



# 运用高效液相色谱—— 二极管阵列探测技术与固相萃取法 测定啤酒中的多酚物质



叶海生 [摘译] 王贵庆<sup>\*</sup> 陈大联 [校]

安庆天柱啤酒有限责任公司技术中心 246005

**[摘要]** 由于多酚化合物在啤酒中的含量较低,如果用分光光度法测定其浓度操作比较复杂,啤酒样品要先进行予浓缩。运用固相萃取(SPE)和高效液相色谱(HPLC)——二极管阵列探测技术可分析测定以下多酚类化合物:五倍子、原儿茶素、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、水杨酸、儿茶素、表儿茶素、五羟黄酮等。这些多酚化合物对啤酒的胶体稳定性和口感稳定性有一定的影响。本方法使用了六种不同的 SPE 柱和三种不同溶剂洗脱液(乙腈、丙酮、甲醇)。HPLC 方法的可行性可通过以下参数如再现性、相对标准偏差( $RSD \leq 10\%$ )、定量限(LOQ)、检出限(LOD)等来进行证实。检测捷克啤酒结果发现其多酚化合物含量变化较大。

**[关键词]** 多酚 啤酒 HPLC SPE 分光光度法检测

啤酒中的多酚化合物基本上来自于麦芽和谷物,他们的存在使啤酒有一定的抗氧化性,其中三种多酚化合物对啤酒风味及非生物稳定性最有影响。一些单体多酚化合物:羟基苯甲酸类(如五倍子酸、原儿茶酸等)和羟基桂皮酸类(如阿魏酸、对香豆酸、咖啡酸等)。它们的化学结构式如(图 1 和图 2)所示。黄酮醇类(五羟黄酮、山奈醇等)大部分来自于谷物,一些多酚单体(儿茶素、表儿茶素),化学结构式见(图 3)所示。二聚体多酚(原花色素 B3 和原矢车菊素 B3),三聚体多酚(原矢车菊素 C<sub>2</sub>)以及黄酮醇类化合物都有较高的分子量。啤酒中最终的多酚化合物含量和生产过程控制及原料有关。

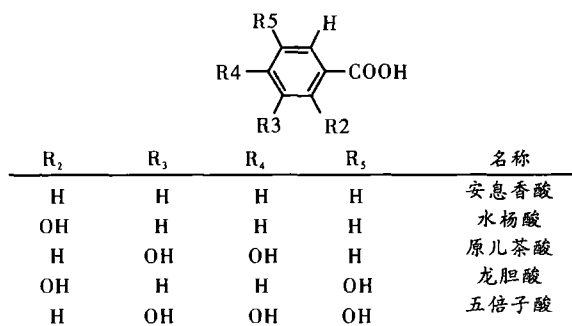


图 1

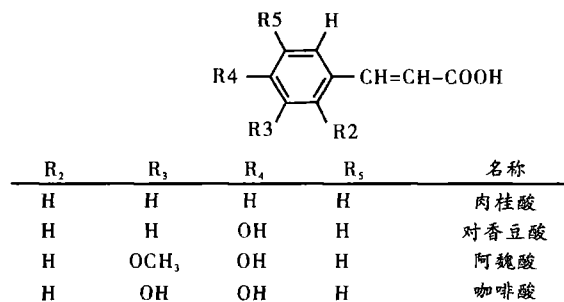


图 2

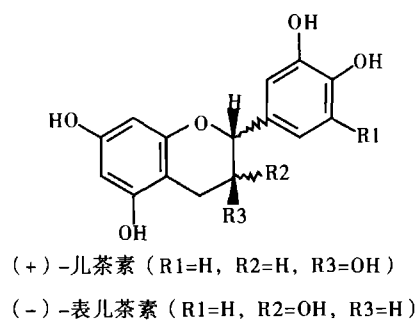


图 3 单体类化学结构式

由于多酚化合物能影响啤酒的风味和稳定性,因此有必要评价一些多酚化合物的分析方法。有些人如 Andersen (2003)通过先将啤酒样品过滤后直接注样进 HPLC 来分析多酚化合物含量,还有一些方法如 Pascual-Teresa (2000)是通过

收稿日期: 2008-07-04



2008.11

**-ebro-** 专利产品  
—新型巴氏杀菌检测仪

电话: 010-84601385 84601310 64649906 64663421  
传真: 010-84601387 手机: 13901362307  
E-mail: ling@ebro-china.com

