

啤酒中嘌呤类物质的测定研究

王海容,王 蓉,付大友,何之源,李艳清

(四川理工学院材料与化学工程系,四川 自贡 643000)

摘 要: 建立了高效液相色谱法测定啤酒中嘌呤类物质含量的分析方法。啤酒中的嘌呤类物质经高氯酸水解成嘌呤碱,其优化水解条件为:啤酒:高氯酸为 1:1,100 ℃水解 30 min。优化色谱条件为:采用 Eclipse XDB-C₁₈ 反相色谱柱,以 0.02 mol/L 的 KH₂PO₄-H₃PO₄ 的缓冲溶液(pH4.00)为流动相,流速 1.0 mL/min,检测紫外波长为 210.4 nm,柱温为 25 ℃。结果表明,在优化的色谱条件下,4 种嘌呤碱的平均加标回收率为 92.91 %~102.48 %,方法精密度为 4.51 %~5.47 %。该方法的灵敏度高、操作简便、快速,能够满足啤酒中嘌呤类物质的高灵敏分析。

关键词: 啤酒; 嘌呤类物质; 高效液相色谱

中图分类号:TS262.5;TS261.4;TS261.7

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2008)10-0107-04

Determination of Purine Compounds in Beer

WANG Hai-rong, WANG Rong, FU Da-you, HE Zhi-yuan and LI Yan-qing

(Materials and Chemical Engineering Department, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: The analytic method (HPLC) of purine compounds content in beer was developed. The purine compounds in beer were prehydrolyzed to purines by perchlorate acid and the optimized hydrolysis conditions were as follows: the ratio of beer to perchlorate acid was 1:1, and 30 min hydrolysis at 100 ℃. The optimized chromatography conditions were the following: Eclipse XDB-C₁₈ RP-column, 210.4 nm by UV detector with 0.02 mol/L of KH₂PO₄-H₃PO₄ buffer solution (pH = 4.00) as mobile phase, and flow rate at 1.0 mL/min, and the column temperature was at 25 ℃. The results showed that under the optimized chromatography conditions, the average recoveries of four purine bases were 92.91 %~102.48 %, and the accuracy of the method as RSD of all four purine bases were 4.51 %~5.47 %. This method had the advantages including high sensitivity and simple and fast operation and it could be used for high sensitive analysis of purine compounds in beer.

Key words: beer; purine compounds; highly performance liquid chromatography (HPLC)

人体内嘌呤的主要来源有 3 方面:体内合成、人体组织中核酸分解以及从食物中摄取。食品中摄取的嘌呤除了游离碱基外,嘌呤主要以核酸、核苷酸和核苷的形式存在。这些含嘌呤物质的大分子和游离嘌呤碱总称为嘌呤类物质。由于人体内缺少有关尿酸分解酶,食物中摄取的嘌呤类物质的最终代谢产物为尿酸。正常人血浆中的尿酸含量为 30~50 mg/L,主要以尿酸及其钠盐形式存在。如果血液中尿酸(盐)的浓度超过 65~70 mg/L 时,即可称为高尿酸血症,有 5 %~12 %的患者会演变成痛风症^[1~2]。

对于痛风症,则不宜饮用啤酒,因为啤酒以麦芽为主要原料,麦芽中的核酸含量为 0.2 %~0.3 %^[3~4]。在糖化过程中,麦芽中的少量核酸酶受到激活,活性提高,核酸逐步降解为核苷酸和核苷,并生成少量游离嘌呤和嘧啶碱基。在发酵初期,酵母吸收嘌呤碱基,可以加快合成核酸,缩短酵母的延滞期和发酵时间。酵母几乎可以利用全部的游离嘌呤碱基,但不能吸收核苷酸和核苷等嘌

呤类物质^[5]。因此,啤酒中普遍含有较高的嘌呤类物质,含量为 40~100 mg/L^[6~8],主要以核苷酸和核苷等大分子嘌呤类物质存在。而痛风就是一种嘌呤代谢异常而引起的代谢性疾病,是由于嘌呤代谢紊乱引起血清尿酸浓度过高,尿酸结晶沉积于关节、软组织、骨骼、软骨和肾脏等处而引起的疾病。所以除采用药物治疗外,必须限制由饮食摄入过多嘌呤类物质,以控制病情^[9~10]。因此检测和控制啤酒中的嘌呤类物质的含量十分必要。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:Agilent 1100 高效液相色谱仪(包括 Agilent 1100 系列在线真空脱气机、二元高压梯度泵、手动进样器、恒温柱温箱、二极管阵列检测器(PDA)),采用 Agilent 化学工作站和数据处理软件对信号进行采集和数据处理;PHS-3CA 型精密酸度计(上海大普仪器有限责任公司);DK-2000-ML 电热恒温水浴锅(天津市泰斯

