

高效液相色谱法分析啤酒花浸膏中的 6 种酸性成分

蔡小明¹, 夏璐², 孙元社^{2,3}, 李彤^{2,3}, 夏明珠^{1*}

(1. 南京理工大学工业化学研究所, 江苏 南京 210094; 2. 大连依利特分析仪器有限公司, 辽宁 大连 116023; 3. 辽宁大连依利特分析仪器工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023)

摘要: 建立了啤酒花浸膏中 6 种酸性成分(合葎草酮、葎草酮、加葎草酮、合蛇麻酮、蛇麻酮、加蛇麻酮)的高效液相色谱分析方法。分别考察了酸的加入、有机相种类及柱温对色谱分离效果的影响。在室温条件下,以 Hypersil ODS2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为分析柱,以乙腈-0.1% (v/v) 磷酸水溶液(pH 2.2) (65:35, v/v) 为流动相,在 1.0 mL/min 流速下等度洗脱,于 315 nm 波长下检测,啤酒花浸膏中 6 种酸性成分在等度洗脱下实现了基线分离。收集 6 种酸性成分,分别通过紫外光谱、红外光谱及质谱对其结构进行表征。结果表明该方法具有稳定、简便的优点,适用于啤酒花浸膏中酸性成分的分析。

关键词: 高效液相色谱; 合葎草酮; 葎草酮; 加葎草酮; 合蛇麻酮; 蛇麻酮; 加蛇麻酮; 啤酒花浸膏

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011) 10-0983-05

Analysis of six acidic components in hops extracts by high performance liquid chromatography

CAI Xiaoming¹, XIA Lu², SUN Yuanshe^{2,3}, LI Tong^{2,3}, XIA Mingzhu^{1*}

(1. Industrial Chemistry Institute, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China;

2. Dalian Elite Analytical Instruments Co., Ltd., Dalian 116023, China; 3. Engineering Research

Center of Liaoning Dalian Elite Analytical Instruments, Dalian 116023, China)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for the separation and determination of six acidic components (cohumulone, humulone, adhumulone, colupulone, lupulone and adlupulone) in hops extracts. The effects of several important factors, such as the addition of acid, the organic solvent of elution solution and the column temperature, were investigated to acquire the optimum conditions. The separation was carried out on a Hypersil ODS2 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). A mixture of acetonitrile-0.1% (v/v) phosphoric acid solution (pH 2.2) (65:35, v/v) was used as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min in isocratic elution mode. The column temperature was kept at room temperature, and the detection wavelength was set at 315 nm. The six acidic components reached baseline separation, and were identified by ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy and mass spectrometry. The results show that this method is suitable for the analysis of acidic components in hops extracts owing to the stable and simple performance.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); cohumulone; humulone; adhumulone; colupulone; lupulone; adlupulone; hops extract

啤酒花是啤酒酿造不可缺少的原料之一,它使啤酒具有独特的苦味和香气,并有防腐和澄清麦芽汁的能力,被誉为“啤酒的灵魂”。此外,啤酒花是一种重要的传统中药,其自身独特的药用价值使其成为近年来研究的热点^[1-5]。将啤酒花中的特征成分萃取出

来,浓缩 5~10 倍制成树脂浸膏,即为啤酒花浸膏,其主要成分是 α-酸(葎草酮类)和 β-酸(蛇麻酮类)。其中 α-酸主要为葎草酮、合葎草酮和加葎草酮,β-酸主要为蛇麻酮、合蛇麻酮和加蛇麻酮(结构式见图 1^[6-8])。将啤酒花浸膏中的各种酸性成分分离纯化

* 通讯联系人: 夏明珠, 副研究员, 研究方向为高效液相色谱固定相的制备与应用研究。E-mail: wangfywater@yahoo.com.cn.

