

啤酒中嘌呤类物质测定方法的研究进展

王海容,付大友

(四川理工学院材料与化学工程学院,四川 自贡 643000)

摘要: 综述了啤酒中嘌呤类物质的几种测定方法,同时介绍了啤酒样品测定前的几种预处理方法,包括啤酒中二氧化碳的去除方法和啤酒中嘌呤类物质的几种水解方法。

关键词: 啤酒; 嘌呤类物质; 测定

中图分类号: TS262.5; TS261.4

文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2009)06-0095-04

Research Advance in the Determination Methods of Purine Compounds in Beer

WANG Hai-rong and FU Da-you

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

Abstract: Some kinds of determination methods of purine compounds in beer were reviewed in this paper. Besides, the relative pretreatment methods before beer samples determination were introduced including the degassing of CO₂ and the hydrolysis methods of purine compounds in beer.

Key words: beer; purine; determination

核苷酸、核苷和碱基的分析方法目前主要有毛细管电泳法、离子交换色谱法、离子对色谱法、反相高效液相色谱法、薄层色谱法等,各种方法对样品的前处理以及测定的嘌呤类物质结果不尽相同^[1~3],国内外对啤酒中嘌呤的测定和检测的研究也鲜有报道。本文主要综述了检测啤酒中嘌呤类物质含量的研究进展,并且介绍了啤酒样品的几种前处理方法。

1 啤酒中嘌呤类物质含量的测定方法

1.1 啤酒样品制备中除去二氧化碳的方法

啤酒是富含二氧化碳的低酒精饮料,在进行啤酒理化指标分析中,为确保每项指标的精确性,常常需要在样品制备过程中除去二氧化碳。啤酒样品的脱气方法有许多种,每种去除方法各有优缺点,现在我国推行的国家标准测定方法中有倒杯法和过滤法,国际上使用的有超声波法,ASBC法(美国酿造化学家协会分析法)等^[4]。

水浴法:啤酒除气(测pH值)是将啤酒放在40℃(温度偏差不大于0.5℃)水浴锅内,30min摇动次数不少于6次即可。

注流法:取预先在冰箱中冷至10~15℃的啤酒500~700mL于清洁、干燥的1000mL搪瓷杯中,让啤酒以细流注入同样体积的另一搪瓷杯中,且两搪瓷杯之间距离20~30cm。这样反复注流50次(一个反复为一次),以充分除去酒中二氧化碳,静置。

过滤法:将200mL恒温至15~20℃样品经过漏斗(漏斗上复一张24cm 513级滤纸)滤入250mL三角烧瓶。样品一旦倒入漏斗,立即用铝箔盖好漏斗口。尽量减少蒸发。

摇荡法:倒出瓶中大部分啤酒,留少量即可,然后用酒精纱布(剪小块纱布放入75%vol的酒精中备用)盖住瓶口,摇荡除气至完全。

低温放置法:瓶装啤酒在4℃条件下放入敞口容器中12h,除气。

超声波池法:将200mL恒温至15~20℃的啤酒样品倒入500mL三角烧瓶中,用铝箔将该瓶盖好,置于含10cm水的超声波池内,用40~90kHz超声波处理15min。

超声波+过滤法:样品用上述方法在超声波池内处理10min,随后经过漏斗(漏斗上覆一张24cm 513级滤纸)将样品滤入250mL三角烧瓶。样品一旦倒入漏斗,立即用铝箔盖好漏斗口。

ASBC法:将200mL样品倒在500mL三角烧瓶内,先轻轻摇动,然后激烈摇动,直到啤酒中没有气体溢出为止。

1.2 啤酒样品水解法

啤酒中的嘌呤类物质以游离态、结合态两种形式存在,其中以结合态为主,因此测定啤酒中嘌呤类物质的含量要以酸来消化样品^[5~8],使核苷、核苷酸转化成游离的

收稿日期:2009-02-24

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。

鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤,然后进行检测,以对啤酒中的嘌呤类物质进行定性、定量分析。

1.2.1 高氯酸水解法^[9]

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 °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,再用稀磷酸溶液调整 pH 至 4.0,用滤纸滤去大部分沉淀物,并在过滤残渣中加超纯水洗涤残渣,滤液定容至 50 mL,再以 0.45 μm 针式过滤头过滤,滤液进行分析。

