

Headspace Trap GC-MS Analyse der Hopfenaromastoffe in kaltgehopften Bieren

SPEZIELLE METHODIK | Die anhaltende Beliebtheit kaltgehopfter Biere und die dafür unerlässlichen besonderen Hopfensorten mit vielfältigem Aroma erfordern eine analytische Charakterisierung des Hopfeneinflusses auf das Aroma von kaltgehopften Bieren. Die Methodik der Headspace Trap Gaschromatographie Massenspektrometrie (HS Trap GC-MS) wurde entwickelt, um dieser Fragestellung gerecht zu werden.

DAS ÄTHERISCHE Hopfenöl besteht aus einer großen Anzahl flüchtiger Verbindungen [1]. Dessen exakte Zusammensetzung ist abhängig von der Hopfensorte.

■ Hopfenaromastoffe

Im Jahr 2000 beschrieben *Steinhaus* und *Schieberle* die beiden Hopfenaromastoffe Linalool und Myrcen als Schlüsselaromastoffe der getrockneten Hopfendolden in der Hopfensorte Spalter Select [2]. Zudem wurden die Ester Ethylisobutanoat, Methyl-

2-methylbutanoat sowie Propyl-2-methylbutanoat als wichtige Hopfenaromastoffe identifiziert [2]. Eine weitere Studie deckte Geraniol und 4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-on als Schlüsselaromastoffe der amerikanischen Hopfensorte Cascade auf [3]. Diese beiden Substanzen konnten als sortenspezifisch charakterisiert werden. Als weitere Hopfenaromastoffe findet man in der Literatur diverse Mono- und Sesquiterpene, Terpenalkohole, Ketone und Ester [1-4].

2001 wurde Linalool als Schlüsselaromakomponente im Pilsner Bier beschrieben [5-6], während für Myrcen nur ein Betrag zum Gesamtaroma von kaltgehopften Bieren beobachtet werden konnte [5]. Studien von *Takoi et al.* zeigten das Auftreten additiver Effekte zwischen den Terpenalkoholen Linalool, Geraniol und β -Citronellol [7].

Daher ist es notwendig, neben Linalool, weitere analytische Marker zur Beschreibung des Hopfeneinflusses auf das Aromaprofil von Bier anzugeben.

■ Headspace Analyse

Die Headspace (HS) Analyse ist eine weitverbreitete Methodik, die es ermöglicht, flüchtige Verbindungen aus komplexen Probenmatrices zu extrahieren.

Die HS Analyse wird bei der HS Trap Technik durch einen Anreicherungsschritt ergänzt. Nach Thermostatisierung der Pro-

be erfolgt der Druckaufbau im Probenvial. Durch Entspannung des Überdrucks aus dem Vial wird die Trap beladen. Dies ist der Anreicherungsschritt, welcher auch durch mehrmalige Wiederholungen zur Steigerung der Empfindlichkeit führt. Die Trap Einheit wird mittels Trägergas getrocknet und im Anschluss werden die aufkonzentrierten Komponenten thermisch von der Trap desorbiert und in den GC injiziert. Ein Vorteil der HS Trap Methode gegenüber anderen Anreicherungsverfahren ist der mögliche Einsatz von sowohl flüssigen als auch festen Proben [8].

Eine HS Trap GC-MS Methode für die Bestimmung von Hopfenaromastoffen in verschiedenen Hopfensorten wurde 2012 von *Aberl* und *Coelhan* vorgestellt [4]. Die Analyse von Schwefelverbindungen ist mit dieser Methode nicht möglich, da die Empfindlichkeit des Massenspektrometers als Detektor für die niedrigen Schwefelkonzentrationen im Hopfen nicht ausreicht.

Weitere aus der Literatur bekannte Methoden zur Bestimmung der Hopfenaromastoffe sind die Verwendung von HS mit Festphasenmikroextraktion (SPME: solid phase microextraction) [9-11] oder die Nutzung der HS nach Anreicherung mittels „stir bar sorptive extraction“ (SBE) [12-14], beides in Kombination mit GC-MS.

■ Methodenbeschreibung

Basierend auf der publizierten Methode von *Aberl* und *Coelhan* [4] zur Bestimmung der Aromastoffe in Hopfen wurde eine Methode zur Charakterisierung der Hopfenaromastoffe in kaltgehopften Bieren entwickelt.

Es wurde ein TurboMatrix™ HS-40 Trap Probennehmer der Firma Perkin Elmer Waltham, USA, verwendet. Die Parameter für die Probenaufgabe mithilfe der HS Trap sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.



