

荧光法测定啤酒中牛磺酸含量

刘 辉,徐应军,周瑞华,徐国卉

(华北煤炭医学院预防医学系营养与食品卫生教研室,河北 唐山 063000)

摘 要: 以啤酒为基质,牛磺酸为添加剂,采用强酸性阳离子交换柱分离出牛磺酸,与邻苯二甲醛(OPA)/2-巯基乙醇衍生化后进行荧光法测定。结果表明:相对标准偏差 $\leq 2.4\%$,回收率 $>95\%$,最小检出限为 $0.023\ \mu\text{g/mL}$;放置 6 个月的和现配的样品中牛磺酸含量差别无显著性($p>0.05$)。该方法快速、简便而且重现性好,可用于测定啤酒中添加的牛磺酸。

关键词: 牛磺酸; 啤酒; 荧光法; 测定

中图分类号:TS262.5;O657.31 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2005)05-0099-02

Determination of Taurine Content in Beer by Fluorophotometry

LIU Hui, XU Ying-jun, ZHOU Rui-hua and XU Guo-hui

(Preventive Medicine Department of North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Beer was used as ground substance and taurine was used as additive. Then strong acid cation exchange column was used to separate taurine, which then acted on OPA/2-mercaptoethanol for determination by fluorophotometry. The results were as follows: relative standard deviation $\leq 2.4\%$, recovery rate $>95\%$, the minimum detection limit as $0.023\ \mu\text{g/mL}$, and no significant difference in taurine content in currently blended samples and samples of 6-month placement ($p>0.05$). The method had the advantages of rapid and simple operation with good reproducibility and could be used in the determination of added taurine in beer. (Tran. by YUE Yang)

Key words: taurine; beer; fluorophotometry; determination

牛磺酸(taurine)是一种广泛存在于人和动物体内的含硫 β -氨基酸($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$),1827年首次从牛胆汁中分离得到而得名。牛磺酸作为人体的必需氨基酸有着广泛的生物学活性^[1],在很多领域都成为科研工作者争相研究的热点。目前,牛磺酸作为添加剂或强化剂被广泛地应用到食品行业^[2],牛磺酸加入到食品中的稳定性直接关系到食品的营养价值以及保健食品市场开发的可行性。

牛磺酸常用的定量测定方法有:酸碱滴定法、氨基酸自动分析法、薄层色谱法和高效液相色谱法^[3]等。本实验采用荧光法对啤酒中添加的牛磺酸的含量进行测定,结果表明,本法操作简便易行,结果可靠。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

荧光分光光度计(日本岛津 RF-5301PC);水浴锅;离心机;层吸管。

1.2 试剂

强酸性苯乙烯系阳离子树脂(723型-上海树脂厂有限公司);牛磺酸标准液(Sigma公司产品),配成浓度为 $0.100\ \text{mg/mL}$ 标准工作液;四硼酸钠(优级纯);甲醇(优级纯);邻苯二甲醛(OPA-北京奥德赛化学试剂公司);2-巯基乙醇(德国 Merck 试剂公司)。

1.3 衍生剂制备

称 20 mg 邻苯二甲醛放于棕色瓶中,用 2 mL 甲醇溶解,加入 $80\ \mu\text{L}$ 2-巯基乙醇和 18 mL 硼酸钠缓冲溶液,摇匀后放于冰箱中,临用时配制。

2 测定步骤

2.1 阳离子交换柱的制备

将树脂研磨后过 220 目筛,置于烧杯中蒸馏水反复冲洗,2 mol/L NaOH 碱液浸泡 24 h,用蒸馏水洗至中性,2 mol/L HCl 酸液浸泡 24 h,再用蒸馏水洗至中性,4℃保存备用。测定样品前,将树脂装入用玻璃棉塞住下口的层吸管中,填充高度为 4 cm,除去管中气泡后,再用玻璃棉塞住上口待用。

收稿日期:2004-10-18

作者简介:刘辉(1974-),男,讲师,硕士,主要从事营养保健品的研发。

2.2 样品前处理及过柱

首先将待测样品置于温水浴中搅拌除去 CO₂, 然后用高速离心机 4000 r/min ,离心 10 min ,取离心上清液倒入离子交换柱 ,弃去最初的过柱液 ,然后用三角烧瓶收集过柱液体待测。