德国颐贝隆公司中国总代理  
颐贝隆电子科技(北京)有限公司

· 61 ·

与对-二甲基氨基肉桂醛的反应,用 HPLC 和二极管阵列分光光度法在线检测多酚化合物。现在,固相萃取是很普通的探测技术,通常在白酒多酚检测中用于样品的予浓缩和提纯至最优的 HPLC 分离。啤酒多酚化合物的分离较适合的方法有 Hayes (1987) 描述的反相液相色谱-紫外光检测; Sánchez (1988)、Es-Safi (1999)、Montanari (1999) 描述的光电二极管阵列探测; Dvořáková 和 Dostálek (2006) 描述的荧光检测; Skerikova (2004) 描述的电化学检测或 Whittleand Eldridge (1999) 描述的分光光度检测。

### 材料与方法

#### ● 试剂

各种多酚化合物标准液的配制如下:

五倍子酸溶液(97%),原儿茶素酸(97%)CAS No,咖啡酸(99%)CAS No,龙胆酸(98%)CAS No,对香豆酸(98%)CAS No,水杨酸(99%)CAS No,阿魏酸(99%)CAS No,一水合儿茶素(98%)CAS No,表儿茶素(90%)CAS No 和二水合五羟黄酮(98%)CAS No,均从 SigmaAldrich 公司购买。另外还有甲醇超级梯度溶剂,乙腈,丙酮。

各种多酚化合物标准溶液的制备(500mg/L):称取 0.025g 各种多酚分析物放入 50mL 容量瓶中,并用甲醇稀释到刻度。

混合多酚标准溶液的制备(50mg/L):将上述各多酚化合物标准溶液按需要混合。所有的标准溶液置于 5℃ 阴暗处储存,稳定保存至少 3 个月。

#### ● 样品

从本地购买 7 种不同的捷克啤酒(标记样品 1~7):四种瓶装储藏啤酒(样品 2,3,4,7),一种桶装啤酒(样品 1),两种无醇啤酒(样品 5,6)。这些啤酒在阴暗处低温 5℃ 储藏。

#### ● 外加啤酒样

外加 1mL 混合多酚标准溶液于瓶装啤酒中,其酒精浓度为 4.8%(V/V),用于测试 SPE 柱。

#### ● 固相萃取

25mL 样品在一个真空装置中进行萃取,使用 6 种不同的萃取柱。各萃取柱如下:Waters Oasis<sup>®</sup> Max 柱具有反相和阴离子交换官能度的 60mg 吸收量(表面覆盖一层季胺类化合物);AccuBond ODS-C18 柱具有反相官能度的 500mg 吸收量(表面覆盖一层十八烷基硅胶类化合物);Discovery DSC-Ph 柱具有 500mg 的单体结合多酚吸收量;

Discovery DSC-C8 柱具有反相官能度的 500mg 吸收量(表面覆盖一层辛烷基可变硅胶类化合物);Discovery DPA-6S 柱具有反相官能度的 500mg 吸收量(表面覆盖一层可变硅胶中间体类化合物);Supelclean LC-18 柱具有反相官能度的 500mg 吸收量(表面覆盖一层十八烷基硅胶类化合物)。之所以选择上述分析柱是由于它们对多酚分析物具有一定的亲和性。

萃取柱用 5mL 的甲醇和 10mL 的蒸馏水进行校正。取 5mL 的啤酒样品或外加啤酒样品用 36% 的盐酸调 pH 为 1.5。多酚化合物通过这些分析柱,连续用 12mL 乙腈进行洗脱(对 DPA-6S 柱用 12mL 的丙酮洗脱,Oasis<sup>®</sup> Max 柱用 12mL 的甲醇洗脱),这些有机溶剂被转移到一个 50mL 的圆底烧瓶中,在真空 35℃ 干燥。萃取的残留物用 1mL 流动相(甲醇:水 = 50:50,用 1% 的乙酸酸化)进行溶解,并转移到一个容器中。在转移到容器之前,特定的样品必须先经过 0.45μm 膜过滤。

#### ● 总多酚化合物的测定

根据 EBC method 9.11 的方法,通过分光光度法测定啤酒的总多酚含量。取 10mL 除气啤酒和 8mL CMC/EDTA 试剂(羧甲基纤维素/乙二胺四乙酸)转移到一个 25mL 的容量瓶中,充分摇匀。然后取 0.5mL 的铁试剂(3.5% 的柠檬酸铁铵)加入到上述溶液中,摇匀。0.5mL 的氨水(氨水:水 = 1:2)加入到容量瓶中,混合均匀,并用水定容到刻度,混匀。同时做空白对照实验(不加铁试剂)。10 分钟后在 600nm 下测定吸光值。

总多酚的计算按以下公式:  $P = A \times 820$

这里:

P:总多酚含量(mg/L),A:600nm 下的吸光值。

#### ● 色谱系统和操作

HPLC 系统配备 Alliance 2695 操作模块,二极管阵列探测 2996 以及计算机操作软件。HPLC 分析中使用分析柱 150 × 3.9mm, Waters Nova-Pak 4μm C18 和保护柱 5 × 3.9mm, Waters Nova-Pak 4μm C18。在 HPLC 系统中,取整 10μL 的样品注进上述分析柱并在 20℃ 下进行洗脱。

在紫外光检测分析中,选择适合的多酚化合物最大吸收波长值如下:280nm 波长控制 12.7 分钟,改变波长到 330nm 控制 2 分钟,改变波长 306nm 控制 2.9 分钟,改变波长 280nm 控制 3.1 分钟,改变波长 306nm 控制 15.3 分钟,改变波长 280nm 进行剩余分析物的吸收检测。

五羟黄酮、五倍子酸、原儿茶素、儿茶素和表

啤酒的多酚含量测定





儿茶素的定量和测定在 280nm 下进行, 咖啡酸、对香豆酸、水杨酸在 306nm 下进行吸收, 龙胆酸在 330nm 下进行吸收。

结果与讨论

● 固相萃取优化方法

在多酚化合物的分离与提取中, 要排除掉一些干扰性化合物, 并对实验结果进行回收率的检测。25mL 的啤酒样品先经过除气再酸化至 pH1.5, 外加 1mL 的上述混合多酚标准溶液 (50mg/L), 达到平衡后, 再对外加的啤酒样品进行相应程序的处理。乙腈、丙酮、甲醇被用于对分析物在 SPE 柱中进行洗脱。三聚体分析物的测定用到了上述每一种萃取柱。样品中多酚化合物含量的回收率 (相对于外加多酚化合物的含量), 结果显示于 (表 1)。(图 4 和图 5) 显示的是消除相应干扰化合物后的稳定色谱图。在多酚化合物的测定中, 这些萃取柱显示了较好的回收率和较低的标准偏差, 其它的一些萃取柱相对有较高的回收率 (见表 1)。但 DSC-C8 and LC-C18 柱在几种多酚化合物的测定中显示了较高的标准偏差, 这也暗示了 DSC-C8 and LC-C18 柱没有一定的重现性不宜应用于此类分析。

表 1 不同萃取柱测定样品中多酚物质的绝对回收率 (%) 与相对标准偏差 (%)

| 化合物  | Oasis®<br>-MAX | AcquaBond<br>C18 | DPA-6S    | DSC-C8     | DSC-Ph    | LC-C18     |
|------|----------------|------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| 五倍子酸 | 9.1±0.9        | 14.3±2.0         | 34.5±2.1  | 24.3±1.3   | 21.5±1.3  | 22.9±3.2   |
| 原儿茶素 | 67.3±0.2       | 95.1±0.3         | 67.1±4.8  | 92.7±9.6   | 11.1±1.3  | 14.6±4.0   |
| 儿茶素  | 87.5±1.9       | 93.0±16.3        | 56.4±3.6  | 78.6±5.8   | 103.5±2.7 | 74.4±22.6  |
| 咖啡酸  | 63.7±2.4       | 15.2±4.7         | 56.0±2.5  | 31.1±2.0   | 14.8±1.8  | 25.8±2.1   |
| 表儿茶素 | 65.6±0.1       | 15.4±2.8         | 40.7±4.7  | 64.1±8.1   | 17.0±0.7  | 37.8±11.1  |
| 对香豆酸 | 72.6±0.7       | 34.7±5.0         | 85.5±4.2  | 93.3±4.2   | 34.6±1.6  | 70.6±9.1   |
| 阿魏酸  | 63.8±1.8       | 72.4±6.4         | 102.5±8.4 | 92.6±15.8  | 92.5±2.8  | 62.4±18.5  |
| 水杨酸  | 77.8±4.1       | 78.1±0.5         | 63.2±0.1  | 106.7±19.8 | 84.6±0.3  | 102.0±50.4 |
| 五羟黄酮 | 102.7±1.6      | 76.7±1.0         | 96.2±5.7  | 111.8±14.4 | 47.0±6.0  | 75.5±8.0   |

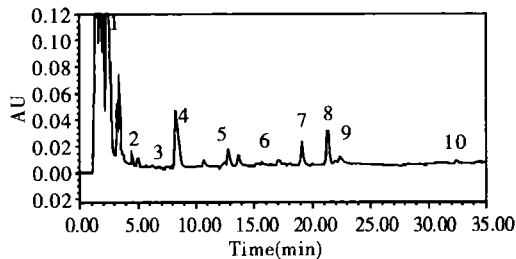


图 4 在进行 SPE 萃取前加标样的色谱图  
1-五倍子酸, 2-原儿茶素, 3-龙胆酸, 4-儿茶素,  
5-咖啡酸, 6-表儿茶素, 7-对香豆酸, 8-阿魏酸,  
9-水杨酸, 10-五羟黄酮。