收稿日期:2008-07-01;修回日期:2008-09-27

作者简介:王海容(1983-),女,四川江油人,在读硕士研究生,主要从事食品分析研究。

特仪器有限公司);AR1140 电子天平(精确到 0.0001 g)(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);0.45 μm 水相针头过滤器。

试剂:腺嘌呤(Ade)、鸟嘌呤(Gua)、黄嘌呤(Xan)、次黄嘌呤(Hyp)、5'-腺苷酸(5'-AMP)和 5'-鸟苷酸(5'-GMP)(国药集团化学试剂有限公司,纯度大于 98%);磷酸二氢钾、磷酸(色谱纯);娃哈哈纯净水;70%高氯酸,稀磷酸,氢氧化钠,硫酸,盐酸(分析纯);市售啤酒。

1.2 嘌呤标样的制备

准确称取腺嘌呤(Ade)、鸟嘌呤(Gua)、黄嘌呤(Xan)、次黄嘌呤(Hyp)、5'-腺苷酸(5'-AMP)和 5'-鸟苷酸(5'-GMP)各 5.0 mg 用超纯水定容至 5 mL,配制成各标样浓度为 1.0 g/L 的嘌呤标样(嘌呤不易溶于水可加入 NaOH 或 HCl 助溶),置于 2~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏保存。

1.3 色谱条件

色谱柱:Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:0.02 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄ 缓冲溶液(pH4.00);流速:1.0 mL/min;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;检测器:二极管阵列检测器,波长 Sig=210.4 nm;进样量:20 μL 。

1.4 啤酒样品的制备^[11~14]

取 10 mL 除气完全的啤酒于 25 mL 具塞比色管中,加入 10 mL 70%高氯酸(HClO₄)溶液,加塞后立即置于沸水浴中,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 1 h,然后用冰浴冷却后,用 10 mol/L NaOH 溶液调整 pH 至 7.0,再用稀磷酸(20%磷酸)溶液调整至 4.0,以中性滤纸滤去沉淀物,滤液加去离子水定容至 50 mL,再以 0.45 μm 针式过滤头过滤,滤液进行 HPLC 分析。

1.5 分析方法

用高效液相色谱法检测啤酒中的嘌呤物质,采用保留时间定性,峰面积外标法定量。啤酒中总嘌呤类物质含量 = $C_{\text{Ade}} + C_{\text{Gua}} + C_{\text{Xan}} + C_{\text{Hyp}} + C_{\text{5'-AMP}} + C_{\text{5'-GMP}}$ 。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 色谱柱的选择

ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 由于采用了更先进的硅胶处理、键合以及封端技术,对于各类型化合物都可以提供更卓越的峰形和更高的柱效。特别是针对比较难分离的碱性化合物 Eclipse XDB-C₁₈ 能够显著减少峰拖尾现象。例如,对于含有叔胺结构的一些碱性化合物,由于其碱性较强,在反相条件下分离时容易与硅羟基相互作用而导致峰的拖尾甚至峰变宽。Eclipse XDB-C₁₈ 是为在宽的 pH 范围(pH2~9)获得碱性、酸性和中性化合物良好的峰形而设计的。这一宽的 pH 范围实现了使用一个系列的色谱柱进行方法开发的卓越灵活性。Eclipse

XDB-C₁₈ 色谱柱可以用于低 pH (2~3) 的初始方法开发,且可提供所有类型化合物的高分离度和出色峰形。同样的色谱柱还可用于中等 pH (6~8) 范围的方法开发。在中等 pH 范围,残留硅羟基活性更大,峰拖尾的相互作用更容易发生。为了克服这些相互作用,eclipse xdb 采用专利的工艺进行超密键合和双封端,以覆盖尽可能多的硅羟基。结果得到了 pH2~9 范围内碱性化合物的出色峰形,ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ 柱超密键合和双封端使其寿命延长,实现高速、高分离度、分析和制备放大分离。

2.1.2 流动相的选择^[15]

嘌呤是碱性化合物,因此采用 0.02 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄ 缓冲溶液作为流动相。流动相的 pH 值对各种嘌呤的分离、出峰的先后次序影响很大。不同的 C₁₈ 色谱柱,应选择不同的 pH 值以达到最佳的分离。实验结果表明,选用 Eclipse XDB-C₁₈ 柱分离嘌呤类化合物时,最佳的 pH 值为 4.0。