2.3 衍生化反应

取 2 mL 缓冲溶液于 25 mL 比色管中 ,加入 1 mL 空白啤酒 ,然后分别加入各浓度样品 (按浓度从低到高依次为 120 μL ,60 μL ,30 μL ,15 μL ,7.5 μL) ,最后加入 33 μL 临时配制好的衍生剂 ,用双蒸水定容 ,震荡混匀 ,待反应 15 min 后即可测定。

2.4 样品测定

在波长 λ_{ex}/λ_{em}=365/450 nm 处测定荧光强度 F ,同时测定试剂空白的 F 值 ,计算 ΔF (ΔF=F 溶液-F 空白) ,将 F 值代入回归方程求得样品中牛磺酸的含量。

2.5 统计分析

将数据用 Excel 建库 ,样品中牛磺酸含量的比较采用 SAS6.12 统计软件进行方差分析 q 检验。

3 实验结果

3.1 激发光谱和发射光谱的选择

在 2-巯基乙醇的作用下 ,牛磺酸与邻苯二甲醛缩合产生了蓝色荧光。结果发现在 λ_{ex}/λ_{em}=365/450 nm 处 (狭缝=3.0 nm)试剂空白的荧光强度最弱 ,所以测定牛磺酸时选用波长 365/450 nm 的参数。

3.2 酸度和衍生化时间的选择

分别配制 pH 1~13 一系列不同 pH 值的缓冲溶液 (pH1~5 的乙酸-盐酸 pH6~8 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH8~11 ,用氢氧化钠调节 0.05 mol/L 四硼酸钠 ;pH12~13 氢氧化钠溶液) ,取该缓冲溶液 2 mL 于 25 mL 比色管中 ,再加 1mL 啤酒空白 ,各加入牛磺酸标准溶液 1 mL ,用双蒸水稀释到 25 mL ,在 λ_{ex}/λ_{em}=365/450 nm 处测得不同 pH 值下的荧光强度 ,结果发现荧光强度在 pH9.6~11 范围内 ,荧光强度 F 值最大 ,而且稳定 ,没有变化 ,所以选择 pH 9.6 作为测定条件。

同时 ,在试验条件下发现 ,随着反应时间延长荧光

表 1 不同浓度牛磺酸溶液的相对标准偏差 (RSD)

牛磺酸溶液 (μg/mL)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm s$	RSD
0.4	0.407	0.398	0.398	0.389	0.379	0.413	0.397±0.009	2.40
2.4	2.391	2.409	2.372	2.409	2.382	2.391	2.392±0.015	0.61
4.0	3.996	3.959	3.996	3.960	3.977	3.977	3.978±0.016	0.41

表 2 不同加标样品中牛磺酸的回收率

牛磺酸溶液 (μg/mL)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm s$
0.4	95.45	98.00	101.85	95.12	99.10	96.40	97.65±2.56
2.4	101.93	95.82	99.35	98.32	97.60	102.35	99.23±2.54
4.0	96.95	95.63	99.31	97.93	96.10	95.70	96.60±1.41

强度逐渐升高 ,大约 15 min 以后 ,荧光强度开始下降 ,说明衍生时间选择在 14~15 min ,能减小由于反应时间不同造成的误差。本实验选择反应时间统一为 15 min。

3.3 线性范围和检出限

分别移取 0.100 mg/mL 的牛磺酸标准溶液 0.0 ,0.2 mL ,... 2.0 mL 于 25 mL 比色管中 ,按选定的试验条件 ,与测定样品同样的方法进行测定。经线性回归后 ,得直线方程 F=54.107C (μg/mL)+7.667 ,牛磺酸浓度在 0.02~4.8 μg/mL 范围内标准曲线线性很好 ,相关系数 r 达到 0.9992 ,检出限为 0.023 μg/mL。

3.4 精密度

取 0.10 mg/mL 的牛磺酸标准溶液配制成 3 个浓度的溶液 (0.4 μg/mL ,2.4 μg/mL ,4.0 μg/mL) ,每种做 6 个平行试验 ,求得每种样品中牛磺酸的平均含量、标准偏差和相对标准偏差 (RSD) ,结果每种浓度的牛磺酸溶液的 RSD 均小于 5 % ,达到了微量样品仪器分析的精密度的要求 (见表 1)。

