

# 利用电子自旋共振技术评估啤酒的抗氧化剂

田玉红 杨朝霞 王书谦

(青岛啤酒股份有限公司研发中心, 山东 青岛 266061)

**摘要:** 利用电子自旋共振技术评估抗氧化剂异 Vc 钠、焦亚硫酸钠和还原酚对啤酒中自由基的影响。还原酚和异 Vc 钠虽能在短期内能有效抑制自由基的产生,但不利于啤酒的长期保质。焦亚硫酸钠的添加对自由基的产生起单向抑制作用,且添加量与 Lag Time 有较好的线性相关。在对市售商品啤酒进行测定时,啤酒中所含的二氧化硫对啤酒的 Lag Time 值和新鲜度均有正向作用。

**关键词:** 啤酒; 电子自旋共振; 自由基; 抗氧化剂; 新鲜度

**中图分类号:** TS262.5; TS261.4; TS261.7; TN **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2010)04-0079-04

## Evaluation of Beer Antioxidants by Electron Spin Resonance

TIAN Yu-hong, YANG Zhao-xia and WANG Shu-qian

(Technical Center of Tsingtao Brewery Co. Ltd., Qingdao, Shandong 266061, China)

**Abstract:** The effects of antioxidants including sodium iso-Vc, sodium metabisulfite and polyphenol on free radicals in beer were evaluated by electron spin resonance. Polyphenol and sodium iso-Vc could effectively inhibit the production of free radicals in the short term but were harmful for long-term quality assurance of beer. Sodium metabisulfite had one-way inhibitory effects on free radicals and its addition level had a good linear correlation with lag time. Commercial beer was measured and the sulfur dioxide in beer had a positive role both in the lag time value and in freshness.

**Key words:** beer; electron spin resonance; free radicals; antioxidant; freshness

啤酒的风味稳定性是啤酒品质的关键指标,也是各大啤酒公司的核心竞争力。新鲜啤酒中含有内源性抗氧化物质,如二氧化硫、抗氧化的酚类化合物(类黄酮,花色素,黄烷醇)、类黑素、Vc、谷胱甘肽等<sup>[1-3]</sup>,而同时啤酒中的重金属离子,如铁、铜等在贮存期间起到促氧化的作用<sup>[4]</sup>。抗氧化和促氧化的双重作用决定了啤酒的风味稳定时间。通过外添加抗氧化剂,可以保持啤酒的风味稳定性,延长其货架保质期。目前,常用的抗氧化剂有亚硫酸钠、焦亚硫酸钠、抗坏血酸盐(Vc 钠)、异 Vc 钠等<sup>[5]</sup>。对此类抗氧化剂的作用一般通过品评来评估,具有一定的局限性。

随着核磁共振、电子自旋共振等现代分析技术的广泛应用,人们对啤酒老化机理有了越来越深入的认识,开始从自由基、美拉德反应等不同角度研究成品啤酒的老化<sup>[6-11]</sup>。啤酒氧化反应的实质是自由基反应,啤酒中的自由基反应涉及的网状反应结构涵盖了大部分老化反应。电子自旋共振(ESR, Electron Spin Resonance)是建立在自由基捕捉技术基础上的自由基检测技术,当啤酒中的抗氧化物质被消耗后,自由基开始被捕获并被 ESR 检测到。自由基从少量被检测到转变成大量产生的拐点对应的时间就是 Lag Time,其值表达了啤酒的内源抗氧化活

力 EAP (Endogenous Anti-Oxidative Potential)<sup>[12-13]</sup>。

本文利用电子自旋共振技术初步研究了没食子酸、儿茶素、阿魏酸、表儿茶素、咖啡酸、异 Vc 钠、焦亚硫酸钠对啤酒中自由基的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料和试剂

啤酒,市售商品啤酒。没食子酸、儿茶素、阿魏酸、表儿茶素、咖啡酸、N-叔丁基苯硝酮(PBN)均购自 Sigma-Fluka 公司。异 Vc 钠、焦亚硫酸钠等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.2 仪器和设备

纯水仪, Milli-Q Plus; 涡旋混匀器, IKA MS 3basic; ESR 电子自旋共振仪, Bruker, Bruker ELBA for e-scan; 气相色谱仪, PE Clarus AutoSystem XL, Turbomatrix 40 headspace 进样器, FPD 检测器检测, Agilent DB-5 毛细管色谱柱。