Autoren: Dr. Christina Schmidt und Dr. Martin Biendl, Hopsteiner, Mainburg

Die Analyse der entgasten Biere erfolgte mithilfe eines Thermo Focus Gaschromatographen gekoppelt an ein DSQ II Massenspektrometer der Thermo Fisher Scientific Messtechnik GmbH, Erlangen. Eine Elite-200 Kapillarsäule (60 m * 0,25 mm innerer Durchmesser, 1 µm Filmdicke, Perkin Elmer) wurde eingesetzt. Helium diente mit einem Säulendruck von 150 kPa als Trägergas. Tabelle 2 zeigt das verwendete Temperaturprogramm.

Bei der Methodenentwicklung wurden Mono- und Sesquiterpene, Terpenalkohole, Ester und ein Epoxid integriert. Eine genaue Auflistung enthält Tabelle 3. Als interne Standards wurden Linalool-D5 und Citronellol-D6 verwendet.

Zur Untersuchung von Geraniol und β-Citronellol war die Zugabe von Natriumchlorid (2 g) zur Bierprobe (5 ml) notwendig.

Einfluss der Hopfensorte

Um den Einfluss der Hopfensorte zu untersuchen, wurden 19 verschiedene Biere analysiert. Die Hopfensorten, die für die Kalthopfung der Biere eingesetzt wurden, waren sowohl aus dem Anbaugebiet Hallertau (Mandarina Bavaria, Smaragd, Polaris, Cascade, Hallertau Blanc und Saphir) als auch aus Anbaugebieten in den USA (Bravo, Lemondrop und Calypso). Es wurden Hopfenpellets (17 Biere, Pelletmenge 100-300 g/hl) oder Hopfenöle (2 Bierproben, Hopfenölmenge 0,8 g/hl und 2,4 g/hl) zur Kalthopfung verwendet.

Signifikante Unterschiede zwischen den Bieren wurden für die Terpenalkohole Linalool, α-Terpineol, Geraniol und β-Citronellol detektiert. Auch für Myrcen, β-Caryophyllen, α-Humulon, β-Farnesen und für die Ester 2-Methylbutylisobutanoat, Isobutylisobutanoat und Isoamylacetat zeigten sich signifikante Unterschiede. Die Verbindungen Linalool, Geraniol und Myrcen wurden bereits in der Literatur als Schlüsselaromastoffe des Hopfens beschrieben [2-3]. Nur geringe Unterschiede zeigten sich für die Ketone 2-Nonanon, 2-Decanon, 2-Undecanon, 2-Dodecanon, 2-Tridecanon und β-Damascenon sowie für die drei Ester Methylnonanoat, Methyldecanoat und Ethyldodecanoat, aber auch für β-Limonen.

Die restlichen untersuchten Substanzen, die Tabelle 3 zeigt, konnten nicht in den analysierten Bieren detektiert werden. Obwohl die Verbindungen E,Z-1,3,5-Un-

HS TRAP PROBEAUFGABE-PARAMETER

Parameter	
Temperatur	
Vial-Ofentemperatur	85 °C
Nadeltemperatur	90 °C
Transferleitungstemperatur	130 °C
Trap-Temperatur (niedrig)	40 °C
Trap-Temperatur (hoch)	280 °C
Druck	
Säulendruck	150 kPa
Vialdruck	240 kPa
Desorptionsdruck	150 kPa
Zeiten	
Thermostatisierzeit	15'/45 ² min
Druckaufbauzeit/Zyklus	1.0 min
Trap-Befüllzeit/Zyklus	1.6 min
Trap-Trocknungszeit	8 min
Trap-Spülzeit	15 min
Zyklusanzahl	1 ¹ /2 ²

¹ Analyse aller Substanzen mit Ausnahme von Geraniol und β-Citronellol.

² Analyse von Geraniol and β-Citronellol.

Tab. 1

GC TEMPERATURPROGRAMM

Programm	Temperatur	Zeit
Start	45 °C	2 min
Stufe 1	3 °C/min bis 100 °C	0 min
Stufe 2	5 °C/min bis 200 °C	0 min
Stufe 3	40 °C/min bis 270 °C	5 min

Tab. 2

decatrien und die Ester Methyl-2-methylbutanoat, Propyl-2-methylbutanoat und das Ethylisobutanoat von Steinhaus und Schieberle [2] als Schlüsselaromastoffe im Hopfen postuliert wurden, konnten diese Aromastoffe im Bier nicht nachgewiesen werden und spielen somit keine Rolle für das Aromaprofil eines kaltgehopften Bieres.