3.5 回收率

仍取上述 3 种浓度的牛磺酸溶液 ,每种做 6 个平行加标试验 ,计算每种样品的平均回收率。结果表明 ,每种样品的平均回收率均优于 95 % ,见表 2。

3.6 3 种不同样品中牛磺酸的含量比较 (表 3)

表 3 不同啤酒样品中牛磺酸含量的比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$) (g/L)

样品	现配	常温光照保存	4℃冰箱保存
0.5	0.498±0.014 ^a	0.497±0.012 ^a	0.497±0.004 ^a
1.0	0.991±0.012 ^a	0.994±0.012 ^a	0.989±0.015 ^a
2.0	1.987±0.023 ^a	1.982±0.023 ^a	1.967±0.023 ^a
4.0	3.995±0.024 ^a	3.975±0.028 ^a	3.944±0.047 ^a
8.0	7.953±0.047 ^a	7.940±0.036 ^a	7.939±0.071 ^a

注：表中同一纵栏内上标字母相同者表示组间差异无显著性 (p>0.05)。

从表 3 可见 ,无论是 4℃冰箱保存还是常温光照保存的啤酒样品 ,与现配的啤酒相比 ,牛磺酸含量的差别无显著性 (p>0.05)。

4 讨论

由于牛磺酸本身无紫外吸收和荧光发射的特性 ,须经衍生后方可产生 ,从而进行含量测定^[4]。在衍生化反应前 ,如何将啤酒中添加的牛磺酸同其他氨基酸有效地分离出来 ,排除其他氨基酸对实验结果的干扰 ,是本实验质量控制的关键。

氨基酸在 pH=2.2 环境下带正电荷 ,而强酸性阳离子交换树脂具有负离子的特性。氨基酸结构不同 ,所带电荷数目不同 ,与树脂的亲合力也不同。不同性质的氨基酸与强酸性树脂的亲合力依次为 :碱性氨基酸>中性氨基酸>酸

(下转第 103 页)

和酮类等,结果见表 1。

从表 1 中可以看出,2003 年杨凌产区梅尔诺红葡萄酒香气成分含量在前两位的是苯乙醇和 1-戊醇,分别占总面积的 42.28%和 35.2%,其次为丁二酸二乙酯、5-乙基二氢化-2 (3H)-呋喃酮、1H-吡啶-3-乙醇、N-苯基-2-萘胺、4-羟基-苯乙醇、3-甲硫基丙醇、对-羟基肉桂酸乙酯等。但相对含量较低的一些化合物在梅尔诺葡萄酒总体香气构成中也有不可忽视的作用,如辛酸乙酯具有令人愉快的花果香气;呋喃甲醛则具有谷物香气;正己醇具有水果香及芳香等^[6-17]。由于它们的嗅觉阈值一般都较低,因而其香气值(浓度/阈值)很高,加之香味独特,极可能构成该年份梅尔诺干红葡萄酒特征香气组分。然而,特征香气组分的鉴定必须有人体嗅觉感官分析的参与才能够完成。

参考文献:

- [1] 李华.葡萄酒品尝学[M].北京:中国青年出版社,1992.29-56.
- [2] 李记明,宋长冰,贺普超.葡萄与葡萄酒芳香物质研究进展[J].西北农业大学学报,1998,(5):105-108.
- [3] Juan C. Mauricio, Juan Moreno, Luis Zea, and Manuel Medina. The Effects of Grape Must Fermentation Conditions on Volatile Alcohols and Esters Formed by *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. J. Sci. Food Agric, 1997, (75):155-160.
- [4] Andrea Antonelli, Lorena Castellari, Carlo Zambone, and Alberta Carnacini. Yeast Influence on Volatile Composition of Wines [J]. J. Agric. Food Chem, 1999, (47):1139-1144.
- [5] 饭野修一,渡边正平,黄平译.葡萄酒中的高级醇苦味[J].酿酒科技,1995,69(3):55-57.