#### 1.3 测定方法

##### 1.3.1 Lag Time 值的测定

①配置 1 mol/L PBN-乙醇溶液:称取 0.443 g PBN 于称量纸上,转移至仪器用棕色样品瓶中,加入 2.5 mL

收稿日期:2010-01-14

作者简介:田玉红(1980-),女,工程师,硕士,啤酒研发。

无水乙醇,涡旋混匀器加速溶解,配制成 1 mol/L PBN-乙醇溶液。此溶液现用现配,每个样品需 0.5 mL,根据样品数量决定配制量。

②啤酒经离心除气,5500 r/min,5 min。取 9.5 mL 除气啤酒于棕色样品瓶中,加入 0.5 mL 1mol/L PBN 乙醇溶液,涡旋混匀器加速混匀。

③用 Bruker ELBA for e-scan 设置检测顺序和调用方法,进行检测。ESR 条件:机械浴温度:60 °C;中心磁场:3465 G;扫描宽度:20 G;微波功率:4.33 MW;放大倍数:2.51×10<sup>2</sup>;调制频率:86 kHz;调制幅度:2.0 G;采集次数:4 times;数据处理方式:S 拟合。

### 1.3.2 游离二氧化硫的测定

①取 25 mL 浓磷酸(85%)于 100 mL 容量瓶内,加水定容,降至室温后待用。

②在 GC 顶空瓶中加入 5 mL 排气后的样品,加入配制好的稀磷酸 5 mL,密封。

③GC 条件:调节顶空进样器的载气压力为 30 psi,进样时间为 0.15 min。进样口温度 150 °C,载气 25 psi,检测器温度为 250 °C,空气流量为 105 mL/min,氢气为 90 mL/min,通过标准曲线定量。

### 1.3.3 总二氧化硫的测定

①汞稳定液的制备:称取氯化汞 27.2 g 和氯化钡 11.7 g,用水溶解,并稀释至 1 L。

②吸取汞稳定液 2 mL 和 0.05 mol/L 硫酸溶液 5 mL 于 100 mL 容量瓶中,准确量取冷的、未除气的待测啤酒样品 10 mL 于容量瓶中,轻轻摇动混合,加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 15 mL,混匀,静置 15 s。再加 0.05 mol/L 硫酸溶液 10 mL,用水定容至刻度,充分混匀,配成悬浊液。

③在 GC 顶空瓶中加入 5 mL 悬浊液样品,加入配制好的稀磷酸 5 mL,密封。

③GC 条件同 1.3.2。

## 2 结果与讨论

### 2.1 还原酚对 Lag Time 的影响

评价啤酒的总抗氧化力,可利用抗氧化物质对自由基的清除率来表征<sup>[14-15]</sup>。DPPH 清除率法是目前常用的方法。在前期的实验中,利用光度法测定了啤酒中没食子酸、表儿茶素、原儿茶素、香草酸、丁香酸、阿魏酸、儿茶素、咖啡酸、香豆酸等还原酚对 DPPH 自由基的清除率。结果表明,没食子酸、儿茶素、阿魏酸、表儿茶素、咖啡酸对 DPPH 的清除率较高,分列前 5 位。本文考察了该 5 种还原酚对 Lag Time 的影响,根据其在啤酒中的含量范围,确定了添加梯度,结果见表 1。利用 ESR 测得相应的 Lag Time 值,具体数据见表 2。

实验结果表明,儿茶素对啤酒的 Lag Time 有单向的正面作用,而没食子酸、阿魏酸、表儿茶素和咖啡酸对 Lag Time 的影响存在反复,结果见图 1。与此同时,添加

表 1 各还原酚的添加量 (mg/L)

项目	添加梯度			
	1#	2#	3#	4#
没食子酸	0	2	4	6
儿茶素	0	1	2	3
阿魏酸	0	0.5	1	1.5
表儿茶素	0	1	2	3
咖啡酸	0	0.1	0.2	0.3

表 2 各样品测得的 Lag Time 值

添加梯度	没食子酸	儿茶素	阿魏酸	表儿茶素	咖啡酸
1#	104	104	104	104	104
2#	99	110	115	113	110
3#	105	113	105	121	106
4#	112	114	118	114	107