Einfluss des Hopfengabezeitpunktes

Brauversuche mit der Hopfensorte Lemondrop wurden durchgeführt, um den Einfluss des Hopfengabezeitpunktes auf das Bieraromaprofil zu beobachten. Der Gesamtölgehalt der verwendeten Pellets

Typ 90 lag bei 1,1 ml/100 g. Der Gehalt der α-Säuren betrug sechs Prozent. Die Brauversuche wurden in einer 20-hl-Versuchsbrauerei der Bitburger Braugruppe, Bitburg, durchgeführt. Ein Pilsner Bier mit 12,5 Prozent Originalwürze, 5,2 Vol.-Prozent Alkohol und 100 Prozent Pilsner Malz wurde gebraut. Die Würze wurde 75 min bei 100 °C gekocht. Im Anschluss erfolgte die Fermentation mit Lagerhefe bei 11 °C. Die Lagerung fand ebenfalls bei 11 °C statt. Tabelle 4 zeigt die Unterschiede bezüglich der Hopfengabezeitpunkte. Kalt ge-hopft wurde mit einer Kontaktzeit von sieben Tagen bei 0 °C. Abschließend wurden die Biere filtriert und abgefüllt. Der Sauerstoffgehalt in der Flasche lag unter 0,07 mg/l.

SUBSTANZSPEZIFISCHE PARAMETER FÜR DIE GC-MS ANALYSE

Verbindung	Retentionszeit (min)	Fragmentationen (m/z)
Mono- und Sesquiterpene		
α -Pinen	16,7	121, 136
β -Pinen	19,5	121, 136
Myrcen	19,7	107, 136
β -Limonen	21,4	68, 136
β -Farnesen	36,7	161, 204
β -Caryophyllen	37,6	133, 204
α -Humulen	38,6	147, 204
Terpenalkohole		
Linalool	27,5	121, 136
α -Terpineol	31,9	121, 136
β -Citronellol	32,7	123, 138
Geraniol	33,8	123, 154
Ketone		
<i>E,Z</i> -1,3,5-undecatrien	26,9	79, 150
2-Nonanon	31,5	71, 142
2-Decanon	34,8	98, 156
2-Undecanon	37,7	110, 170
2-Dodecanon	40,4	126, 184
β -Damascenon	41,4	177, 192
2-Tridecanon	42,1	140, 198
Ester		
Ethylisobutanoat	13,5	88, 116
Methyl-2-methylbutanoat	14,4	88, 101
Ethyl-2-methylbutanoat	17,8	85, 102
Isoamylacetat	20,6	70, 87
Isobutylisobutanoat	21,6	71, 114
Methylhexanoat	22,1	74, 99
Propyl-2-methylbutanoat	22,7	85, 103
3-Methylbutylpropanoat	24,3	70, 75
2-Methylbutylisobutanoat	26,2	89, 158
Methylheptanoat	26,4	101, 144
Methyloctanoat	30,1	87, 158
Methylnonanoat	33,4	98, 172
Methyldecanoat	36,4	143, 155
Ethyl-dodecanoat	42,3	157, 228
Epoxid		
Caryophyllen epoxid	44,3	205, 220
Interne Standards		
Linalool-D5	27,5	126, 141
Citronellol-D6	32,1	129, 162

Quantifizierungsionen sind hervorgehoben

Tab. 3

Die Ergebnisse der durchgeführten Bieranalysen sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Die Nachweisgrenze für alle Substanzen lag bei 1 $\mu\text{g/l}$.

Der Vergleich zwischen Späthopfung bei Pilsner Bier 1 und der Kalthopfung bei Pilsner Bier 2 zeigte eine Zunahme der Substanzen Myrcen, β -Caryophyllen und α -Humulen. Um den Beitrag diverser Aromastoffe auf das Gesamtaroma von Bier bewerten zu können, ist, neben der quantitativen Analyse der Substanzen, das Wissen um sogenannte Geruchsschwellenwerte von Bedeutung. Hierbei kann man sich auf Daten aus der Literatur beziehen. Der Geruchsschwellenwert für Myrcen variiert in den Literaturdaten zwischen 9 und 1000 $\mu\text{g/l}$ [1]. Die ermittelten Konzentrationen zeigen, dass der Aromabeitrag von Myrcen im kalt gehopften Bier (Pilsner Bier 2) höher ist als im spät gehopften Bier. Die gefundenen Konzentrationen für β -Caryophyllen und α -Humulen liegen jedoch weit unterhalb der berichteten Geruchsschwellenwerte von 160 - 420 $\mu\text{g/l}$ für β -Caryophyllen und 747 $\mu\text{g/l}$ für α -Humulen [1].