2.1.3 流速的选择

在上述色谱条件下,分别考察了不同流速条件(0.8 mL/min、1.0 mL/min、1.5 mL/min)对嘌呤分离度的影响。实验结果表明,在 0.8 mL/min 的流速下,嘌呤物质的分离度较好,但谱峰扩张增大,柱效下降,且分离时间较长(20 min);在 1.5 mL/min 的流速下,谱峰扩张降低,柱效提高,峰形也比较尖锐,但分离度降低,将导致啤酒样品中的杂质峰难以分开。因此,选用常规流速 1.0 mL/min。在此条件下,分离度及柱效都较好,且分离时间适当。图 1 为 6 种样品的混标图。

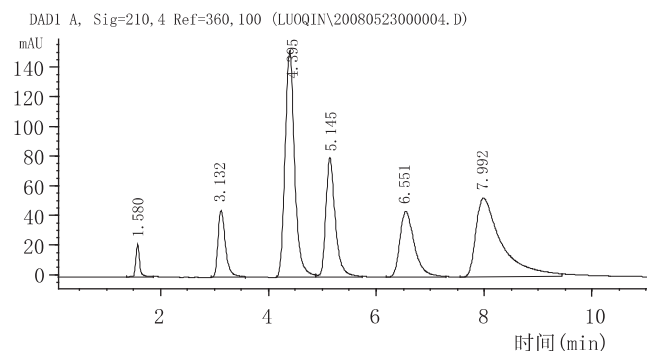


图 1 25 $^{\circ}\text{C}$ 时的混合标样色谱图

2.1.4 柱温的选择

一般情况下,室温就可以满足 HPLC 的分离要求。因此本研究柱温采用 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.5 检测波长的选择

嘌呤类生物碱基均具有共轭离域大 π 键结构,在紫外光区具有强烈的光吸收特性。在 1.3 节所设定的色谱条件下,用二极管阵列检测器(DAD)对嘌呤类物质标样

进行检测,并保存全光谱,结果见图2。

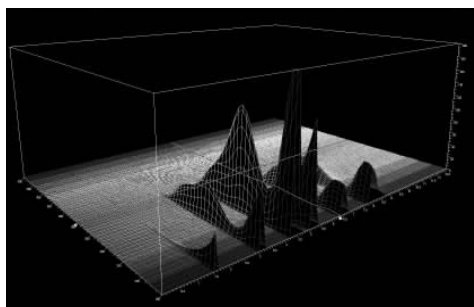


图2 嘌呤类物质全光谱图

由谱图2可知,当检测波长在200~300 nm时,4种嘌呤和2种核苷酸有吸收,且在210.4 nm处都有最大吸收。因此,本文选择DAD的检测波长为210.4 nm。

2.2 啤酒样品水解条件的正交试验的建立

进行正交试验,结果以总嘌呤含量计,见表1。表1中、和分别表示水平A、B和C的3次试验中总嘌呤含量之和,极差R则是、中的最大数减去最小数的结果。

表1 正交试验方案和试验结果

试验号	啤酒: 高氯酸	水解温度 (℃)	水解时间 (min)	总嘌呤含量 (mg/L)
1	A(1:0.5)	A(50)	A(30)	65.92
2	A(1:0.5)	B(80)	B(45)	66.36
3	A(1:0.5)	C(100)	C(60)	65.15
4	B(1:1)	A(50)	B(30)	71.15
5	B(1:1)	B(80)	C(45)	60.67
6	B(1:1)	C(100)	A(60)	71.32
7	C(1:2)	A(50)	C(30)	71.14
8	C(1:2)	B(80)	A(45)	58.65
9	C(1:2)	C(100)	B(60)	58.62
10	1:1	100	45	70.99
11	1:1	100	30	74.96
I(三次水平A之和)	197.4	208.3	188.9	
II(三次水平B之和)	196.4	185.7	196.1	
III(三次水平C之和)	188.5	188.1	197.1	
极差	8.927	22.62	8.157	

由表1中极差分析结果不难看出,影响水解条件的因素重要性依次为:水解温度、高氯酸加量和水解时间。根据正交试验结果,可能好的水平组合是啤酒:高氯酸的比例1:1、水解温度50℃和水解时间45 min。但是,随着水解温度和水解时间的减少,水解产物色度变浅,对色谱结果可能造成影响。为此进行验证试验得到的优化条件结果是74.96 mg/L(试验号11),和试验号6进行比较,两者相差很小。因此,本试验确定水解条件为除气啤酒和高氯酸的比例为1:1、100℃水解30 min。