高氯酸水解法的优点:高氯酸水解的啤酒样品中的腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤分离效果较好,准确度和精密度高。

高氯酸消化法的缺点:①样品用高氯酸水解 1 h,用碱中和即生成大量的沉淀物,需过滤除去杂质,并用水洗涤杂质中残留的嘌呤,这一操作繁琐,费时长;②消化过程产生大量的氯气,有毒;③高氯酸反应剧烈,使生成的嘌呤进一步氧化,导致 HPLC 外标定量法测定各嘌呤含量其变异系数大,各种嘌呤回收率总体偏低。

1.2.2 硫酸水解法^[10]

取 2 mL 除气完全的啤酒于 25 mL 具塞比色管中,加入 2 mL 3 mol/L 硫酸溶液,加塞后立即置于沸水浴中,在 100 °C 下水解 10 min,然后用冰浴冷却后,用 10 mol/L KOH 溶液调整 pH 至 2.0~8.0 范围,加去离子水定容至 10 mL,再以 0.45 μm 针式过滤头过滤,滤液进行分析。

硫酸水解法的优点:①水解时间短,消化后用碱中和没有产生大量的沉淀物,免过滤,操作简便、快速;②不产生有毒气体;③啤酒嘌呤的加标回收率高,嘌呤含量的重复性好。

硫酸水解法的缺点:硫酸盐在高温冷却后会析出结晶(硫酸钠在水中溶解度较大,对温度变化也敏感,通常室温都能获得很好的晶型和得率,起结晶体为十水硫酸钠,温度超过 32 °C 将失去结晶水,因此在 32 °C 以下为晶体,而温度超过 32 °C 体系将转为溶液;水中,0 °C 时硫酸钾的溶解度为 1.75 g,室温下(20 °C)为 5.3 g,随温度的升高而迅速升高,高温冷却后会析出晶体,结晶)。

1.2.3 三氟乙酸水解法^[8~10]

取 10 mL 除气完全的啤酒于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 10 mL 三氟乙酸与甲酸(1:1)混合液(加甲酸可保护嘌呤),在 98~101 °C 油浴锅中进行回流水解 1 h 后,迅速冰浴冷却,用 15 mol/L KOH 溶液中和,将 pH 值调至 7,再用稀 H₃PO₄ 调 pH 值至 3.0,用滤纸过滤,然后加超纯水定容至 50 mL,再用 0.21 μm 滤膜过滤,滤液进行分析。

三氟乙酸水解法的优点:4 种嘌呤能基线分离,且与

啤酒中的其他杂质分开,可用于定量分析;用三氟乙酸与甲酸(1:1)混合液水解的啤酒嘌呤的含量高,能完全水解啤酒中的核苷和核苷酸,且不会氧化水解出的嘌呤;检测时间短。

三氟乙酸水解法的缺点:副产物较多,影响检测精度。

此外,也有用磷酸、盐酸、乙酸水解啤酒中嘌呤类物质的。

1.3 啤酒中嘌呤类物质含量的测定方法

1.3.1 毛细管区带电泳测定啤酒中嘌呤含量^[11]

毛细管电泳方法特别是毛细管区带电泳已经成为了一种通用的方法和质量控制技术,并且可取代普通的色谱方法。因此,这些技术越来越多地被用于分析真实样品中的各种不同的溶质,包括在食品化学方面的应用。越来越多的文献报道毛细管区带电泳用途的研究,它可以用来测定如低分子量有机酸、碳水化合物、蛋白质、维生素或无机离子等一系列食品和饮料中的重要分析物。

毛细管区带电泳法测定啤酒样品中的嘌呤和嘧啶是用毛细管区带电泳分离嘌呤碱基,使用紫外检测器在 254 nm 检测,质谱检测器采用电喷雾接口,质谱检测器采用负离子模式,干燥氮气的流速维持在 1.4 L/min,四极温度维持在 100 °C,分光计在单离子监测模式下运行,记录所有所选择的质荷比和在整個时间范围保留时间为 50 ms 的,含有 0.25% 二乙胺的 2-正丙醇:水为 80:20 的套液流速为 4 μL/min。方法检测限在 0.1~0.3 mg/L 的范围内,并且校准图是线性的至少两个数量级。这种先进的分析实际样品的方法适用于分析一些啤酒样品中物质的含量,欧洲一系列不同啤酒厂的熟啤酒样品和一定数量的完全不同种类的啤酒使用先进的毛细管电泳方法,采用紫外检测器在 254 nm 检测,研究了其中被测嘌呤和嘧啶的含量。