Ein deutlicher Eintrag durch die Kalthopfung ließ sich für die Terpenalkohole Linalool und Geraniol beobachten, jedoch nicht für α -Terpineol und β -Citronellol. Die ermittelten Konzentrationen für α -Terpineol und β -Citronellol waren in beiden Bieren vergleichbar. Die Geruchsschwellenwerte für Terpenalkohole liegen bei 2 - 80 $\mu\text{g/l}$ für Linalool, bei 4 - 300 $\mu\text{g/l}$ für Geraniol, bei 9 - 40 $\mu\text{g/l}$ für β -Citronellol und bei 330 $\mu\text{g/l}$ für α -Terpineol [1]. Sowohl Linalool als auch Geraniol tragen zum Gesamtaromaprofil des kaltgehopften Pilsner Bieres bei. Der Beitrag von β -Citronellol kann auch auf synergistische Effekte zurückgeführt werden, welche von Takoi et al. bei Anwesenheit von β -Citronellol zusammen mit Linalool und Geraniol beschrieben wurden [7,15].

Ein signifikanter Anstieg im kalt gehopften Bier (Pilsner Bier 2) konnte zudem für die Ketone 2-Nonanon und 2-Decanon beobachtet werden, während die Konzentration von 2-Undecanon durch die zusätzliche Hopfung beim Kalthopfen nur leicht anstieg. Gemäß Literatur [16] liegt der Geruchsschwellenwert für 2-Nonanon in Wasser zwischen 5 und 200 $\mu\text{g/l}$ und für 2-Undecanon bei 7 $\mu\text{g/l}$. Der Beitrag dieser Ketone zum fruchtigen Gesamteindruck des Bieres kann von Bedeutung sein, auch wenn keine dieser Verbindungen bislang

als Schlüsselaromastoff in Bier beschrieben wurde.

Bei der Verbindungsklasse der Ester konnte nur für 2-Methylbutylisobutanoat ein signifikanter Einfluss durch die Technologie der Kalthopfung ermittelt werden. Weder Isoamylacetat noch Ethyldodecanoat zeigten Unterschiede innerhalb der beiden Biere. Es konnte keine deutliche Zunahme bei zusätzlicher Hopfengabe beobachtet werden. Der Geruchsschwellenwert von 2-Methylbutylisobutanoat ist in der Literatur beschrieben. In einer Modellösung beträgt dieser 57 µg/l und in Bier als Matrix 78 µg/l [17]. Auch zu dieser Verbindung gibt es Untersuchungen zum synergistischen Effekt, welche bereits bei einer Konzentration von 5 µg/l des 2-Methylbutylisobutanoats beobachtet wurden [17]. Somit liegt ein Beitrag dieser Verbindung zum Gesamtaroma der untersuchten Biere mit der Hopfensorte Lemondrop vor.

Fazit

Die vorgestellte Methode erlaubt eine zuverlässige Quantifizierung der Hopfenaromastoffe wie z.B. Myrcen, Linalool, Geraniol und 2-Methylbutylisobutanoat in kaltgehopften Biere. Damit lassen sich unterschiedliche Aspekte bei der Bierherstellung wie Einfluss des Hopfengabezeitpunktes, der Hopfenmenge oder der Hopfensorte sowie das Verhalten dieser Hopfenaromastoffe während der Bierlagerung untersuchen.

Literatur

1. Biendl, M.; Engelhard, B.; Forster, A.; Gahr, A.; Lutz, A.; Mitter, W.; Schmidt, R.; Schönberger, C.: Hopfen – Vom Anbau bis zum Bier, Fachverlag Hans Carl GmbH, Nürnberg, 2012.
2. Steinhaus, M.; Schieberle, P.: „Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. variety Spalter Select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques”, J. Agric. Food Chem., 48, 2000, S. 1776-1783.
3. Steinhaus, M.; Wilhelm, W.; Schieberle, P.: „Comparison of the most odour-active volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis”, Eur. Food Res. Technol., 226, 2007, S. 45-55.
4. Aberl, A.; Coelhan, M.: „Determination of volatile compounds in different hop varieties by headspace-trap GC/MS –

DOSAGEBEDINGUNGEN DER BRAUVERSUCHE

	Hopfensorte	Dosagezeitpunkt	Menge
Pilsner Bier 1	Lemondrop	Kochbeginn	8 g α/hl
		Whirlpool	6 g α/hl
Pilsner Bier 2	Lemondrop	Kochbeginn	8 g α/hl
		Whirlpool	6 g α/hl
		Kalthopfung	250 g/hl

Tab. 4

KONZENTRATIONEN [µG/L] SOWIE STANDARD-ABWEICHUNGEN (N = 3) ...

