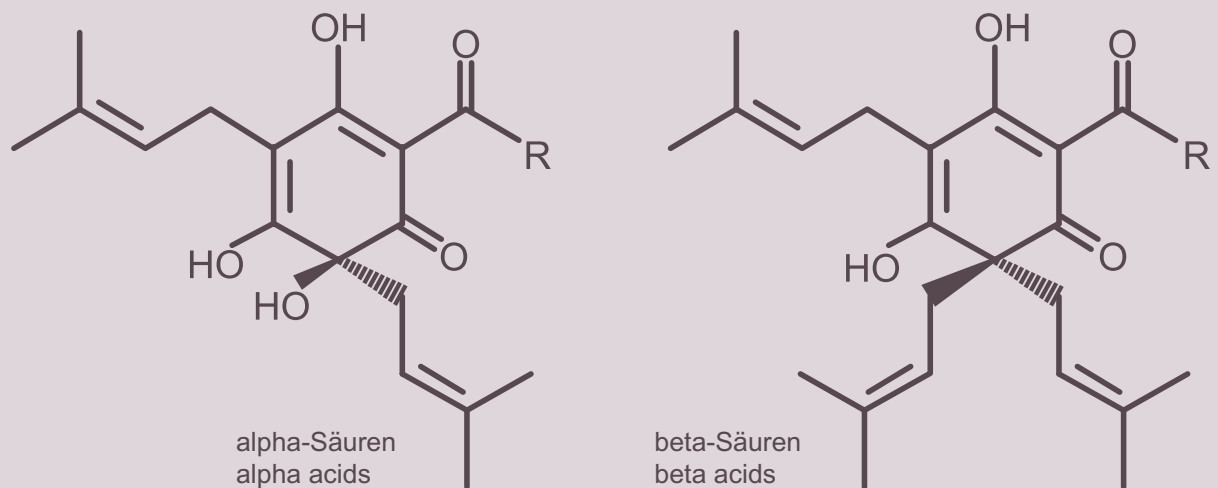


# Die Möglichkeiten der Nahinfrarotreflektions-(NIR)-Spektroskopie zur lösungsmittelfreien, nachhaltigen alpha-Säuren-Bestimmung

The potential of **near-infrared reflectance (NIR) spectroscopy** for solvent-free, sustainable **determination of alpha acids**

Von den vielen wertvollen Inhaltsstoffen des Hopfens gelten immer noch die alpha-Säuren (Abbildung 1) als das primäre Qualitätsmerkmal des Hopfens, wenn auch besonders bei den Craft Brewern die ätherischen Öle an Bedeutung gewinnen und in Zukunft vielleicht auch die Polyphenole mehr Berücksichtigung finden werden, da diese sicherlich zur Qualität der Bittere beitragen.

*Of the many valuable hop substances, the alpha acids (Figure 1) are still considered the primary quality characteristic of hops, although essential oils are gaining in importance, especially among craft brewers, and polyphenols may also receive more consideration in the future, as these certainly contribute to the quality of the bitterness.*



	alpha-Säuren alpha acids	beta-Säuren beta acids	Abbildung 1: Chemische Strukturen der alpha- und beta-Säuren Figure 1: Chemical structures of alpha and beta acids
R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	n-Humulon	n-Lupulon	
R = CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Cohumulon	Colupulon	
R = CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Adhumulon	Adlupulon	
R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Prähumulon	Prälupulon	
R = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Posthumulon	Postlupulon	

Hopfen wird auch immer mehr auf Basis des alpha-Säuregehalts bezahlt, entweder direkt nach Gewicht der alpha-Säuren (kg alpha-Säuren) oder es gibt bei den Hopfenlieferverträgen Zusatzvereinbarungen für Zu- und Abschläge, wenn ein Neutralbereich über- bzw. unterschritten wird. Deshalb braucht man zuverlässige Analysemethoden. In Tabelle 1 sind die gängigen Messmethoden zusammengestellt.