基金项目: 江苏省科技支撑计划社会发展项目(No. BE20100731)、辽宁省科学技术计划项目(No. 201002703)和大连市科学技术基金计划项目(No. 2009J22DW015)。

收稿日期: 2011-05-18

对啤酒风味机理和医药开发研究有重要的意义。由于葎草酮与加葎草酮、蛇麻酮与加蛇麻酮是两对同分异构体,在已有的高效液相色谱法(HPLC)中这两对异构体较难实现基线分离。林艳等^[9]及陆豫等^[10]采用 HPLC 对啤酒花浸膏中的 α -酸和 β -酸进行分析,但均没有实现这两对异构体的基线分离。国家标准方

法^[11]采用 HPLC 测定啤酒花制品中的 α -酸和 β -酸,将 α -酸分离成合葎草酮峰及葎草酮、加葎草酮合峰, β -酸分离成合蛇麻酮峰及蛇麻酮、加蛇麻酮合峰。Haseleu 等^[8]采用 HPLC 梯度洗脱方法制备了少量的合葎草酮、葎草酮、加葎草酮、合蛇麻酮、蛇麻酮和加蛇麻酮单体,但操作工艺复杂。

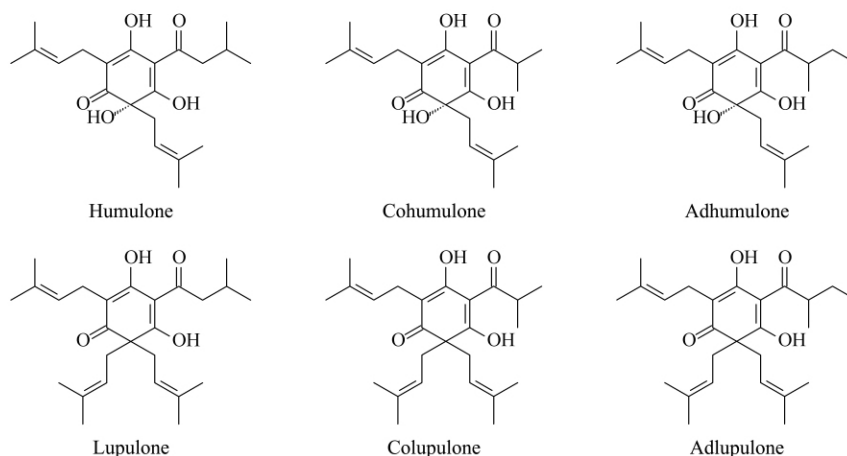


图 1 啤酒花浸膏中 α -酸与 β -酸的主要成分的结构式
Fig. 1 Compositions of α -acids and β -acids in hops extracts

本文采用 HPLC 分析啤酒花浸膏中的葎草酮、合葎草酮、加葎草酮、蛇麻酮、合蛇麻酮和加蛇麻酮 6 种同系化合物,通过优化色谱条件,在等度洗脱条件下实现了其中两对难分离同分异构体的基线分离;收集这 6 种组分并对其进行了紫外(UV)光谱、红外(IR)光谱和质谱(MS)表征。

1 实验部分

1.1 仪器和药品

P230 II 高压恒流泵,UV230 II 紫外-可见波长检测器,ZW 色谱柱恒温箱(大连依利特分析仪器有限公司);7725i 手动进样阀(美国 Rheodyne 公司);Finnigan 液相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo 公司);TU-1810APC 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);EQUINOX 55 型傅里叶变换红外光谱仪(德国 BRUKER 公司)。

甲醇、乙腈、乙醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);磷酸(分析纯,北京化工厂);实验用水由 Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)制备;啤酒花浸膏(新疆阜北三宝乐啤酒花公司)。

1.2 样品制备

称取 1.005 6 g 浸膏于 5 mL 离心管中,在 30 °C 水浴中超声振荡,用 30 mL 甲醇分多次将样品转移至 50 mL 烧杯中,在水浴中超声振荡 30 min 后转移至 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,充分混匀。取

19.0 mL 上述溶液于 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容,混匀,用 0.45 μ m 油膜过滤,滤液供分析。样品应在避光、低温条件下保存。

1.3 分析条件

HPLC 条件: Hypersil ODS2 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),流动相为乙腈-0.1% (v/v) 磷酸水溶液(pH 2.2) (65:35, v/v),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 315 nm,进样量为 20 μ L,柱温为室温。

UV 光谱条件: 样品用乙腈溶解,扫描波长范围为 199 ~ 499 nm。

IR 光谱条件: 将样品与干燥的 KBr 粉末按 1:100 的质量比混合,在玛瑙研钵中研磨压片,扫描范围为 4 500 ~ 500 cm^{-1} 。

MS 条件: 电离方式为电喷雾电离(ESI),离子源温度为 150.00 °C,检测器电压为 3.05 kV,质量扫描范围为 m/z 300.00 ~ 1 000.00,一级全扫描质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 磷酸的影响