... der Hopfenaromastoffe in Pilsner Bier 1 und 2

Verbindung	Pilsner 1	Pilsner 2
Mono- und Sesquiterpene		
Myrcen	45,6 ± 1,1	79,7 ± 2,8
β-Caryophyllen	1,1 ± 0	2,3 ± 0,2
α-Humulon	1,6 ± 0,04	5,2 ± 0,5
Terpenalkohole		
Linalool	62,3 ± 4,7	155 ± 8,0
α-Terpineol	16,8 ± 0,9	25,4 ± 6,4
Geraniol	27,4 ± 4,3	265 ± 45,8
β-Citronellol	22,8 ± 1,1	26,3 ± 3,5
Ketone		
2-Nonanon	0,9 ± 0,02	6,9 ± 0,3
2-Decanon	1,0 ± 0,01	4,4 ± 0,3
2-Undecanon	23,0 ± 0,8	33,3 ± 6,1
Ester		
Isoamylacetat	275 ± 54,6	330 ± 11,6
2-Methylbutylisobutanoat	7,1 ± 0,3	34,7 ± 3,2
Ethyldodecanoat	25,6 ± 1,6	31,7 ± 3,5

Tab. 5

in comparison with conventional hop essential oil analysis”, J. Agric. Food Chem., 60, 2012, S. 2785-2792.

5. Fritsch, H. T.: „Einfluss des Hopfens auf wertgebende Aromastoffe in Pilsener-Bieren sowie in Zwischenstufen des Brauprozesses“, Dissertation, TU München, 2001.
6. Fritsch, H. T.; Schieberle, P.: „Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian Pilsner-type beer”, J. Agric. Food Chem., 53, 2005, S. 7544-7551.
7. Takoi, K.; Koie, K.; Itoga, Y.; Katayama, Y.; Shimase, M.; Nakayama, Y.; Watari, J.: „Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of

hopped beer”, J. Agric. Food Chem., 58, 2010, S. 5050-5058.

8. Tipler, A.: „Characterization of hop aroma using GC/MS, headspace trap and olfactory port”, Perkin Elmer Application Note, URL: www.perkinelmer.com.
9. Takoi, K.; Itoga, Y.; Takayanagi, J.; Kosugi, T.; Shioi, T.; Nakamura, T.; Watari, J.: „Screening of geraniol-rich flavor hop and interesting behavior of β-citronellol during fermentation under various hop-addition timings”, J. Am. Soc. Brew. Chem., 72, 2014, S. 22-29.
10. Steinhaus, M.; Fritsch, H. T.; Schieberle, P.: „Quantitation of (R)- and (S)-linalool in beer using solid phase microextraction (SPME) in combination with a sta-

- ble isotope dilution analysis (SIDA)", *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2003, S. 7100-7105.
11. Dresel, M.; Van Opstaele, F.; Praet, T.; Jaskula-Goiris, B.; Van Holle, A.; Naudts, D.; De Keukeleire, D.; De Cooman, L.; Aerts, G.: „Investigation of the impact of the hop variety and the hopping technology on the analytical volatile profile of single-hopped worts and beers", *BrewingScience – Monatschrift für Brauwissenschaft*, 66, 2013, S. 162-175.
 12. Kishimoto, T.; Wanikawa, A.; Kagami, N.; Kawatsura, K.: „Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS", *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2005, S. 4701-4707.
 13. Kishimoto, T.; Wanikawa, A.; Kono, K.; Shibata, K.: „Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties", *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2006, S. 8855-8861.
 14. Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Kishimoto, T.: „Development of a method for the quantitation of three thiols in beer, hop, and wort samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, 63, 2015, S. 6698-6706.
 15. Takoi, K.; Itoga, Y.; Koie, K.; Kosugi, T.; Shimase, M.; Katayama, Y.; Nakayama, Y.; Watari, J.: „The contribution of geraniol metabolism to the citrus flavour of beer: synergy of geraniol and β -citronellol under coexistence with excess linalool", *J. Inst. Brew.*, 116, 2010, S. 251-260.
 16. Leffingwell, J. C.; Leffingwell, D.: „GRAS Flavor chemicals – Detection thresholds", *Perfumer&Flavorist*, 16, 1991, S. 1-19.
 17. Takoi, K.; Degueil, M.; Shinkaruk, S.; Thibon, C.; Kurihara, T.; Toyoshima, K.; Ito, K.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D.; Tominaga, T.: „Specific flavor compounds derived from Nelson Sauvignon hop and synergy of these compounds", *BrewingScience – Monatschrift für Brauwissenschaft*, 62, 2009, S. 108-118.