2.3 标准曲线方程、相关系数和检出限

准确配制含量分别为0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、

5.0 mg/L、10.0 mg/L、50.0 mg/L、100.0 mg/L 6种嘌呤类物质样品标准溶液,按1.3节所列条件进行实验,以标样浓度(X, mg/L)对相应的峰面积(Y)进行线性回归,考察仪器的线性范围,结果见表2。按3倍信噪(S/N)计算检出限,结果见表2。

表2 6种嘌呤类物质的回归方程、相关系数和检出限

嘌呤	回归方程	相关系数 R_2	检出限 (mg/L)
Ade	$y=14.2751x+140.1507$	0.9894	0.52
Gua	$y=0.1764x+59.3812$	0.9897	0.25
Xan	$y=4.8934x+78.2810$	0.9872	0.07
Hyp	$y=11.9251x+62.6870$	0.9891	0.14
5'-AMP	$y=7.1129x+79.3629$	0.9806	0.25
5'-GMP	$y=0.5417x+29.0863$	0.9906	0.21

注:表中x单位是mg/L。

结果发现,6种嘌呤类物质在0.5~100 mg/L的浓度范围内,标准曲线的线性相关系数很好。

2.4 回收率与精密度实验

取已知含量的样品1份,加入不同质量浓度的4种嘌呤标准品溶液,制备成高(大约100 mg/L)、中(约10 mg/L)、低(约2 mg/L)3个浓度的混合液,按上述方法和条件各平行测定6次,计算回收率和精密度。并依1.4的条件,对不同质量浓度的两种核苷酸进行水解后检测,计算回收率和精密度,结果见表3。

表3 回收率测定结果(n=6)

样品	本底值 (mg/L)	加标样 (mg/L)	平均测定值 (mg/L)	平均回收率 (%)	RSD (%)
Ade	8.33	101.5	107.9	98.10	4.86
		10.05	18.32	99.40	1.19
		2.02	10.40	102.48	3.19
Gua	48.58	100.5	147.4	98.33	4.74
		10.15	58.92	101.87	2.71
		1.97	50.91	100.7	2.14
Xan	3.87	101.1	104.5	99.54	2.69
		9.80	13.38	97.04	2.69
		2.00	5.76	94.50	4.16
Hyp	8.09	102.4	108.6	98.15	4.26
		9.95	17.58	95.38	1.55
		2.04	10.27	101.4	1.56
5'-AMP	6.46	101.5	102.9	95.01	2.96
		10.1	13.73	92.91	4.79
		2.05	7.91	93.51	3.96
5'-GMP	5.47	100.0	103.3	97.83	2.86
		10.08	14.87	93.25	3.59
		1.99	7.22	96.64	2.86

由表3可知,两种核苷酸进行水解,5'-腺苷酸(5'-AMP)的回收率在92.91%~95.01%,而5'-鸟苷酸(5'-GMP)的回收率可得93.25%~97.83%。4种嘌呤的回收率,无论进行水解与否,回收率均在94.50%~102.48%

之间。

2.5 样品分析

啤酒样品的测定结果分析:对市售啤酒测定高氯酸水解前后嘌呤类物质含量,结果见表 4。

表 4 高氯酸水解前后的啤酒样品中的嘌呤含量

样品	Ade (mg/L)	Gua (mg/L)	Xan (mg/L)	Hyp (mg/L)	总嘌呤 (mg/L)
啤酒水解前	2.18	2.86	9.42	0.80	15.26
水解后	12.65	37.75	20.26	2.06	72.72

从表 4 可看出,次黄嘌呤在啤酒中含量较低,而经高氯酸水解后,腺嘌呤和鸟嘌呤含量变化很大,这是因为啤酒在发酵过程中,酵母只代谢鸟嘌呤和腺嘌呤等游离嘌呤碱基。由于酵母不能吸收嘌呤类大分子物质,啤酒中总嘌呤类物质含量仍然较高^[10]。

3 结论

采用高效液相色谱仪对啤酒中的嘌呤类物质进行了分析,得到了较满意的结果。利用 HPLC 测定啤酒中的嘌呤类物质含量方法的精密密度为 4.51%~5.47%,嘌呤类物质的回收率为 92.91%~102.48%,满足分析要求,同时呈现出了很好的线性关系,利用该法测定啤酒中的嘌呤类物质含量,具有操作高效、快速、准确的特点,并且还可以一次性检测全部嘌呤类物质,是分析啤酒中嘌呤类物质的理想方法。

参考文献:

- [1] 张昌颖.核酸生物化学[M].北京:人民卫生出版社,1993.
- [2] 杜惠.上海市黄浦区社区高尿酸血症与痛风流行病学调查[J].中华风湿病杂志,1998,(2):75-78.

