啤酒中游离酚酸的HPLC-ECD测定

曹 炜[1,2]，索志荣[2]，陈卫军[1]，宋纪蓉[1]，郑建斌[2]
(1.西北大学食品科学与工程系，陕西 西安 710069；
2.西北大学电分析科学研究所，陕西 西安 710069)

摘 要：本文采用高效液相色谱-电化学检测方法，测定了5种啤酒中的没食子酸、原儿茶酸、咖啡酸、丁香酸、p-香豆酸和阿魏酸等6种游离酚酸的含量。在色谱柱为Hypersil ODS柱(250mm×4.0mm,5.0μm)，流动相为甲醇-2%醋酸，梯度洗脱，流速为0.8ml/min，检测电压为700mV，柱温为30℃的条件下，啤酒中的6种酚酸可以得到很好的分离。该方法是一种快速简便、灵敏准确的分析方法，可以为啤酒的质量控制提供科学依据。
关键词： 啤酒；游离酚酸；液相色谱；电化学检测

Analysis on Six Free Phenolic Acids in Beer by HPLC with Electrochemical Detection

CAO Wei[1,2]，SUO Zhi-rong[2]，CHEN Wei-jun[1]，SONG Ji-rong[1]，ZHENG Jian-bin[2]
(1.Department of Food Science and Technology, Northwest University, Xi'an 710069, China；
2.Institute of Electroanalytical Chemistry, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract：In a previous study a HPLC-ECD method for determining simultaneously of six kinds of phenolic acids(protocatechuic acid, p-coumaric acid, syingic acid, gallic acid, caffeic acid and ferulic acid) in five different types of beer was established. Six kinds of phenolic acids were separated satisfactorily when RP-HPLC with Electrochemical Detection(HPLC-ECD) was used. The phenolic acids were analyzed on hypersil ODS column(250mm×4.0mm,5.0 μm) and a gradient elution program was performed with CH_3OH-2% HAc as a flow phase. The flow rate was 0.8ml/min. The detection was done at 700mV at column temperature 30℃. A rapid, sensitive and accurate method for the determination of six kinds of phenolic acids was founded. This study might provide a scientific basis for the quality control of beer.

Key words：beer；free phenolic acids；HPLC；electrochemical detection
中图分类号：O657.6 文献识别码：A 文章编号：1002-6630(2005)04-0212-03

啤酒是以麦芽为主要原料的酿制酒，具有营养丰富、酒度低的特点，是一种被世界公认的营养食品。近年来研究表明，适量饮用啤酒可以提高人血清的抗氧化能力[1]、降低小鼠血液的总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇和总甘油三酯[2]，因而啤酒的保健作用及其功能成分逐渐引起了人们的关注。已知啤酒中含有800多种化学成分，许多成分具有特定的生理活性，酚类化合物就是其中最重要的一类[3]。啤酒中酚酸化合物有游离型和结合型两种类型，其中游离型酚酸具有较高的生物活性。因此对啤酒种游离型酚酸的分析研究具有非常重要的意义。目前，啤酒中酚酸类化合物的分析方法主要有高效液相色谱法和毛细管电泳法[1,4]。但由于啤酒成分复杂，酚酸类化合物含量较低，采用紫外检测法灵敏度较低，因此通常在分析前要进行萃取、富集、衍生化等预处理，样品需要量大，步骤繁琐，耗时长，待测组分损失较为严重。电化学检测器由于具有选择性好、灵敏度高以及响应迅速等特点，在分析电活性物质时具有不可替代的优势。本文采用反相高效液相色谱电化学检测法，对5种不同种类的啤酒中的没食子酸、原儿茶酸、咖啡酸、丁香酸、p-香豆酸和阿魏酸等6种具有生物活性的酚酸类化合物进行了测定，为揭示啤酒的保健功能和质量控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

没食子酸、原儿茶酸、咖啡酸、丁香酸、p-香

收稿日期：2004-04-09
基金项目：陕西省博士后科研经费资助项目(BX03003)
作者简介：曹炜(1969-)，男，副教授，博士后，主要从事功能食品和食品工艺方向的研究。

豆酸和阿魏酸等标准品均为购自Sigma公司，甲醇为色谱纯，水为超纯水，冰醋酸为分析纯。

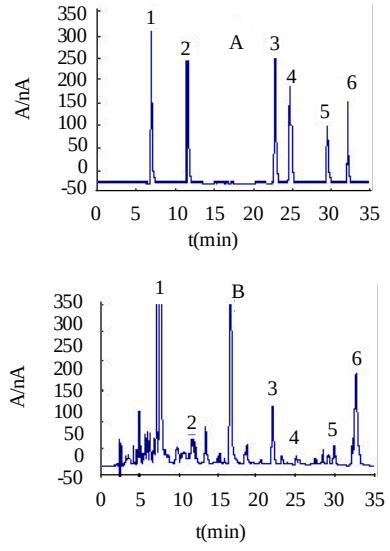
1.2 仪器 美国Aglient HP1100高效液相色谱，二极管阵列检测器，HP1049电化学检测器，Milli-QG超纯水制备仪(美国Millipore公司)，FD-1型真空冷冻干燥机(北京搏医康技术公司)。

