zuren ieder ge-isomeriseerd in een paar van *trans/cis*-iso- α -zuren: *trans/cis* iso-humulone, cohumulone, en adhumulone.

Het doel van dit promotie onderzoek was het ontwikkelen van methodes voor de analyse (**Hoofdstuk 2 en 7**) en de zuivering (**Hoofdstuk 3-5**) van de iso- α -zuren. Daarnaast is bestudeerd hoe de stabiliteit van de iso- α -zuren kan worden verbeterd (**Hoofdstuk 6**), aangezien deze stoffen snel afbreken onder invloed van licht of blootstelling aan lucht.

In dit project zijn twee verschillende methodes ontwikkeld voor de zuivering. De eerste methode (**Hoofdstuk 3**) is ontwikkeld voor de productie van een geïsomeriseerd hop extract dat vrij is van de *trans*-iso- α -zuren. Dit extract bevat dus slechts het mengsel van *cis*-iso-humulone, *cis*-iso-cohumulone en *cis*-iso-adhumulone. Verwijdering van de *trans*-isomeren kan gunstig zijn omdat zij gevoeliger zijn voor oxidatie dan hun verwante *cis*-isomeren, waardoor zij minder stabiel zijn. Bovendien is beschreven dat de *trans*-isomeren minder bitter zijn.. Het bewerkte extract kan toegepast worden in het bierbrouw proces voor het verbeteren van de stabiliteit van bier.

In **Hoofdstuk 3** wordt een methode beschreven voor het scheiden van een mengsel van *cis*-iso- α -zuren van hun *trans*-isomeren, met behulp van β -cyclodextrine. Er is bepaald dat optimale complexatie, voor productie van de zuiverste *cis*-isomeren, werd bereikt met water als oplosmiddel, een temperatuur van 70 °C, een verhouding tussen β -cyclodextrine en water (w/v) van 1:8, en een molaire verhouding tussen iso-A-zuren en β -cyclodextrine van 1:1. Na een precipitatie periode twee dagen werd het supernatant, dat de *cis*-isomeren bevat, gefilterd door middel van ultra-filtratie om niet gecomplexeerd β -cyclodextrine te verwijderen.

De zuivere *trans*-isomeren werden verkregen met behulp van dezelfde methode, maar dan met een molaire verhouding tussen iso- α -zuren en β -cyclodextrine van 4:1. De *trans*-isomeren kunnen worden vrijgemaakt uit het β -cyclodextrine complex door elutie met methanol. De ontwikkelde methode is veelbelovend voor de grootschalige productie van de zuivere stereo-isomeren.

De tweede methode voor zuivering (**Hoofdstuk 4**) is ontwikkeld voor de productie van de individuele iso- α -zuren. De zuivere, individuele iso- α -zuren zijn nodig als referentie standaarden voor de analyse van bier en in brouwonderzoek bij de bestudering van parameters die invloed hebben op de kwaliteit van bier. Vergaande studies naar de eigenschappen van de verschillende iso- α -zuren worden gehinderd door het feit dat de zuivere stoffen moeilijk te verkrijgen zijn omdat de bestaande zuivering methoden, kwalitatief noch kwantitatief, niet in staat zijn om aan de vraag te voldoen. De isolatie met behulp van preperatieve HPLC is tijdrovend en kostbaar. Andere methoden, die gebruik maken van foto-isomerisatie en DCHA-zouten, leveren enkel de *trans*-isomeren op. Daarom is er een duidelijke noodzaak voor de ontwikkeling van een efficiënte, grootschalige scheidingsmethode voor de productie van hoogwaardige standaarden van de individuele iso- α -zuren. Om dit te bereiken is in dit project gebruik gemaakt van centrifugale partitie chromatography (CPC) in combinatie met β -cyclodextrine complexatie.

Hermans-Lokkerbol en Verpoorte (1994b) zijn er al eerder in geslaagd om met behulp van CPC de zuivere individuele α -zuren te isoleren uit een ruw supercritisch CO₂ extract van hop. In verhouding tot preperatieve HPLC is deze methode efficiënter, door een lager gebruik van oplosmiddelen en bovendien minder tijdrovend. De α -zuren die op deze wijze worden verkregen kunnen individueel worden geïsomeriseerd tot een zuiver paar van *trans/cis*-iso- α -zuren. De uitdaging die overblijft is vervolgens de scheiding van ieder *trans*- en *cis*-paar. Voor dit doel is in deze studie gebruik gemaakt van β -cyclodextrine (**Hoofdstuk 4**). Een volledige scheiding van *trans*- en *cis*-iso- α -zuren is uitgevoerd met behulp van β -cyclodextrine in ethanol/water (1:2) als oplosmiddel. Het mengsel werd verwarmd bij een temperatuur van 50 °C voor 30 minuten voor complexatie. De optimale molaire verhouding tussen iso- α -zuren en β -cyclodextrine was 1:1 en de incubatietijd benodigd voor precipitatie varieerde tussen 9 en 48 uur, afhankelijk van het type iso- α -zuur. Vrijmaken van de gecomplexeerde stoffen uit het cyclodextrine complex werd eenvoudig bereikt door elutie met methanol. De zuiverheid van de geïsoleerde stoffen