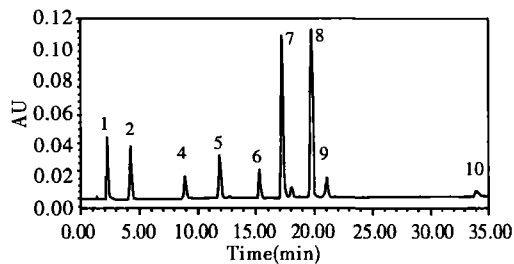


图 5 进行 SPE 萃取后加标样在 DPA-6S 柱的色谱图

1-五倍子酸, 2-原儿茶素, 3-龙胆酸, 4-儿茶素,  
5-咖啡酸, 6-表儿茶素, 7-对香豆酸, 8-阿魏酸  
9-水杨酸, 10-五羟黄酮。

● 方法论证

通过对回收率值、相对标准偏差 (RSD)、定量限 (LOQ)、检出限 (LOD) 来评价 Oasis® - MAX 柱分析的可行性, (表 2) 显示了方法论证的结果。回收率与 RSD 的数值通过同一天进行 5 个样品分析来评价。除了五倍子酸外, 这些值显示了一个好的精确度 (RSD < 10%, 回收率 > 60%)。定量限 (LOQ)、检出限 (LOD) 是通过色谱信号来评价 (n = 5)。LOD 一般是指 3 倍背景噪音的信号认为是检出信号, LOQ 通常是 10 倍背景噪音的信号。测定结果中, 定量限 (LOQ)、检出限 (LOD) 值相对于目标值分别低于 0.4mg/L 和 0.8mg/L。

表 2 方法论证: Oasis® - MAX 柱分析样品的相对标准偏差 (RSD)、定量限 (LOQ)、检出限 (LOD) 值

| 化合物  | RSD (%) | LOD (mg/L) | LOQ (mg/L) |
|------|---------|------------|------------|
| 五倍子酸 | 8       | 0.05       | 0.15       |
| 原儿茶素 | 2       | 0.11       | 0.38       |
| 儿茶素  | 4       | 0.29       | 0.78       |
| 咖啡酸  | 3       | 0.06       | 0.21       |
| 表儿茶素 | 4       | 0.23       | 0.76       |
| 对香豆酸 | 2       | 0.04       | 0.14       |
| 阿魏酸  | 2       | 0.07       | 0.22       |
| 水杨酸  | 5       | 0.41       | 0.80       |
| 五羟黄酮 | 1       | 0.16       | 0.54       |

● 啤酒样品中多酚含量

通过对不同的捷克啤酒样品分析多酚物质含量, 与标准样比较保留时间与峰面积, 通过光电二极管阵列探测技术比较样品与标准样的紫外光谱。啤酒样品的多酚化合物含量检测结果见 (表 3) 所示。总多酚含量在 70 ~ 242mg/L, 五倍子酸含量在 2.48 ~ 5.04mg/L, 水杨酸含量在 1.98 ~ 4.38mg/L, 对香豆酸含量在 1.72 ~ 2.55mg/L, 这

些多酚化合物在啤酒中含量是比较高的。另一方面,龙胆酸含量在 ND(未检测到)~0.35mg/L,表儿茶素含量在0.89~1.48mg/L,这些多酚化合物在啤酒中含量是比较低的。阿魏酸含量要高于香豆酸(由于阿魏酸是由对香豆酸途径形成。Kenyhercz和Kissinger(1977)的描述)。

表 3 通过 SPE Oasis® - MAX 柱分析样品的多酚化合物含量(数值±标准偏差)