*Hops are also increasingly paid for on the basis of alpha acid content, either directly by weight of alpha acids (kg alpha acids) or there are additional agreements in hop supply contracts for markups and discounts if a neutral range is exceeded or not reached. That is why reliable analytical methods are needed. Table 1 shows the common methods of analysis.*

Methode / Method	Methodenbeschreibung / Method designation	Information / Information
konduktometrische / conductometric Titration	EBC 7.4, 7.5	alpha-Säuren / alpha acids
HPLC (high performance liquid chromatography)	EBC 7.7	alpha-Säuren, beta-Säuren / alpha acids, beta acids, Cohumulon, Colupulon, Xanthohumol
Spektralphotometrie / Spectrophotometry	ASBC Hops 6A, Hops 12	alpha-Säuren, beta-Säuren / alpha acids, beta acids, hop storage index (HSI)
Nahinfrarotreflektions-Spektroskopie (NIRS) Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS)		alpha-Säuren, beta-Säuren / alpha acids, beta acids, Cohumulon, Colupulon, Wasser / water

Tabelle 1:  
Analysemethoden für den alpha-Säuregehalt  
Table 1:  
Methods of analysis for alpha acid content

In Deutschland und Europa werden die konduktometrischen Titrationen nach der EBC-Analytika 7.4 und 7.5 als Standardmethoden angewandt. Für Doldenhopfen wird die Methode EBC 7.4 (Extraktion mit Toluol) eingesetzt und mit diesem Verfahren werden auch die alpha-Säuregehalte für die Hopfenlieferverträge ermittelt. Die Methode 7.5 unterscheidet sich nur durch die Art der Probenvorbereitung (Extraktion mit Ether). Mit dieser Methode bestimmt man den alpha-Säuregehalt in Hopfenprodukten. Die HPLC-Methode nach EBC 7.7 liefert wesentlich mehr Informationen. Man bekommt auch die Bitterstoffzusammensetzung und den Xanthohumolgehalt. Diese Methode ist spezifischer und deshalb sind die alpha-Säurenwerte etwas niedriger. In den USA und dem Rest der Welt ist die spektralphotometrische Methode nach ASBC Hops 6A und 12 weit verbreitet (ASBC= American Society of Brewing Chemists). Man erhält Werte für die alpha- und beta-Säuren sowie auch den HSI (Hop Storage Index). Der HSI ist ein Maß für den Alterungsgrad von Hopfen und die Brauer sind an diesem Wert auch immer sehr interessiert. Die Nahinfrarotreflektions-Spektroskopie ist eine mehr physikalische Methode. Der große Vorteil ist, dass man keine Lösungsmittel braucht und viele Proben am Tag messen kann.

*In Germany and Europe, conductometric titrations according to EBC Analytica 7.4 and 7.5 are used as standard methods. Method EBC 7.4 (extraction with toluene) is used for hop cones and this method is also used to determine alpha acid content for hop supply contracts. Method 7.5 differs only in the type of sample preparation (extraction with ether). This method is used to determine the alpha acid content in hop products. The HPLC method according to EBC 7.7 provides much more information. You also get the bitter substance composition and xanthohumol content. This method is more specific and therefore the alpha acid values are somewhat lower. In the USA and the rest of the world, the spectrophotometric method according to ASBC Hops 6A and 12 is widely used (ASBC= American Society of Brewing Chemists). This gives values for the alpha and beta acids as well as the HSI (Hop Storage Index). The HSI is a measure of the degree of aging of hops and brewers are also always very interested in this value. Near-infrared reflectance spectroscopy is a more physical method. The big advantage is that you don't need solvents and you can measure many samples a day.*

### Geschichte der Nahinfrarotreflektions-Spektroskopie beim Hopfen

Mitte der 1960er Jahre wurde die NIR-Spektroskopie zum ersten Mal vom US-amerikanischen Agrarministerium zur Detektion der Qualität von Äpfeln eingesetzt. Von 2000-2008 wurde eine gemeinsame Kalibrierung