- [3] 李志良.高效液相色谱法测定麦汁、发酵液和啤酒中的嘌呤含量[J].辅仁医学期刊(台湾),2007,30(14):65-72.
- [4] 管敦仪.啤酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [5] PRENTICE N. Nucleobases and nucleosides in beer[J].MBAA, 1976,13(3):177-181.
- [6] Lee W J,Prentice N. Utilization of nucleosides and nucleobases by the lager yeast[J]. J Am Soc Brew Chem,1987,45(4):128-131.
- [7] Lee W J. Guanosine nucleosidase from germinated barley[J]. J Am Soc Brew Chem,1988,46(3):92-96.
- [8] Lee W J,Pyle R E. Nucleic acid degrading enzymes of barley malt[J]. J Am Soc Brew Chem,1985,43(1):1-10.
- [9] 黄丽玲,林川雄,黄建财.痛风与高尿酸症的认知与管理[J].辅仁医学期刊,2005,3(1):25-32.
- [10] 吴先华,潘峰,钱亚琼等.饮酒与尿酸[J].中国实验诊断学,2005,9(3):456-457.
- [11] Nguyen T T, Sporns P, Hadziyev D.Simultaneous liquid chromatography determination of ribonucleoside-5'-monophosphates and their iso-mers in potato tubers[J].J Chromatogr, 1986,363(15):361-281.
- [12] Qureshi A A, Prentice N. Quantitation of potential flavoring compounds in worts and beers by HPLC[J].J. Am. Soc. Brew. Chem.1979,37(4):153-160.
- [13] 刘绮萍,瞿萍,施玉芳,等.反相高效液相色谱法测定嘌呤、嘧啶类化合物[J].色谱,1996,14(4):310-312.
- [14] 骆锡能,陈翠瑶.水产品嘌呤含量定量方法的建立[J].食品科学(台湾),1997,24(1):1-11.
- [15] 钟晓盈,陆幼兰.利用 HPLC 测定啤酒嘌呤含量方法的研究[J].食品科学,2007,20(5):64-70.
- [16] 林先军,李永仙,李崎,等.反相离子对色谱法测定啤酒中的嘌呤类物质[J].食品科学,2006,27(09):219-222.

董香地方标准颁布及经典董酒 上市新闻酒会在遵义召开

本刊讯:借 2008 中国(遵义)酒类博览会之机,中国老八大名酒董酒董香地方标准颁布及经典董酒上市"新闻酒会在遵义召开。贵州省、遵义市政府主管白酒行业领导及主管部门领导出席了董香地方标准颁布及经典董酒上市"新闻酒会;瓦努阿图驻华大使罗治华先生及夫人,密克罗尼西亚联邦公使卡尔·阿皮斯夫妇也应邀出席了新闻酒会;参加董香地方标准颁布及经典董酒上市"新闻酒会的还有贵州、广西、东北、山东、河南、河北等地级市的客商。

“董香地方标准颁布”,标志着中国白酒业一个新流派、一种新香型得到确认;表明董酒品质”不断规范化、不断受到政府重视,将更进一步被行业 and 消费者确以高度的认同。在经典董酒的上市揭幕活动上,董酒公司介绍了品鉴经典董酒的品质与特点。

董酒作为贵州酒的代表之一,以董香而驰名;董香型白酒目前也唯有董酒。董酒香型的独特在于其酿造工艺与其他白酒都不同。董酒采用小曲小窖制取酒醅、大曲大窖制取香醅、双醅串香生产工艺,经分级陈酿、科学勾兑而成。董酒酒液清澈透明,香气幽雅舒适,入口醇和浓郁,饮后甘爽味长,集酯香、醇香、百草香”于一体。

董香型白酒地方标准的颁布,填补了中国白酒行业在董香型白酒标准上的空白。“董香地方标准颁布及经典董酒上市”新闻酒会的召开将进一步提高董酒品牌的美誉度。(孙悟)



经典董酒上市揭幕