文献[9,10]以甲醇-水(含 0.26% 磷酸或磷酸调节 pH 为 2.5)为流动相分析啤酒花浸膏中的 α -酸和 β -酸。本文以此为参考,考察了酸的加入对 HPLC 分离啤酒花浸膏中的 α -酸和 β -酸的影响。从

图 2a 中可以看出,不加酸时色谱峰展宽,且严重拖尾,分离度低;加入 0.1% (v/v) 磷酸后目标物的出峰时间比不加酸时滞后了 3~4 min(见图 2b),其原因可能是不加酸时啤酒花浸膏样品中的有效成分解离,以离子形式存在,在 C18 柱中保留相对较弱,导致出峰提前;加入酸使流动相的酸度增加,抑制了目标物在溶剂中的解离,使目标物峰的峰形得到改善,柱效增加,样品的分离度也明显提高^[12]。

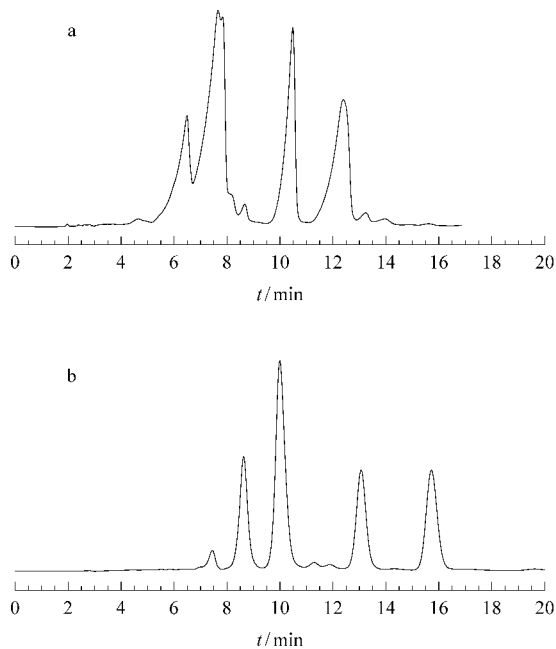


图 2 流动相中 (a) 不加酸和 (b) 加 0.1% 磷酸对分离啤酒花浸膏的影响

Fig. 2 Effects of (a) without acid and (b) added 0.1% phosphoric acid in the mobile phase on the separation of hops extracts

2.1.2 有机溶剂的影响

考察了分别以甲醇、乙醇及乙腈作为流动相中的有机相对啤酒花浸膏的 HPLC 分离效果。从图 3a 可知,以甲醇作有机相时最大保留时间大于 350 min,且组分 2 和 3 没有达到基线分离;从图 3b 可知,以乙醇作有机相时可分出 4 种组分,分别为合葎草酮(1)、葎草酮与加葎草酮合峰(2+3)、合蛇麻酮(4)、蛇麻酮与加蛇麻酮合峰(5+6),两对同分异构体都没有得到很好的分离;从图 3c 可知,乙腈的选择性相对较好,用其作有机相时柱压较小,且 6 种组分均得到了较好的分离,两对同分异构体的分离度(R_s)分别为 1.58 和 1.55,均实现了基线分离,故选择乙腈作流动相的有机相。