### The history of near-infrared reflectance spectroscopy with hops

*In the mid-1960s, NIR spectroscopy was first used by the U.S. Department of Agriculture to detect the quality of apples. From 2000 to 2008, a uniform calibration was developed by the AHA laboratories (AHA = Arbeitsgruppe für Hopfenanalytik = Working Group for Hop Analysis). The goals were to build a network and create a faster method for hop supply contracts. Since the accuracy was not sufficient and there were many anomalies, this calibration*

Abbildung 2:  
NIRS-Gerät der Firma Unity Scientific

Figure 2:  
NIRS instrument from the  
Unity Scientific company



von den AHA-Laboratorien erarbeitet (AHA = Arbeitsgruppe für Hopfenanalytik). Die Ziele waren der Aufbau eines Netzwerks und die Schaffung einer schnelleren Methode für die Hopfenlieferverträge. Da die Genauigkeit nicht ausreichend war und es viele Ausreißer gab, ist man von dieser Kalibrierung abgekommen. Das Hüller Labor hat jedoch die Entwicklung einer eigenen Kalibrierung fortgesetzt. Im Jahr 2017 wurde ein neues NIRS-Gerät gekauft (Abbildung 2), das sehr viel genauere Messungen ermöglicht.

### Messprinzip

Spektralphotometrische Messungen untersuchen die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Elektromagnetische Wellen kann man sich als sinusförmige Schwingungen von senkrecht aufeinander stehenden elektrischen und magnetischen Feldern vorstellen, die sich mit Lichtgeschwindigkeit (300.000 km/s) im Raum ausbreiten (Abbildung 3).

was abandoned. However, the Hüll laboratory has continued to develop its own calibration. In 2017, a new NIRS instrument was purchased (Figure 2), which allows much more accurate measurements.

### Measuring principle

Spectrophotometric measurements analyze the interaction of electromagnetic radiation with matter. Electromagnetic waves can be thought of as sinusoidal oscillations of perpendicular electric and magnetic fields propagating in space at the speed of light (300,000 km/s) (Figure 3).

All electromagnetic waves differ only by the wavelength  $\lambda$ . Energy is calculated according to formula 1:

The constant  $h$  is Planck's quantum of action with the value  $6.626 \cdot 10^{-34}$  Js,  $c$  is the speed of light and  $\lambda$  is the wavelength. The shorter the wavelength, the higher the energy.

Table 2 shows the spectrum of electromagnetic waves and where the near-infrared radiation is positioned.

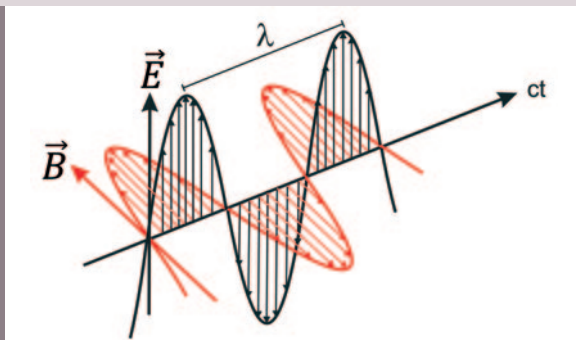
Infrared radiation is the typical thermal radiation. When a body is heated, the molecules begin to vibrate and the body emits energy in the form of infrared radiation. Figure 4 shows the measuring principle.

A ground hop sample is filled into a cuvette, which is irradiated with near infrared radiation. Part of the radiation is absorbed by the sample and part is reflected. The reflected portion is detected and evaluated by a detector. Figure 5 (on the next page) shows typical hop spectra. Measurements are taken in the wavelength range of 680nm to 2600nm. However, only the range from 1250nm to 2350nm is evaluated.

In order to be able to use these spectra for the quantitative determination of hop substances, the data must be analyzed using multivariate mathematical methods. These procedures are very complex and will not be explained in detail here. The principle is to work out how hop substances such as alpha acids contribute to the variance of the spectra. Then the substances can be analyzed quantitatively with NIRS. For a calibration equation, many spectra of different hop varieties at different locations and

Abbildung 3:  
Elektromagnetische Welle

Figure 3:  
Electromagnetic wave



Alle elektromagnetischen Wellen unterscheiden sich nur durch die Wellenlänge  $\lambda$ . Die Energie berechnet sich nach Formel 1:

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad \text{Formel / Formula 1}$$

Die Konstante  $h$  ist das Plancksche Wirkungsquantum mit dem Wert  $6,626 \cdot 10^{-34}$  Js,  $c$  ist die Lichtgeschwindigkeit und  $\lambda$  die Wellenlänge. Je kürzer die Wellenlänge ist, desto höher ist die Energie.