(上接第 100 页)

性氨基酸 ($-\text{OH}$)- $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ - $-\text{COOH}$ - $-\text{SO}_3\text{H}$)。牛磺酸是磺化氨基酸 (NH_2 - CH_2 - CH_2 - SO_3H),含有磺酸根 ($-\text{SO}_3\text{H}$),与树脂结合最不紧密,当经过交换柱的时候首先被洗脱下来^[5]。对于树脂的目数选择上,由于目数小的树脂颗粒较大,可以吸附牛磺酸的表面积也小,相对来说样品过柱时流速较快,可能导致样品中其他的氨基酸与树脂结合不牢而导致测定值偏高^[6],因此我们选择了回收率比较好的 220 目树脂。本方法相对标准偏差 $\leq 2.4\%$,回收率 $> 95\%$,最小检出限为 $0.023 \mu\text{g/mL}$ 。结果表明,该方法快速、简便而且重现性好,可用于啤酒中添加的牛磺酸测定。

国外曾有报道,维生素配方中的牛磺酸经 100°C 加热 88 h 或高强度的紫外灯照射 7 h 等环境下都不降解。国内张平伟^[7]也曾经报道过,牛磺酸在雪碧汽水和奶粉基质中,在 4 个月的时间也不会降解,而且不受温度、光线的影响,本次实验 3 种不同样品含量的测定结果表明,在 6 个月内(一般啤酒的保质期限),牛磺酸在啤酒基质中不受温度、光线等物理条件以及啤酒基质中所含

- [6] 丁正国.葡萄酒中的酯类成分生成的因素[J].食品工业,1996,(3):39-40.
- [7] Hector Escalona, Lorraine Birkmyre, John R. Piggott and Alistair Paterson. Relationship between Sensory Perception, Volatile and Phenolic Components in Commercial Spanish Red Wine from Different Region [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2001, 107(3): 157-166.
- [8] Falque E, Fernandez E, Dubourdieu D. Volatile Components of Loureira, Dona Branca, and Treixadura Wines [J]. Agric. Food Chem., 2002, 50(10):2891-2899.
- [9] 邹建凯.气相色谱/质谱研究中国红葡萄酒香气成分[J].分析化学,2001,10(2):492-493.
- [10] 沈尧坤,冯谦.果酒中芳香成分的分析[J].食品与发酵工业,1990,(4):35-42.
- [11] 王立.色谱分析样品处理[M].北京:化学工业出版社,2001.12-21.
- [12] Susan E. Ebeler. Analytical Chemistry:Unlocking the Secrets of Wine Flavor [J]. Food Review International, 2001, 17(1):45-64.
- [13] 李华.葡萄与葡萄酒研究进展[M].西安:陕西人民出版社,2002.97-99.
- [14] 丛浦珠.质谱学在天然有机化学中的应用[M].北京:科学出版社,1987.595-650.
- [15] 汪正范,杨树民,吴侔天,岳卫华.色谱联用技术[M].北京:化学工业出版社,2001.63-120.
- [16] 刘树文.合成香料技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,2000.68-91.
- [17] 文瑞明.香料香精手册[M].长沙:湖南科学技术出版社,2000.369-371.

其他成分^[8]的化学影响,从而保证了牛磺酸作为一种营养添加剂应用到保健啤酒产业当中的可行性。

参考文献:

- [1] Flint AC, Liu X, Kriegstein AR. Nonsynaptic Glycine Receptor Activation during early Neocortical Development[J]. Neuron, 1998, (20):43-53.
- [2] 凌关庭.营养强化剂及其进展(二)[J].粮食与油脂,2000,(2):39-45.
- [3] 郑纲,林少彬.高效液相色谱法测定食品中的牛磺酸[J].卫生研究,1998,(27):266-268.
- [4] 李云兰,丁红,刘玉明,等.柱前衍生化 HPLC 法测定牛磺酸软胶囊中牛磺酸的含量[J].中医药,2001,(23):871-873.
- [5] 陈玉珍,章广远,龚代来,等.食品中牛磺酸测定方法的研究[J].营养学报,1994,(16):406-411.
- [6] 李秀花,邱服斌,肖荣,等.紫外分光光度法测定动物脑组织中牛磺酸含量[J].山西医药杂志,2001,(30):209-210.
- [7] 张平伟,杨祖英.食品中牛磺酸的稳定性研究[J].中国食品卫生杂志,1998,(10):14-15.
- [8] 包启安.啤酒的功能性[J].酿酒科技,2002,(6):29-31.