2.1.3 温度的影响

在色谱分离中,色谱柱温度的改变会影响样品的分离度及保留时间,故有考察的必要。研究结果

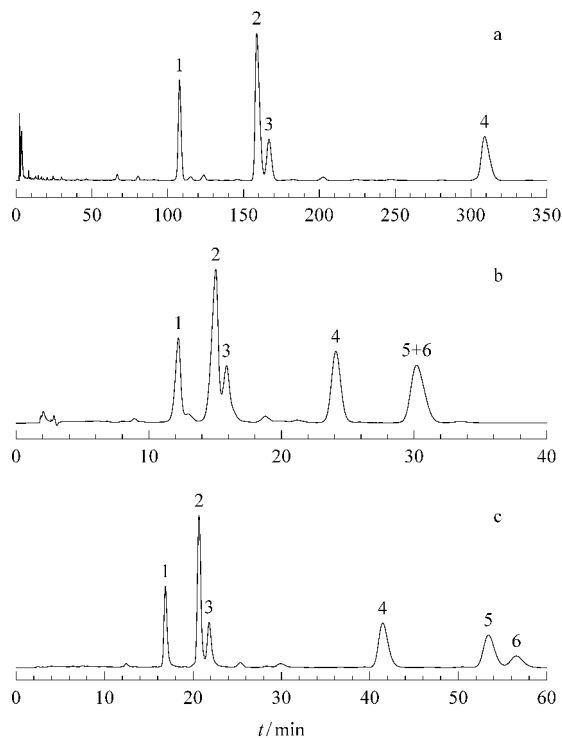


图 3 不同有机溶剂作流动相的有机相对分离啤酒花浸膏的影响

Fig. 3 Effects of different organic solvents in the mobile phase on the separation of hops extracts

a. methanol-0.1% (v/v) phosphoric acid solution (65:35, v/v); b. ethanol-0.1% (v/v) phosphoric acid solution (65:35, v/v); c. acetonitrile-0.1% (v/v) phosphoric acid solution (65:35, v/v).
Peak identifications: 1. cohumulone; 2. humulone; 3. adhumulone; 4. colupulone; 5. lupulone; 6. adlupulone.

表明,温度每上升 5℃,分离时间缩短约 5 min(以组分 5 计),两对同分异构体的分离度变化如表 1 所示。

表 1 柱温对两对同分异构体分离度的影响
Table 1 Effect of column temperature on R_s of two pairs of isomers

Column temperature/ ℃	R_s		Droop rate of R_s /%	
	Compound 2 and 3	Compound 5 and 6	Compound 2 and 3	Compound 5 and 6
25	1.58	1.55	—	—
35	1.38	1.26	12.7	18.7
45	1.31	1.11	17.1	28.4

柱温从室温(25℃)上升到 35℃时,组分 2 和 3 及 5 和 6 的分离度分别下降 12.7% 和 18.7%,分离度均低于 1.5,不能达到基线分离的要求^[12];温度上升到 45℃时,组分 5 和 6 的分离度下降了约 30%。温度的升高虽然使保留时间提前,但分离度相应地降低,使两对同分异构体的分离效果变差,不能达到基线分离,故选择柱温为室温。

2.2 有效成分的制备与表征

2.2.1 有效成分的制备

取 1.2 节中所制备的样品在最佳分离条件下进样,按出峰时间收集 6 种组分(合萆草酮、萆草酮、加萆草酮、合蛇麻酮、蛇麻酮、加蛇麻酮),分别记为 I、II、III、IV、V 和 VI。按 1.3 节所述的分析条件分别对收集的 6 个组分进行 HPLC 分析,检测其纯度。通过面积归一化法测得 6 种组分的纯度分别为 98.2%、94.3%、96.6%、93.2%、92.6% 和 90.2%。

2.2.2 结构表征

(1) UV 光谱: 组分 I 的 UV 光谱如图 4 所示,其最大紫外吸收波长($\lambda_{\max}$)为 227 nm;从其余 5 种组分的 UV 光谱(图略)可见其 $\lambda_{\max}$ 分别为 222、222、323、321 和 323 nm。在 320 nm 左右有强的 UV 吸收带说明结构式中有 3 个共轭双键,且此处的吸收谱带说明还有外环羟基的作用。羟基是助色基团,其与苯环连接,形成 $n-\pi$ 共轭导致其最大吸收波长红移至 220 nm 左右有最大吸收波长;大于 270 nm 处的谱带是由于结构式中的羰基的紫外吸收所致;在 222 nm、227 nm 处的吸收主要是由于六元环上的烯醇式-酮式互变作用引起。

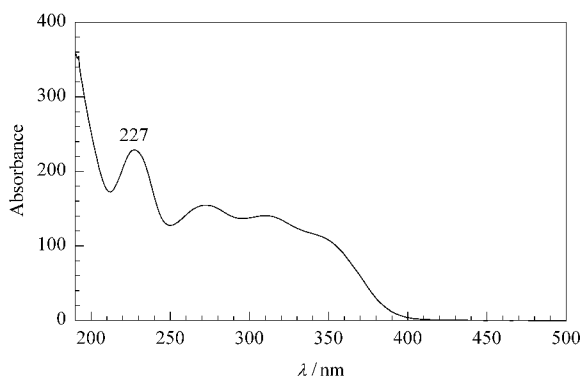


图 4 组分 I(合萆草酮)的紫外光谱图

Fig. 4 Ultraviolet spectrum of component I (humulone)