| Oasis®<br>-MAX(mg/L) | 样品 1      | 样品 2      | 样品 3      | 样品 4      | 样品 5      | 样品 6      | 样品 7      |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 总多酚含量                | 125       | 130       | 127       | 128       | 91        | 70        | 242       |
| 五倍子酸                 | 0.28±0.02 | 0.42±0.01 | ND        | 0.28±0.02 | 0.47±0.03 | 0.39±0.03 | 0.29±0.02 |
| 原儿茶素                 | 0.45±0.04 | 0.58±0.03 | 0.43±0.03 | 0.53±0.05 | 0.78±0.04 | 0.77±0.07 | 0.43±0.04 |
| 龙胆酸                  | ND        | ND        | ND        | ND        | 0.35±0.05 | ND        | ND        |
| 儿茶素                  | 2.78±0.09 | 1.66±0.10 | 1.41±0.04 | 2.07±0.09 | 1.70±0.11 | 1.62±0.11 | 3.75±0.13 |
| 咖啡酸                  | 1.50±0.06 | 1.34±0.10 | 1.19±0.06 | 1.44±0.13 | 1.38±0.11 | 1.48±0.11 | 1.38±0.08 |
| 表儿茶素                 | 1.19±0.06 | 1.12±0.08 | 0.89±0.08 | 1.21±0.08 | 1.48±0.11 | 1.39±0.09 | 1.29±0.08 |
| 对香豆酸                 | 2.08±0.09 | 2.22±0.17 | 2.18±0.03 | 2.12±0.16 | 1.82±0.13 | 1.72±0.07 | 2.55±0.17 |
| 阿魏酸                  | 2.74±0.21 | 4.32±0.36 | 3.00±0.23 | 3.47±0.18 | 2.48±0.16 | 2.60±0.16 | 5.04±0.42 |
| 水杨酸                  | 3.39±0.30 | 3.99±0.29 | 3.50±0.20 | 4.38±0.07 | 3.33±0.04 | 1.98±0.03 | 2.25±0.16 |
| 五羟黄酮                 | 1.72±0.16 | 1.72±0.10 | 1.79±0.10 | 1.74±0.05 | 1.82±0.07 | 1.53±0.07 | 1.72±0.05 |

多酚化合物的水平与以前发表的相关数据具有一致性,如 Mc Murrough (1984)测定啤酒总多酚含量在 5~8mg/L,其主要多酚为对香豆酸、阿魏酸。Hayes (1987)测定多酚化合物作为安息香酸的衍生物,原儿茶素、五倍子酸作为肉桂酸的衍生物,咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、儿茶素、表儿茶素也都定量检测到。Floridi (2003)测定了啤酒中 19 种多酚化合物成分,平均总含量在 23mg/L,

如 0.6mg/L 的五倍子酸,0.84mg/L 的原儿茶素,0.4mg/L 的龙胆酸,1.4mg/L 的对香豆酸,2.4mg/L 的阿魏酸和 2.9mg/L 的水杨酸。García(2004)比较了 9 种无醇啤酒中的 10 种多酚物质含量,总的多酚含量范围在 3.5~8.5mg/L,阿魏酸的含量在 0.7~2.3mg/L,对香豆酸的含量在 0.1~0.7mg/L,咖啡酸的含量在 0.2~0.4mg/L,原儿茶素的含量在 0.7~5.1mg/L,儿茶素的含量范围在 0.3~4.5mg/L。

### 结 论

通过选择最优的检测方法测定啤酒中的多酚化合物含量,最方便的萃取柱具有较低的标准偏差以及较好的回收率。Oasis® - MAX 柱、阴离子交换柱和 polyamide cartridge DPA-6S 柱,它们的应用能确保多酚检测结果水平不影响啤酒风味和稳定性。DSC C8 and LC C18 柱检测多酚时有较好的回收率,但具有较高的标准偏差。龙胆酸在大部分啤酒样品中没有检测到。

Oasis® - MAX 方法是通过一些参数如绝对回收率(>60%,除五倍子酸外)、相对标准偏差<10%、定量限(LOQ)定量范围在 0.14~0.80mg/L、检出限(LOD)检出范围在 0.04~0.41mg/L 共同来进行论证。

### 参考文献(英文略)

译自:Food Science: Vol 25, No. 4: 182~188, 2007

Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection

(上接第 59 页)

提升花香和酒花颗粒味,但“辛辣味”不受倍半萜化合物的含量的影响。品评小组成员认为 Saaz 啤酒的“树脂味”比另两种啤酒明显。香叶烯有“树脂味”,但它的含量远远低于阈值,本文没有单独描述其特征。其它具有“树脂味”的化合物研究将在下一步工作中进行。我们的结果不能解释所有的感官特征,特别是高阈值的化合物,但可以解释相对含量较少的化合物。

总之,源自酒花的萜类化合物在煮沸过程其浓度有三个不同的变化模式。大部分萜类化合

物的浓度在煮沸中降低,依据沸点的不同,其浓度不是呈线性就是呈二次曲线的模式下降,但β-大马酮的浓度在煮沸过程中缓慢增加,在回旋沉淀槽中更有显著增加。将萜类化合物的含量与啤酒感官分析相结合,很难清楚地解释它们之间的相关性,特别是高阈值的化合物。

译自: 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. 2005, 53, 4701~4707.