Tabelle 2 zeigt das Spektrum der elektromagnetischen Wellen und wo die Nahinfrarotstrahlung einzuordnen ist.

Bei der Infrarotstrahlung handelt es sich um die typische Wärmestrahlung. Wird ein Körper erwärmt, fangen die Moleküle an zu schwingen, und der Körper gibt Energie in Form von Infrarotstrahlung ab. Abbildung 4 zeigt das Messprinzip.

Bezeichnung / Designation		Wellenlängenbereich / Wavelength range	Erzeugung / Generation
Radiowellen / Radio waves	UKW - LW	1 m – 10 km	Antenne, Dipol / Antenna, dipole
Mikrowellen / Microwaves		1 mm – 1 m	Molekülrotationen / Molecular rotations
Infrarotstrahlung / Infrared radiation (Wärmestrahlung / Thermal radiation)	Far infrared Far infrared	50 µm – 1 mm	Wärmestrahlung, Molekülschwingungen  Thermal radiation, molecular vibrations
	Mid infrared Mid infrared	3 µm – 50 µm	
	Near infrared Near infrared	780 nm – 3 µm	
Sichtbares Licht / Visible light	Rot / Red	640 nm – 780 nm	Anregung von Valenzelektronen Excitation of valence electrons
	Orange / Orange	600 nm – 640 nm	
	Gelb / Yellow	570 nm – 600 nm	
	Grün / Green	490 nm – 570 nm	
	Blau / Blue	430 nm – 490 nm	
	Violett / Violet	380 nm – 430 nm	
UV-Strahlung / UV radiation		10 nm – 380 nm	Gasentladungen, Laser / Gas discharge, laser
Röntgenstrahlung / X-rays		10 pm – 10 nm	Röntgenröhre / X-ray tube
γ-Strahlung / Gamma radiation		>0 – 10 pm	Radioaktivität, Annihilation / Radioactivity, annihilation

Eine gemahlene Hopfenprobe wird in eine Küvette gefüllt, diese wird mit naher Infrarotstrahlung bestrahlt. Ein Teil der Strahlung wird von der Probe absorbiert und ein Teil reflektiert. Der reflektierte Anteil wird von einem Detektor erfasst und ausgewertet. Abbildung 5 (auf der folgenden Seite) zeigt typische Hopfenspektren. Es wird im Wellenlängenbereich von 680 nm bis 2600 nm gemessen. Ausgewertet wird aber nur der Bereich von 1250 nm bis 2350 nm.

Um diese Spektren auch für die quantitative Bestimmung von Inhaltsstoffen nutzen zu können, müssen die Daten mit multivariaten mathematischen Methoden analysiert werden. Diese Verfahren sind sehr kompliziert und sollen an dieser Stelle auch nicht näher erläutert werden. Das Prinzip ist herauszuarbeiten, welchen Anteil Inhaltsstoffe wie alpha-Säuren an der Varianz der Spektren haben. Dann können Inhaltsstoffe mit NIRS quantitativ analysiert werden. Für eine Kalibrierung müssen zunächst viele Spektren unterschiedlicher Hopfensorten an verschiedenen Standorten und mehrerer Jahrgänge aufgenommen und die entsprechenden nasschemischen Analysenwerte hinzugefügt werden. Aus diesen Daten können Kalibrierungen errechnet werden. Im Hüller Labor werden die Kalibrierungen jedes

*of several vintages must first be recorded and the corresponding wet chemical analysis values added. Calibration equations can be calculated from this data. In the Hüll laboratory, the calibrations are validated and extended every year before the harvest. There are now almost 6,000 data sets in the calibration, with both conductometric values and HPLC values.*