was meer dan 95% volgens HPLC analyse en de recovery was rond de 50%, hetgeen nog verhoogd zou kunnen worden door verdere optimalisatie van het proces. Bevestiging van de chemische structuur van de isolaten werd verkregen door ^1H -, ^{13}C -, en twee-dimensionale NMR (COSY, HSQC, HMBC) analyses, gecombineerd met electrospray-ionisatie massa spectroscopie, zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**.

Een ander doel van dit promotie onderzoek was het ontwikkelen van een analytische methode voor kwalitatief onderzoek naar de iso- α -zuren met behulp van HPLC en NMR. In **Hoofdstuk 2** wordt de ontwikkeling beschreven van een HPLC-systeem dat kan worden toegepast in het geval dat de zuivere iso- α -zuren worden gebruikt als referentie standaarden. Eerder ontwikkelde HPLC-systemen maakten als referentie standaard enkel gebruik van het dicyclohexylamine (DCHA) zout van de *trans*-iso- α -zuren, aangezien de *trans*-isomeren zelf te instabiel waren. Om zuiver standaarden van de iso- α -zuren te verkrijgen hebben we een eenvoudige methode ontwikkeld voor de isolatie van de afzonderlijke iso- α -zuren, zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**. Deze methode maakt het mogelijk om voor HPLC analyse zowel de *trans*- als de *cis*-isomeren in vrije vorm te verkrijgen, in plaats van in de vorm van het DCHA zout complex. Een scheiding met hoge resolutie werd verkregen in een run-tijd van slechts 25 minuten. De UV-spectra van de zuivere stoffen zijn behoorlijk verschillend in dit systeem. Dit gedrag heeft implicaties voor de kwantitatieve analyse van de iso- α -zuren en maakt het mogelijk om de individuele iso- α -zuren te kunnen onderscheiden tijdens HPLC-UV analyse, hetgeen tot dusver niet mogelijk was.

Afgezien van de iso- α -zuren zijn er vele andere stoffen die invloed hebben op de kwaliteit van bier. Om die reden is er een behoefte aan een brede analyse methode die het mogelijk maakt om een grote variatie aan stoffen, inclusief de iso- α -zuren, simultaan te kunnen analyseren. Vele methoden, zoals HPLC, GC en capillaire elektroforese, zijn slechts in staat om een beperkte groep stoffen in een enkele keer te analyseren. Daarnaast is er de mogelijkheid dat stoffen in de kolom kunnen blijven steken. Om deze nadelen te ontlopen is NMR toegepast in deze studie. De kwantitatieve data die verkregen wordt met NMR analyse is beter dan die verkregen met overige methoden, aangezien NMR analyse de unieke eigenschap heeft dat de intensiteit van een proton signaal direct proportioneel is met de molaire concentratie van de geanalyseerde stof. Dit betekent dat de relatieve verhoudingen tussen componenten in het monster direct kunnen worden bepaald, waardoor de constructie van een calibratie curve voor iedere individuele component overbodig wordt.

Ondanks de onmiskenbare aantrekkelijkheid van NMR voor de analyse van bier, zit er een groot nadeel in de complexiteit van de verkregen NMR-spectra. Deze complexiteit bemoeilijkt in grote mate elke poging om componenten in bier te identificeren. Echter, in deze studie is dit probleem aangepakt door gebruik te maken van twee-dimensionale '*J-resolved*' NMR spectroscopie (**Hoofdstuk 7**). In het *J-resolved* spectrum worden de spin-spin koppelingen tussen de protonen geprojecteerd op een tweede as. Deze toegevoegde variabelen verhogen in grote mate de resolutie van het NMR-spectrum van onze samples en dit maakte het mogelijk om overlappende signalen in de ^1H -NMR spectra te onderscheiden. De methode is vervolgens met succes toegepast voor de analyse van 2-butanol extracten van bier. Door middel van '*principal component analysis*' gebaseerd op de verkregen '*J-resolved*' NMR spectra was het mogelijk in deze studie om een duidelijk onderscheid te kunnen maken tussen 6 verschillende onderzochte merken pilsner-bier. De inhoudsstoffen die verantwoordelijk waren voor de differentiatie konden worden geïdentificeerd als nucleïnezuur-derivaten (adenine, uridine en xanthine), aminozuren (tyrosine en proline), organische zuren (succinezuur en melkzuur), alcoholen (tyrosol en isopropanol), cholines en koolwaterstoffen. Helaas kon de aanwezigheid van iso- α -zuren niet worden aangetoond met deze methode. Verdere studie zal moeten worden gedaan om deze tekortkoming op te lossen.