(2) IR 光谱: 组分 I 的 IR 光谱见图 5(其余 5 种组分的 IR 光谱图略)。该化合物在 3412 cm^{-1} 的吸收谱带是羟基的伸缩振动吸收峰;在 $2975 \sim 2840\text{ cm}^{-1}$ 有 3 个强吸收谱带,说明分子内有甲基、次甲基、亚甲基的 C-H 对称与不对称伸展振动; 1467 cm^{-1} 的谱带说明分子中含有甲基或乙基; 1378 cm^{-1} 处的吸收谱带证实有甲基存在; $1525 \sim 1680\text{ cm}^{-1}$ 处的一组谱带是六元环共轭体系 C=C 和邻接 C=O 的伸缩振动吸收区; $1200 \sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收带表示六元环上的碳氢面内的弯曲振动,说明环上有邻、间、对位取代基。该表征结果与其结构吻合。

(3) LC-MS: 组分 I 的质谱图见图 6,可以看出其准分子离子峰为 m/z 348.96;其余 5 种组分的准

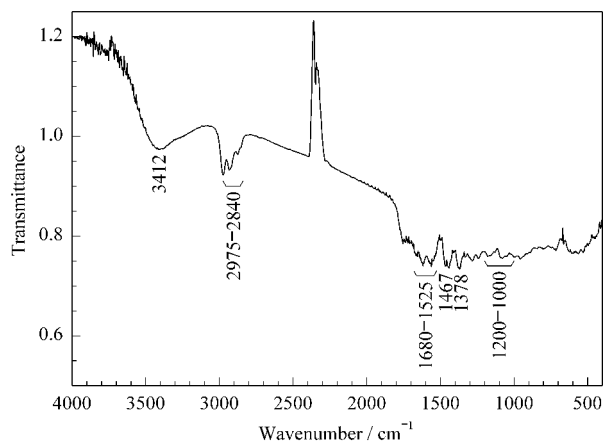


图 5 组分 I(合萆草酮)的 IR 光谱图

Fig. 5 IR spectrum of component I (humulone)

分子离子峰分别为 m/z 362.92、362.96、400.94、414.94、414.96。6 种组分的分子式分别为 $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$ 、 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ 、 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ 、 $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_4$ 、 $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4$ 、 $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4$, MS 表征结果与理论值一致。

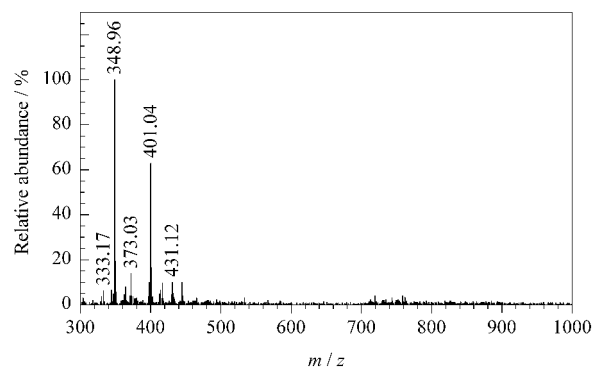


图 6 正离子模式下组分 I(合萆草酮)的质谱图

Fig. 6 MS spectrum of component I (humulone) in positive ionization mode

通过 UV 光谱、IR 光谱和 MS 对收集的 6 种组分进行表征,结果与其结构吻合,且与文献[28]报道的结果一致,确认所收集的组分 I 为合萆草酮,II 为萆草酮,III 为加萆草酮,IV 为合蛇麻酮,V 为蛇麻酮,VI 为加蛇麻酮。

3 结语

建立了 HPLC 同时测定啤酒花浸膏中 6 种活性组分的方法,在等度洗脱下实现了两对难分离同分异构体的基线分离。该法具有简便、稳定、分离度好等优点,可用于啤酒花浸膏中酸性成分的分析。