## Results

*Figure 6 shows a comparison of the conductometric values and the NIRS values of the 2021 ring trial.*

*Figure 6 shows very clearly the good correlation between conductometric values and NIRS values.*

*Table 3 shows the statistical parameters used to evaluate the precision for the different calibrations. Bias is the systematic deviation between NIRS values and laboratory values. SEP stands for Standard Error of Prediction, which is the standard error between the NIRS values  $y_i$  and the values  $\hat{y}_i$  of the validation samples. The SEP is calculated according to formula 2. Table 3 also shows the SEP relative to the mean in %; this allows better comparison between them.  $R^2$  is the coefficient of determination between NIRS values and laboratory values.*

Tabelle 2:  
Elektromagnetisches  
Wellenlängen-  
bereichsspektrum

Table 2:  
Electromagnetic  
wavelength range  
spectrum

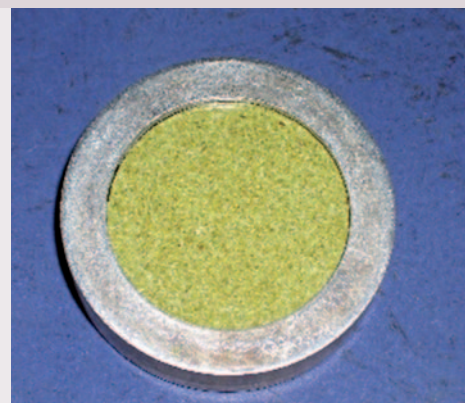
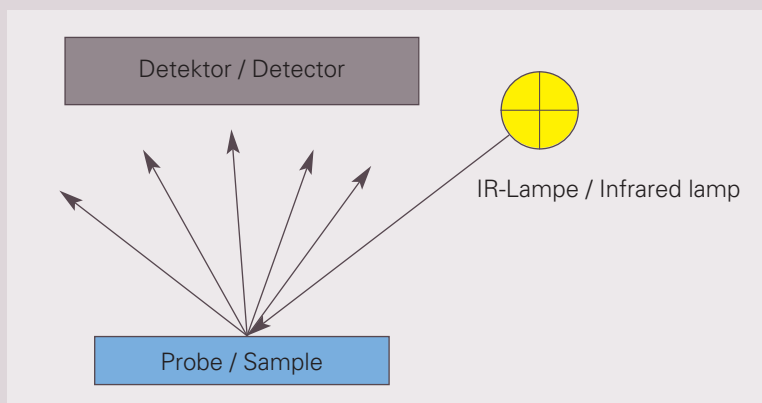
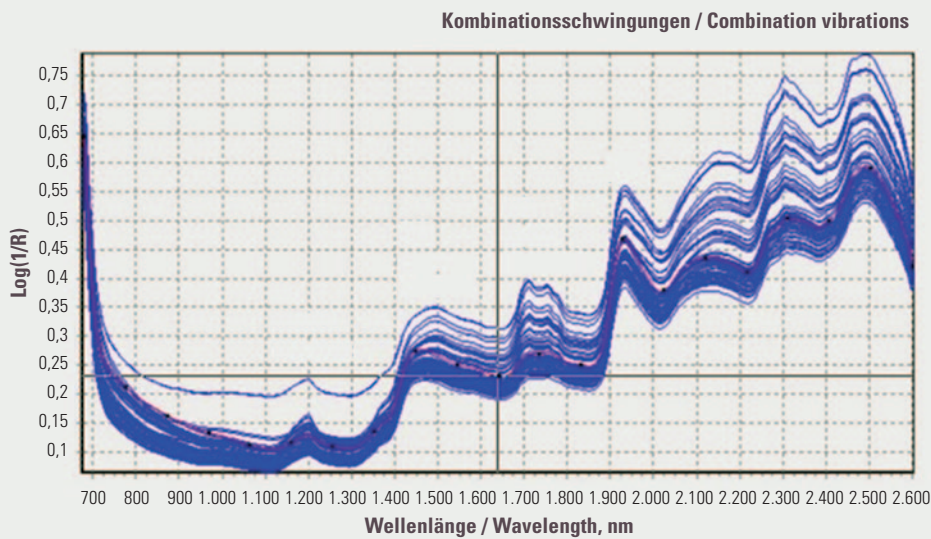