1.3 啤酒样品及其处理

5个啤酒样品均为市售，品种有：青岛啤酒(青岛啤酒股份有限公司，生产日期：2003.12.18)；蓝带啤酒(广东蓝带集团股份有限公司，生产日期：2003.12.26)；金星啤酒(河南金星啤酒集团有限公司,生产日期：2003.11.24)；Heineken啤酒(喜力贸易(上海)有限公司，生产日期：2003.9.16)；燕京啤酒(北京燕京啤酒股份有限公司，生产日期：2003.10.20)。

所有的啤酒均进行超声波脱气，准确移取5ml啤酒置于圆底烧瓶中，-18℃冰箱中冷冻5h，然后进行真空冷冻干燥，干燥残余物用1ml超纯水溶解，0.45μm滤膜过滤，滤液用于色谱分析。

1.4 色谱条件 Hypersil ODS(250mm×4.0mm，5.0μm)色谱柱(德国)，流动相：甲醇-2%醋酸水溶液，梯度洗脱，时间程序：0min→30min→30.01min→36min→36.01min→40min，甲醇0%→35%→90%→90%→0%→0%，流速：0.8ml/min，二极管阵列检测波长：254、280、320 nm，电化学检测器：安培检测，电压700mv，柱温：30℃。色谱图见图1。



A标准品色谱图，B样品色谱图

A phenolic acids B sample

1没食子酸，2原儿茶酸，3咖啡酸，4丁香酸，5 p-香豆酸，6阿魏酸

图1 标准品和样品色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of beer phenolic acids

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

精密称取没食子酸、原儿茶酸、咖啡酸、丁香酸、p-香豆酸和阿魏酸对照品适量，分别配成甲醇溶液，在同一色谱条件下分别进样，确定标准物质的保留时间，然后各取一定体积配成不同浓度的混合标准溶液，分别取10μl进样，记录色谱图，以峰面积对进样量(ng)进行线性回归，各物质的保留时间、线性范围、回归方程和相关系数见表2。

表2 6种酚酸的色谱保留时间及线性关系考察结果

Table 2 Retention time and the regression equation of 6 phenolic acids in beer samples

酚酸种类	保留时间(min)	线性范围(μg/ml)	回归方程	相关系数
没食子酸	7.03	0.04～7.6	y = 82.029x - 53.178	0.9995
原儿茶酸	11.80	0.03～6.4	y = 84.909x + 14.326	0.9991
咖啡酸	23.22	0.03～12.4	y = 42.702x - 61.597	0.9991
丁香酸	25.08	0.05～8.4	y = 17.379x - 10.758	0.9994
p-香豆酸	29.97	0.02～9.5	y = 34.804x - 27.583	0.9998
阿魏酸	32.56	0.04～18.7	y = 102.364x - 12.451	0.9990

2.2 加样回收率实验

精确量取已测得含量的啤酒样品50ml(青岛啤酒)于100ml容量瓶中，分别准确加入一定量的酚酸类化合物对照品溶液，再用啤酒样定容到刻度，充分摇匀，然后平行测定3次，将测得的峰面积代入回归方程计算各类酚酸的含量，并计算出回收率，结果见表3。

表3 6种酚酸的加样回收率、重复性试验结果

Table 3 Recovery and reproducibility tests of 6 phenolic acids

酚酸种类	加入量(mg)	加样回收率(%)RSD	重复性试验RSD
没食子酸	0.08	97.26(0.21)	0.24
原儿茶酸	0.01	95.89(0.17)	0.18
咖啡酸	0.01	97.68(0.22)	0.19
丁香酸	0.02	97.25(0.35)	0.22
p-香豆酸	0.01	98.59(0.34)	0.25
阿魏酸	0.05	99.66(0.31)	0.31

2.3 重复性试验

精密吸取处理后青岛啤酒10μl，重复进样5次，进行测定，各类酚酸峰面积积分值的RSD见表3。

2.4 稳定性实验

对同一样品在8h之内每隔1h进行考察，结果各种酚酸的峰面积积分值的RSD均小于5%，因此稳定性良好。

2.5 样品的测定

按“1.3”项色谱条件，进各种啤酒样10μl进行检测，计算结果见表4。

3 讨 论

表4 啤酒中游离粉酸的含量(mg/L)
Table 4 Concentration of phenolic acids in beer samples

啤酒种类	青岛啤酒	燕京啤酒	蓝带啤酒	金星啤酒	Heineken啤酒
没食子酸	0.87 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.56 ± 0.06	0.63 ± 0.05
原儿茶酸	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
咖啡酸	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
丁香酸	0.14 ± 0.05	0.11 ± 0.02	-	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.03
p-香豆酸	0.04 ± 0.01	0.18 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.02
阿魏酸	0.64 ± 0.04	0.82 ± 0.06	0.69 ± 0.03	0.92 ± 0.08	0.98 ± 0.05