参考文献:

- [1] Dhooche L, Naessens T, Heyerick A, et al. Talanta, 2010, 83: 448

- [2] Garcia-Villalba R, Cortacero-Ramirez S, Segura-Carretero A, et al. J Agric Food Chem, 2006, 54: 5400
- [3] Dong Y H, Yun J M, Pu L M, et al. Food and Fermentation Industries (董延虎, 负建民, 蒲陆梅, 等. 食品与发酵工业), 2009, 35(11): 96
- [4] Zhang L Y, Liu K F, Zhao S H, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (张凌怡, 刘奎钊, 赵素华, 等. 分析化学), 2000, 28(6): 789
- [5] Culik J, Jurková M, Horák T, et al. J Institute Brewing, 2009, 115(3): 220
- [6] Ono M, Yamaguchi N, Yamaguchi K. US, 2009/0258094 A1. 2009-10-15
- [7] Zhou J, Zou X, Ji Y B. Journal of Harbin University of Commerce: Natural Sciences Edition (周娟, 邹翔, 季宇彬. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版), 2005, 21(4): 414
- [8] Haseleu G, Intelmann D, Hofmann T. Food Chem, 2009, 116: 71
- [9] Lin Y, Shan L J, Zhang P, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (林艳, 单连菊, 张沛, 等. 分析化学), 2000, 28(8): 1047
- [10] Lu Y, Wang Y X, Wu F. Journal of Nanchang University: Natural Science (陆豫, 王远兴, 吴芬. 南昌大学学报: 理科版), 2002, 26(1): 79
- [11] GB/T 20369-2006
- [12] Snyder L R, Kirkland J J, Glajch J L. Practical HPLC Method Development. 2th ed. Zhang Y K, Wang J, Zhang W B, transl. Beijing: Huawen Press (Snyder L R, Kirkland J J, Glajch J L. 实用高效液相色谱法的建立. 第 2 版. 张玉奎, 王杰, 张维冰, 译. 北京: 华文出版社), 2001: 310

《分析化学》征订启事

邮发代号 12-6

《分析化学》(ISSN 0253-3820, CODEN FHHHDT, CN 22-1125/O6) 是中国科学院和中国化学会共同主办的专业性学术期刊, 主要报道我国分析化学创新性研究成果, 反映国内外分析化学学科前沿和进展。刊物设有特约来稿、研究快报、研究报告、研究简报、评述与进展、仪器装置与实验技术、来稿摘登等栏目。读者对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大专院校师生。本刊也是有关图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《分析化学》目前是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 1999 年荣获首届国家期刊奖, 2000 年获中国科学院优秀期刊特别奖, 2001 年入选“中国期刊方阵”高知名度、高学术水平的“双高”期刊, 2002 年又荣获第二届国家期刊奖和第三届中国科协优秀科技期刊奖。论文已被包括美、英、日、俄的国内外近 20 种刊物和检索系统收录。根据中国科技信息研究所历年来发布的“中国科技期刊引证报告”获悉, 2009 年公布的影响因子为 1.29。多年来, 本刊逐年被选入美国权威文摘《化学文摘》(CA) 摘引量最大的 1000 种期刊(简称“CA 千种表”)中, 并居我国入选“CA 千种表”期刊的前列。从 1999 年第 27 卷第一期开始被美国科学信息研究所(Institute for Scientific Information)正式收入《科学引文索引扩大版》(Science Citation Index-Expanded, SCIE, also known as SciSearch), 同时还被收入《Research Alert》和《Chemistry Citation Index》等 ISI 系列。近期公布的 2010 年 SCI 影响因子为 0.798。

本刊为月刊, 每期 160 页(大 16 开), 由科学出版社出版。国内单价 30.00 元, 全年 360.00 元。邮发代号 12-6, 全国各地邮局订阅, 国外代号 M336, 中国国际书店订购, 漏订读者, 可与编辑部联系。广告经营许可证号: 2200004000094, 广告代理: 北京行胜言广告有限公司, 电话: 010-52086537。

编辑部地址: 长春市人民大街 5625 号

编辑部电话: (0431) 85262017/85262018

E-mail: fxhx@ciac.jl.cn

邮政编码: 130022

传真: (0431) 85262018

网址: <http://www.analchem.cn>