Abbildung 4:  
Messprinzip  
NIR-Spektroskopie  
Figure 4:  
Measuring principle  
of NIR spectroscopy

Abbildung 5:  
NIRS-Spektren von  
Hopfenproben  
Figure 5:  
NIRS spectra of  
hop samples



Jahr vor der Ernte validiert und erweitert. Mittlerweile befinden sich fast 6.000 Datensätze in der Kalibrierung, sowohl mit Konduktometerwerten als auch mit HPLC-Werten.

### Ergebnisse

Abbildung 6 zeigt einen Vergleich der Konduktometerwerte und der NIRS-Werte des Ringversuchs 2021.

In Abbildung 6 ist die gute Korrelation zwischen KW- und NIRS-Werten sehr klar ersichtlich.

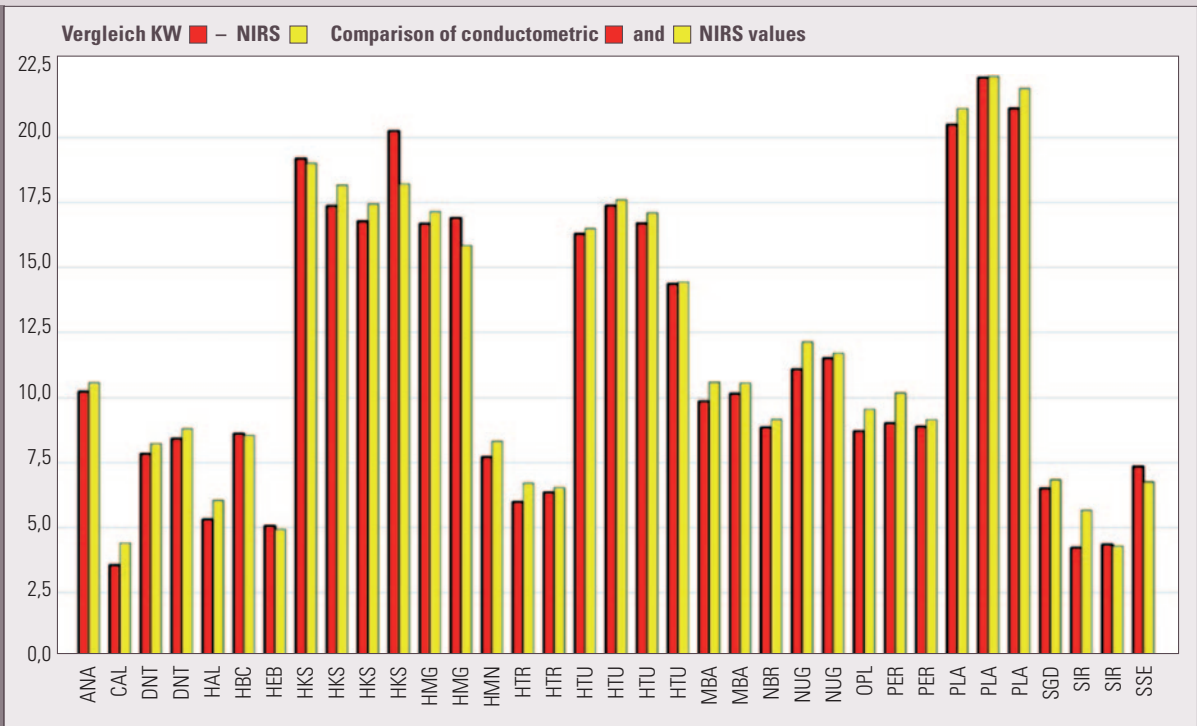
In Tabelle 3 sind die statistischen Parameter zur Bewertung der Präzision für die verschiedenen Kalibrierungen zusammengestellt. Unter dem Bias versteht man die systematische Abweichung zwischen den NIRS-Werten und den Laborwerten. SEP steht für Standard Error of Prediction, das ist der Standardfehler zwischen den NIRS-Werten  $y_i$  und den Werten  $\hat{y}_i$  der Validierungs-