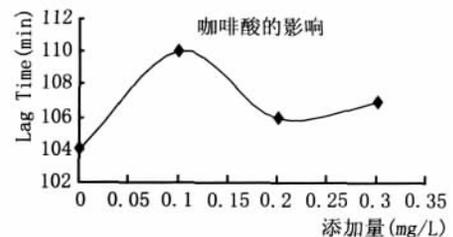
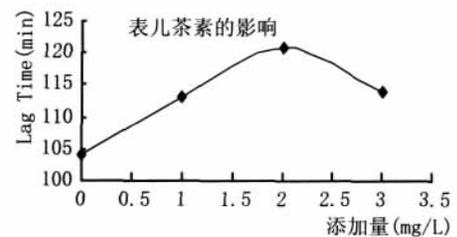
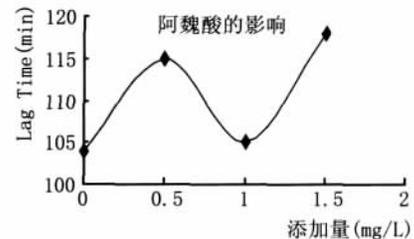
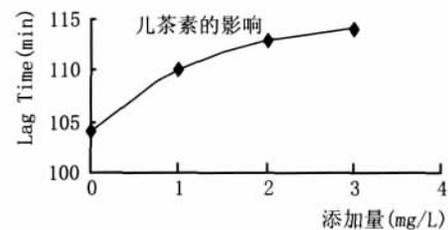
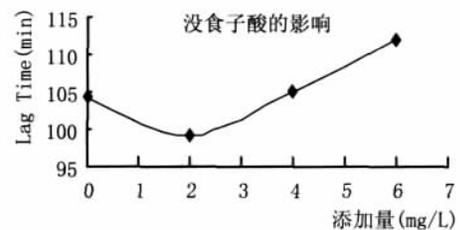


图 1 各酚对 Lag Time 的影响

的还原酚中除儿茶素外,其他单酚均随着时间的进行促进啤酒中自由基的产生,结果见图2。

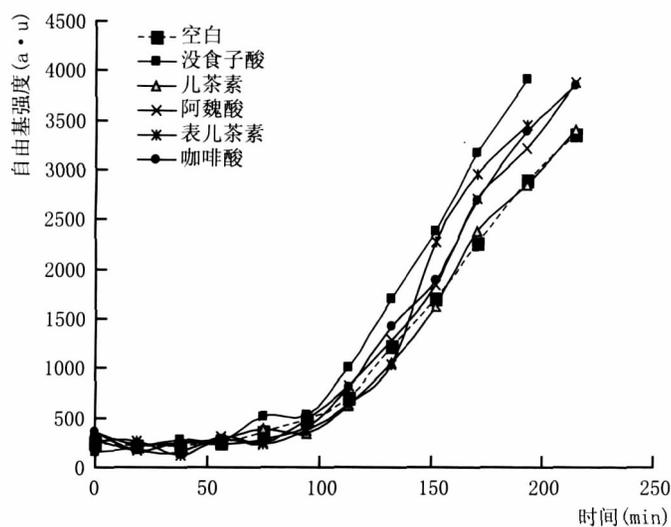


图2 添加还原酚自由基的生成趋势

## 2.2 异Vc钠对Lag Time的影响

异Vc钠通常用作啤酒中的抗氧化剂,以提高啤酒的风味稳定性,延长保质期。参考工厂常用的异Vc钠添加量,设计异Vc钠的添加梯度为:0、20 mg/L、40 mg/L,对应的ESR实验结果见表3。

表3 添加异Vc钠测得Lag Time值

异Vc添加量(mg/L)	1#样品	2#样品
0	99.6	70.1
20	110	70.1
40	133.3	90.1

实验中发现,异Vc钠的添加在初期确实延缓了自由基的产生,使得Lag Time得以延长,起到了抗氧化的作用,但随着时间的进行,在Lag Time之后,自由基迅速增长,异Vc钠表现出促氧化的性质。这种抗氧化和促氧化的双重作用,Griffin认为,是因为异Vc钠经氧化后生成了脱氢异Vc钠,而这种物质是一种强氧化剂,将促进自由基的产生<sup>[6]</sup>。图3、图4为添加10 mg/L和40 mg/L异Vc钠后啤酒中自由基的生成趋势变化。