"-" 表示小于0.01mg/L, n=3。

酚酸是一类具有还原性质的化合物，其结构上存在-OH基团，因此能在安培检测器的工作电极上发生电极反应(氧化反应)，如果在参比电极和工作电极之间施加恒电位，测定通过工作电极的极限电流，可以获得特别低的检测限[5]。我们曾采用色谱电化学法直接测定了葡萄酒中的4种酚酸，得到了较好的分离效果，对于同一浓度的酚酸，电化学检测器的响应信号远大于紫外检测器，本文进一步对我国生产的啤酒中的游离酚酸进行了分析，结果见表4。从表4可知，5种啤酒中游离酚酸的含量差异较大，其中没食子酸、丁香酸和阿魏酸含量较高，每升啤酒中含量中含量大于1mg，原儿茶酸、咖啡酸和p-香豆酸含量较低，每升啤酒中含量低于0.1mg，该结果与M.Nardini等人测定的结果一致。啤酒中的很多酚酸以两种形式存在及结合型和游离型，本实验仅测定了其中的游离酚酸，以结合态存的酚酸在有待进一步研究。

为了得到较好的分离条件，本实验先后尝试了不同比例的甲醇-水-冰醋酸作为流动相的等度洗脱以及各种梯度洗脱、对色谱条件进行了优化，结果表明流动相甲醇-水-醋酸之比对峰形和保留时间有明显影响，经试验色谱条件为：流动相：甲醇-2%醋酸，梯度洗脱，其时间程序为0min→30min→30.01min→36min→36.01min→40min，甲醇0%→35%→90%→90%→0%→0%时，6种酚酸分离效果最好。为了保证方法的准确性，本实验做了回收实验、重复性实验和稳定型实验，均取得了理想的结果。

酚酸类化合物是啤酒的主要成分之一，以往的研究认为啤酒中的酚酸是影响啤酒风味、色泽、收敛性、胶体稳定性的主要因素[7]。随着对啤酒保健功能的深入研究，发现啤酒中的酚酸具有抗氧化作用，因此有必要重新评价啤酒中酚酸的价值，尤其是它的抗氧化作用，应该作为评价啤酒质量的一个重要指标。

参考文献：

[1] Andrea ghiselli, Fausta Natella, Alessia Guidi et al. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans[J]. J Nutr Biochem, 2000, 11:76-80.

[2] Shela Goristin, Abraham Casp, Elke Pawelzik et al. Proteins of beer affect lipid levels in rats[J]. Nutrition Research, 2001, 21:1159-1169.

[3] Sonia Cortacero-ramírez, Miguel Hurnáinz-Bermúdez de Castro, et al. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods[J]. Trends in Analytical Chemistry [J], 2003, 22: 7-15.

[4] Luigi Montanari, Giuseppe Perretti, Fausta Natella, et al. Organic and Phenolic Acids in Beer[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie, 1999, 32(8): 535-539.

[5] 张晓彤, 云自后. 液相色谱测定方法[M]. 北京：化学工业出版社, 2000. 147.

[6] M Nardini, A Ghiselli. Determination of free and bound phenolic acids in beer[J]. Food Chemistry, 2002, (84):137-142.

[7] 王德良, 陈雨亭, 李冬梅. 麦芽、酒花多酚对啤酒风味、非生物稳定性的影响[J]. 酿酒, 2003(2) : 46-55.

信 息

英培育出新型转基因金稻 维生素A含量提高20多倍

据英国《新科学家》杂志报道，位于英国剑桥的兴根塔育种公司的研究人员称，他们已经培育出了一种命名为“金稻-2”的新型转基因水稻，其原维生素A的含量比传统水稻提高了20多倍。原维生素A能在人体内转变成维生素A，对防止儿童夜盲症十分重要，目前，全世界每年约有50万儿童患夜盲症。

这一突破是在2000年培育出的“金稻-1”基础上获得的，研究小组受“人道培育水稻委员会”委托，研发这种新的水稻。他们将黄水仙基因转移到水稻中，获得了这一新品种。据兴根塔育种公司研究小组负责人迪拉克称：“我们发现，这种新型转基因水稻的原维生素A含量提高了20多倍，每克新水稻含有高达37mg的原维生素A。”据迪拉克估计，这种新水稻至少可提供儿童所需维生素A量的一半。而Freiburg大学管理“金稻计划”的麦尔则认为：“这种水稻可能含有医生所建议的足够量的维生素A。”