结果表明,毛细管电泳法测定嘌呤基的方法适用于各种产地的各种各样的啤酒测定。这种方法的主要优点是简单、快速,在分析啤酒样品前除了脱气和稀释外无需其他的预处理。这种先进的分析方法的线性和检出限足够用来测定啤酒样品中被测组分。所研究的啤酒中嘌呤和嘧啶的含量显示和文献中的数据一致。基于二乙胺的强碱性的载液用于整个检测过程中以确保样品的峰形充分的分离。此外,由于其挥发性,它也允许使用 ESI-MS 分析检测来得到更精确的分离峰形。毛细管区带电泳法的优缺点:高效毛细管电泳法具有很高的分离效率,能将各种核苷酸很好地分离,但目前这种新型仪器主要靠进口,价格昂贵,使用这种仪器受到一定条件的限制。

1.3.2 高效液相色谱法测定啤酒中嘌呤含量

高效液相色谱(HPLC)的主要优点是:①分辨率高于

其他液相色谱法;②速度快,十几分钟到几十分钟可完成;③重复性高;④高效相色谱柱可反复使用;⑤自动化操作,分析精确度高。高效液相色谱在生物领域中广泛用于下列产物的分离和鉴定:①氨基酸及其衍生物;②有机酸;③甾体化合物;④生物硷;⑤抗菌素;⑥糖类;⑦卟啉;⑧核酸及其降解产物;⑨蛋白质、酶和多肽;⑩脂类等。因此,在食品和药物分析中检测嘌呤类物质,使用高效液相色谱方法^[12~17]可得到较好的结果。

测定方法:经除气水解后的啤酒样品用 0.45 μm 针式过滤头过滤,滤液进行高效液相色谱分析。样品测定的色谱条件^[10]:色谱柱:BDS Hypersil C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流动相:0.02 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₃ 缓冲溶液(pH=4.0);流速:1.0 mL/min;进样量:5 μL ;检测器:紫外检测器,检测波长为 254 nm。

研究表明,采用 BDS Hypersil C₁₈、酸消化法分析啤酒中的嘌呤,操作简便,分离效果好,嘌呤含量的重复性好、回收率高。此方法为研究啤酒中嘌呤类物质提供了快捷、可靠的检测手段。

1.3.3 反相离子对色谱法测定啤酒中的嘌呤类物质

离子对色谱(IPC)能够简化离子和非离子化合物的分离。嘌呤类物质在 pH>3 时带负电荷,因此 IPC 是常用分析工具^[18]。反相离子对色谱(RP-IPC)兼有反相高效液相色谱和离子色谱的特点,保留了反相液相色谱操作简单、柱效高的优点,适用于分离离子型化合物和中性化合物。该方法先采用酸水解将啤酒中的嘌呤类物质水解成腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤 4 种嘌呤,然后用 RP-IPC 进行分离测定。

测定方法:经除气水解后的啤酒样品用 0.45 μm 针式过滤头过滤,滤液进行反相离子对色谱分析。样品测定的色谱条件^[3]:色谱柱: $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ 10 μm , 125A, 4.6 mm \times 300 mm;流动相为水:甲醇:冰乙酸:四丁基氢氧化铵为 883:5:100:15:1.5 (V/V/V/V),流速为 1.0 mL/min;柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL ;检测器:紫外检测器,检测波长为 254 nm。

采用反相离子对色谱法测定啤酒中的嘌呤类物质,样品水解方法简单,操作方便、准确度高、精密度及回收率高,并且可以一次性检测全部嘌呤类物质,也是分析啤酒中嘌呤类物质的理想方法。

1.3.4 塔层析法分析麦芽汁和啤酒中的嘌呤核苷和自由含量^[28]

当含有嘌呤或嘧啶团的低分子堆复合物在高性能规模排阻层析法支持下(Superose12 和 Superdex75),用色层法分离时,展示出吸附基的保持特性。研究该现象就能够发展对麦芽汁和啤酒中的嘌呤核苷和自由基进行定量分析的方法。以前麦芽汁和啤酒中核酸派生物定量估计