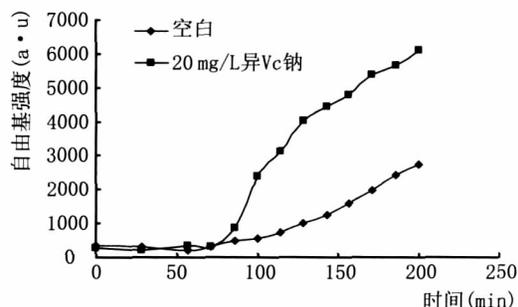


图3 添加20 mg/L异Vc钠

## 2.3 焦亚硫酸钠对Lag Time的影响

选择常用的抗氧化剂焦亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ),考察此

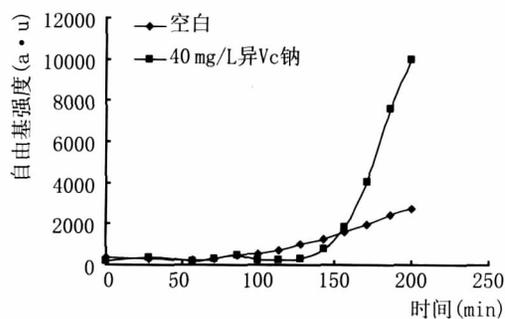


图4 添加40 mg/L异Vc钠

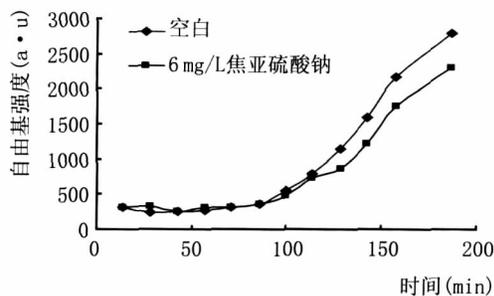


图5 添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 后自由基的产生趋势

表4 添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 测得Lag Time值

焦亚硫酸钠添加量(mg/L)	1#样品	2#样品
0	99.6	70.1
3	104.8	78.7
6	106.8	84.1
9	111.2	102.7

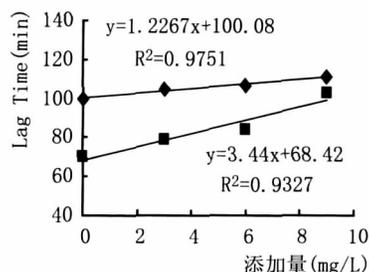


图6 添加焦亚硫酸钠对Lag Time值的影响

类物质对啤酒的Lag Time的影响。焦亚硫酸钠的添加量分别为:0、3 mg/L、6 mg/L、9 mg/L,选用了两种商业啤酒进行比对实验。实验结果显示,添加焦亚硫酸钠有效抑制了啤酒中自由基的生成,生成趋势见图5,对应的ESR实验数据见表4。

从表4结果可以看出,添加焦亚硫酸钠对啤酒的Lag Time的延长起到了单向促进作用,且添加量与Lag Time有较好的线性相关,1#和2#样品的线性相关系数分别达到0.97和0.93,结果见图6。

## 2.4 啤酒中的二氧化硫含量与Lag Time、新鲜度的相关性分析

在焦亚硫酸钠的添加实验中发现,其添加量与Lag Time存在较高的正相关性,因此本实验亦考察了啤酒自身所含有的二氧化硫与Lag Time的关系。取市售商品啤酒,分别测定其游离二氧化硫含量、总二氧化硫含量以及

相应的 Lag Time 值,同时组织品评人员进行新鲜度品评。品评小组由 6 个以上的专业评委组成,实行 10 分制打分法,分值越高,新鲜度越高。测定结果与新鲜度得分见表 5,将所得数据进行相关分析,结果见表 6。

表 5 新鲜度品评得分及各指标值

样品列表	新鲜度得分	lag time (min)	游离 SO <sub>2</sub> (mg/L)	总 SO <sub>2</sub> (mg/L)
1#	6.8	137.6	3.93	6.81
2#	6.4	130.9	1.98	5.62
3#	6.4	100	0.36	1.81
4#	6.2	97.2	1.38	4.36
5#	6	98.1	0.03	0.25
6#	6	132.7	1.17	2.23
7#	6	88.5	0.06	0.3
8#	5.8	92.8	0.75	3.11
9#	4	71.3	0.78	2.91
10#	5.4	106.8	0.1	0.42
11#	5	99.7	0.25	1.86

表 6 各指标相关性分析

项目	新鲜度得分	lag time (min)	游离 SO <sub>2</sub> (mg/L)	总 SO <sub>2</sub> (mg/L)
新鲜度得分	1			
lag time (min)	0.670526976	1		
游离 SO <sub>2</sub> (mg/L)	0.477296809	0.675533736	1	
总 SO <sub>2</sub> (mg/L)	0.363939559	0.522379176	0.922301633	1

表 5、表 6 表明, Lag Time 值与新鲜度得分的相关系数高达 0.67, 而啤酒中游离二氧化硫和总二氧化硫含量均与啤酒的 Lag Time 值有较好的正相关性, 相关系数分别达到 0.68 和 0.52。