Iso- α -zuren zijn zeer instabiel en hun afbraakproducten worden mede verantwoordelijk geacht voor de verslechtering van de smaak en kwaliteit van verouderend bier. Om de stabiliteit van de iso- α -zuren te verbeteren is gebruik gemaakt van complexatie met beta-cyclodextrine (β -CD) (**Hoofdstuk 6**). De vorming van iso- α -zuur/ β -CD complexen kon worden aangetoond door de bestudering van verschuivingen (NMR-shift) in de NMR spectra van behandelde en onbehandelde iso- α -zuren. De waargenomen verschuivingen waren zeer zwak, wat erop duidt dat er geen inclusie van de iso- α -zuren in de bindingsholte van β -CD plaatsvindt. Dit werd nogmaals bevestigd door middel van een NOESY-NMR, aangezien geen NOE-interactie werd waargenomen tussen protonen van de gast (iso- α -zuur) en β -CD. Het meest waarschijnlijk is dat de iso- α -zuren op een non-covalente wijze zijn gebonden aan de buitenzijde van β -CD, waarbij de afstand tussen beide moleculen relatief groot is.

De stabiliteit van het droge β -CD complex van de individuele iso- α -zuren was vele malen beter dan die van de niet gecomplexeerde, droge iso- α -zuren. De stabiliteit van

het complex was tevens beter dan die van iso- α -zuur oplossingen in chloroform, ethanol of methanol. Blijkbaar is β -CD in staat om de iso- α -zuren, zelfs in droge vorm, te beschermen tegen de invloeden van licht en oxidatie. Helaas was de stabiliteit van het β -CD complex, opgelost in water/ethanol, veel slechter. De oorzaak hiervan is vooralsnog onduidelijk. Onze aanname is dat zuurstof, opgelost in de oplossing, de iso- α -zuren kan oxideren bij direct contact. Omdat de iso- α -zuren niet gebonden zijn in de holte van β -CD, maar aan de buitenzijde ervan, zijn ze kwetsbaar voor zuurstof en licht. In het droge complex, echter, zijn de iso- α -zuren ingekapseld tussen de vaste β -CD deeltjes, en daarmee beschermd tegen dergelijke invloeden.

In deze studie hebben we aangetoond dat β -CD zeer effectief is voor de scheiding van de *cis*- en *trans*-isomeren van de iso- α -zuren, en het complex verhoogt bovendien de stabiliteit van deze stoffen. Scheiding van alle *cis*-isomeren van alle *trans*-isomeren in een mengsel, met gebruik van β -CD, is een veelbelovende methode voor de grootschalige productie van nieuwe, hoogwaardige hop producten, die kunnen worden ingezet voor het bereiden van een stabielere soort bier.

Een ander resultaat van deze studie is dat de individuele iso- α -zuren nu kunnen worden geproduceerd uit de zuivere α -zuren, verkregen door CPC-scheiding, gevolgd door isomerisatie en uiteindelijke scheiding van de isomeren met β -CD. De zo verkregen stoffen kunnen worden gebruikt als referentiestof voor analytische toepassingen, ter vervanging van de huidige DCHA-zouten van de *trans*-iso- α -zuren. Bovendien opent de ontwikkelde methode de mogelijkheid om zuivere iso- α -zuren te gebruiken in brouw onderzoek, aangezien het eenvoudig is om de stoffen in grote hoeveelheden te produceren. Het ontwikkelde HPLC systeem kan bij al deze zaken een belangrijke rol spelen.

Een applicatie van 2D 'J-resolved' NMR spectroscopie is ontwikkeld voor bier analyse en is veelbelovend voor de detectie van een wijde variatie aan inhoudstoffen. Verder onderzoek zal zich moeten richten op specifieke extractie van bitterstoffen om ook deze met behulp van NMR te analyseren in bier.