的方法受到分析前活性炭吸附/解吸附效率的限制。使用塔层析法对麦芽汁和啤酒进行直接分析方法的发展缓解了这一问题,并且使个体复合物离析有了实质性提高。适用于麦芽汁和啤酒中核酸派生物分析的塔层析法的原理是以阴离子交换层析法和规模排阻层析法为基础的。应用于麦芽汁和啤酒分析的 FPLC 方法的应用结果表明以基质 Superose12 为基础的琼脂糖相对于惯用的规模排阻层析基质提供了比个体低分子堆成分更进步的离析。我们通过分析啤酒在两种高性能规模排阻层析基质(Superose12 和 Superdex75) 中的淘析分布的全部特征证实了对麦芽汁和啤酒中嘌呤核苷和自由基直接进行定量分析的方法。

原料及方法:商用瓶装啤酒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放入敞口容器中 12 h 来除气。鲜亮的啤酒样本直接适用于 Superose12 和 Superdex75 塔,在分析前将含有混浊体或泡沫的啤酒通过过滤薄膜(0.22 μm 平均孔径)或离心沉淀澄清。塔层析法:由生产厂家(法马夏生物技术公司)提供包装前的 Superose12 和 Superdex75 塔(HR10/30)。每一塔在相同条件下连同同一个法马夏 DFBHPLC 系统一起操作。适用于每一塔的麦芽汁、啤酒或层析法标准的容量是 200 μL 。塔的淘析是在室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)条件下,与不含缓冲剂的 100 mmol/L 氯化钠溶液在塔洗提液持续流速在 0.25 mL/min 条件下进行的。使用 VMW2141 多种渡卡监测器(法马夏生物技术公司)测定塔洗提液的紫外线吸收峰集中在 260 nm 和 280 nm。通过分馏蛋白质单位(发酵乙醇脱氢酶 Mr150.000,牛浆蛋白质 Mr67000,卵清蛋白 Mr44.000 和细胞色素 Mr13.300)可以研究出两个塔的规模排阻色层分离法的特征。

麦芽汁和啤酒中的低分子堆溶质通过 Superose12 和 Superdex75 的色层分离反应,对它的研究有利于提高估测嘌呤核苷和自由基浓度时定量分析方法。本研究所显示的结果充分证实了这种分析技术。这种方法可以对不经任何处理的麦芽汁和啤酒直接进行分析并且可以替代以阴离子交换层析法为基础的方法。这些方法实施的快速性和简便性说明它不但适用于常规质量管理分析,并且可以作为研究手段调查在酿造过程中核酸派生物的演变。

此外,Dale 等^[19~20]使用凝胶柱、电泳等对啤酒中的核苷酸、核苷和嘌呤进行分步收集、分别测定;Somers 等^[21]对麦汁和啤酒中的核苷酸类物质利用紫外吸收原理进行了测定。

2 结束语

通过介绍啤酒样品的前处理即啤酒中二氧化碳的去除方法、啤酒样品的水解方法和测定方法,以及对各种方法的可靠性(优缺点)进行了综述,为研究啤酒中嘌呤类

物质提供了几种快捷、可靠的检测手段,采用这些方法可以为啤酒中嘌呤类物质的测定提供参考。在以后的研究中,应更加深入地研究更好的水解方法,找到操作简便、准确度和精密度高、水解时间短、嘌呤含量的重复性好、回收率高的水解方法,改进分离测定条件,从而为研究啤酒中嘌呤类物质提供更加快捷、可靠、准确的检测手段和理想的分析方法。

参考文献:

- [1] 李志良,张五九. 高效液相色谱法测定麦汁、发酵液和啤酒中的嘌呤含量[J]. 分析与检测,2006,32(3):73-75.
- [2] 雷崑,黄雅琳.壳聚糖对啤酒中嘌呤的吸附性能[J].安徽农业科学,2006,34(7):1431.
- [3] 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(9):219-222.
- [4] 胡叔平.啤酒除二氧化碳的方法及评价[J].食品工业,1993,(3):24-25.
- [5] Nguyen T T, Sporns P, Hadziyev D. Simultaneous liquid chromatography determination of ribonucleoside-5'-monophosphates and their isomers in potato tubers[J]. J Chromatogr, 1986, 363: 361-281.
- [6] 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.
- [7] 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):316-312.
- [8] 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.
- [9] 尤玉如,张艳萍,刘士旺.HPLC法测定啤酒中嘌呤含量的方法研究[J].中国酿造,2008,3:76-79.
- [10] 钟晓盈,陆幼兰.利用HPLC测定啤酒嘌呤含量方法的研究[J].啤酒科技,2007,3:23-26.
- [11] Klampfl,Christian W.Himmelsbach,Markus,Buchberger,Wolfgang,Klein,Helmut.Determination of purines and pyrimidines in beer samples by capillary zone electrophoresis[J]. Analytica Chimica Acta,2002,454(2):185-191.
- [12] 石义林,韩金士,刘绮萍,等.嘌呤类生物碱的反相高效液相色谱分离及饮料中咖啡因的测定[J].分析实验室,1996,15(3):15-18.
- [13] 丁明玉,杨海军,肖善强,等.反相高效液相色谱法直接测定茶水提取物中的嘌呤碱[J].色谱,1999,17(5):459-461.
- [14] 霍小敏,屠春燕,宋慧敏,等.HPLC法测定酵母RNA降解的4种核苷酸[J].南京工业大学学报,2002,24(4):61-64.
- [15] 黄晓兰,李良秋,陈云华,等.核酸水解产物嘌呤、嘧啶碱基在BDS柱上的分离及测定[J].色谱,2000,18(6):500-502.
- [16] 李家胜,王友明.HPLC法测定肌肉中核苷酸及其降解物[J].科学通报,2002,18(4):323-326.
- [17] 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.
- [18] Garcia, 等;刘铮,等译.生物分离过程科学[M].北京:清华大学出版社,2004.32-34.
- [19] Dale C J, Lyddiatt A. Quantitative analysis of purine nucleosides and free bases in wort and beer[J]. J Inst Brew,1994,100(3):173-178.
- [20] Dale C J, Young T W.A simple methods for the isolation of purine nucleosides from wort and beer using column chromatography[J]. J Inst Brew,1988,94(1):33-37.
- [21] T.C.Somers,G.Ziemelis.Interpretation of ultraviolet absorption in wort and beer.The major role of nucleic acid derivatives [J]. J.Inst.Brew,1972,78(4):233-236.
- [16] DURAKOVI?, Sulejman RED?EPOVI?. Genetic Diversity of Indigenous Saccharomyces sensu stricto Yeasts Isolated from Southern Croatia[J]. Agriculturae Conspectus Scientificus, 2008, 73 (2): 89-94.
- [17] 白逢彦,贾建华.脉冲电泳核型分析在酿酒酵母菌分类学研究中的应用[J].微生物学报,2000,40:9-13.
- [18] 夏青,谢田,文红梅,刘永翔.8株国外引进的酿酒酵母菌的分类鉴定[J].贵州农业科学,2007,35(2):15-19.
- [19] F..DELLAGLIO,.G..ZAPPAROLI, P.MALACRINO, G. SUZZI, S. TORRIANI. Saccharomyces bayanus var. uvarum and Saccharomyces cerevisiae succession during spontaneous fermentations of Recioto and Amarone wines.
- [20] 徐艳文,杨莹,薛军侠,刘延琳.26S rDNA-RFLP分析在非酿酒酵母菌分类研究中的应用[J].微生物学杂志,2007,27(4):29-32.
- [21] 李金霞,刘光全,程池.酿酒酵母26S rDNA的D1/D2区域序列分析及其系统发育研究[J].酿酒,2007,(1):41-43.
- [22] Harry van Keulen, Donald GL, Kathleen EZ and Wes Gerlosky. Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2003, 83: 149-154.
- [23] A.A. Nisiotou and G.R. Gibson. Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5.8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41: 454-463.
- [24] Matthias Sipiczki. Candida zemplinina sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53: 2079-2083.
- [25] Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Gonzàlez, A., Mas, A., Guillelmo, J.M., Monitoring of Saccharomyces and Hanseniaspora populations during alcoholic fermentations by real-time quantitative PCR[J]. FEMS Yeast Research, 2007, 7(8): 1340-1349.

(上接第94页)