### 2.5 添加焦亚硫酸钠对啤酒贮存的影响

取市售商品啤酒, 添加焦亚硫酸钠作为抗氧化剂, 并在常温下贮存。测定新鲜酒样和贮存 2 周、4 周、2 个月时的啤酒的 Lag Time 值, 同时组织品评人员进行新鲜度品评, 品评要求同 2.4。测定结果和品评结果见表 7。表 7 数据显示, 添加焦亚硫酸钠在 2 个月内有效保持了啤酒的风味稳定性。

表 7 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的添加、贮存结果

样品品种	时间	新鲜度得分	lag time
加焦亚硫酸钠	新鲜	5.6	153
	2 周	5	125
	4 周	4.4	122
	2 月	5	132
未加焦亚硫酸钠	新鲜	4.8	84
	2 周	3.5	96
	4 周	2	80
	2 月	1.5	72

## 3 结论

异 Vc 钠作为最常用的抗氧化剂, 被广泛地应用于

食品行业, 但其在啤酒中的长期效应需要进一步的验证。本实验表明, 从自由基反应的角度考察啤酒的风味稳定性, 常用的外加抗氧化剂, 例如异 Vc 钠、没食子酸、表儿茶素等还原酚虽然能在短期内有效抑制自由基的产生, 但从长期效应来看, 外添加剂反而促进了自由基的生成, 从而不利于啤酒的长期保质。

添加焦亚硫酸钠对啤酒中自由基的产生起单向抑制作用, 且添加量与 Lag Time 有较好的线性相关。在对市售商品啤酒进行测定时, 啤酒中所含有的游离二氧化硫和总二氧化硫均对啤酒的 Lag Time 值和新鲜度有正向作用。在添加焦亚硫酸钠的贮存实验中, 结合 Lag Time 值的测定和品评结果, 添加焦亚硫酸钠有效保持了啤酒的风味稳定性。

### 参考文献:

- [1] LAURENCE G, PHILIPPE P, AURORE T, et al. Assessment of added glutathione in yeast propagations, wort fermentation, and beer storage[J]. J. Am. Soc. Brew. Chem. 2004, 62(3): 97-102.
- [2] 王德良, 张五九, 赵涤飞. 二氧化硫与啤酒抗氧化性[J]. 酿酒, 2003, 30(1): 31-34.
- [3] JENEY E, FODOR P. Examination of the effect of vitamin E and C addition on the beer's ESR lag time parameter[J]. J. Inst. Brew. 2007, 113(1): 28-33.
- [4] ZUFALL C, TRRELL T. The influence of heavy metal ions on beer flavor stability[J]. J. Inst. Brew. 2008, 114(2): 134-142.
- [5] JENEY E, FODOR P. Analytical properties of vitamin enriched beer[J]. MBAA, 2007, 44(3): 179-182.
- [6] UCHIDA M, ONO M. Improvement for oxidative flavor stability of beer-role of OH-radical in beer oxidation[J]. J. Am. Soc. Brew. Chem. 1996, 54(4): 198-204.
- [7] 严敏, 李琦, 顾国贤. 啤酒中自由基的 ESR 研究[J]. 中国酿造, 2006, 155(2): 24-26.
- [8] 李琦, 严敏, 董建军, 等. 利用电子自旋共振 (ESR) 技术研究啤酒原辅料自由基及其对麦汁自由基的影响[J]. 分析实验室, 2007, 25(5): 84-88.
- [9] 严敏, 李琦, 董建军, 等. 利用电子自旋共振 (ESR) 研究啤酒酿造过程中的自由基[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 64-66.
- [10] FRANZ O, BACK W. Stability index-A new approach to measure the flavor stability of beer[J]. MBAA TQ, 2003, 40(1): 20-24.
- [11] Tue V, MOGENS L, ANDERSEN. Effects of maillard and caramelization products on oxidative reactions in lager beer [J]. J. Am. Soc. Brew. Chem. 2007, 65(1): 15-20.
- [12] MOGENS L, ANDERSEN, OUTTRUP H, et al. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping[J]. J. Agric. Food Chem., 2000, 48: 3106-3111.
- [13] ROBERT T, SAMP E, PATINO H, et al. Electron paramagnetic resonance (EPR) profiling for potential flavor stability improvements in beer[J]. MBAA, 2001, (4): 247-250.
- [14] 严敏, 李琦, 顾国贤. 利用 DPPH 自由基清除率评价啤酒内源性抗氧化能力 [J]. 食品工业科技, 2005, 26(8): 82-83.