*The lower SEP rel. is and the higher  $R^2$  is, the better the calibration.*

### Conclusion

*In particular, the conductometric values and the HPLC alpha acid values are very well correlated with the NIRS values. The NIRS method is somewhat inferior for the determination of beta acids. For hop breeding, near-infrared spectroscopy is a very valuable tool because you can measure many samples per day and you don't need solvents that are expensive to dispose of. However, NIRS is still too inaccurate as a method for hop supply contracts, so conductometric titration is used here. In the future, however, mainly due to improved evaluation methods such as neural networks and artificial intelligence (AI), NIRS methods will become increasingly important both for measuring hop substances and for other issues such as diseases and pests.*

Abbildung 6:  
Vergleich  
Konduktometerwerte  
und NIRS-Werte des  
Ringversuchs 2021  
Figure 6:  
Comparison of  
conductometric and  
NIRS values of the  
2021 ring trial.



Methode / Method	Bias	SEP	SEP rel.	R <sup>2</sup>
Konduktometerwert / Conductometric value	- 0,316	0,716	6,1	0,987
Cohumulon (HPLC)	- 0,188	0,667	21,2	0,924
n + Adhumulon (HPLC)	- 0,112	0,629	7,7	0,973
alpha-Säuren / alpha acids (HPLC)	- 0,417	0,929	8,2	0,977
Colupulon (HPLC)	- 0,022	0,291	11,8	0,743
n + Adlupulon (HPLC)	- 0,088	0,395	10,3	0,731
beta-Säuren / beta acids (HPLC)	- 0,015	0,557	10,5	0,717

Tabelle 3:  
Statistische  
Parameter zur  
Präzisionsbewertung  
der NIRS-Methode  
Table 3:  
Statistical  
parameters for  
precision evaluation  
of the NIRS method

proben. Der SEP wird nach Formel 2 berechnet. In Tabelle 3 ist auch der SEP relativ zum Mittelwert in % angegeben, dies erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit untereinander. R<sup>2</sup> ist das Bestimmtheitsmaß zwischen NIRS-Werten und Laborwerten.

Je niedriger SEP rel. und je höher R<sup>2</sup> sind, desto besser ist die Kalibrierung.

### Fazit

Besonders die Konduktometerwerte und die HPLC-alpha-Säurenwerte sind mit den NIRS-Werten sehr gut korreliert. Zur Bestimmung der beta-Säuren ist die NIRS-Methode etwas schlechter. Für die Hopfenzüchtung ist die Nahinfrarotspektroskopie ein sehr wertvolles Werkzeug, da man viele Proben pro Tag messen kann und keine Lösungsmittel benötigt, die teuer entsorgt werden müssen. Als Methode für die Hopfenlieferverträge ist jedoch NIRS noch zu ungenau, so dass hier die konduktometrische Titration eingesetzt wird. In Zukunft werden aber vor allem wegen verbesserter Auswerteverfahren wie neuronaler Netze und künstlicher Intelligenz (KI) NIRS-Methoden sowohl zur Messung von Inhaltsstoffen als auch anderer Fragestellungen wie Krankheiten und Schädlinge eine immer größere Bedeutung gewinnen.

Formel / Formula 2

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}}$$



Autor: Dr. Klaus Kammhuber, Leiter AG IPZ 5d  
Bayerische Landesanstalt  
für Landwirtschaft (LfL)

Anzeige / Advertisement

**Doemens liefert die richtigen Antworten**

**Doemens provides the right answers**

LEHRE // GENUSSAKADEMIE // BERATUNG, SEMINARE & DIENSTLEISTUNGEN  
EDUCATION // SAVOUR ACADEMY // CONSULTING, SEMINARS & SERVICES

Kompetenter Partner der Brau- und Hopfenbranche // Competent partner for the brewing and hop industry  
[www.doemens.org](http://www.doemens.org)