

麦芽和啤酒中的 N-亚硝基化合物

李 梅,武千钧,陈华磊

(青岛啤酒股份有限公司科研开发中心,山东 青岛 266061)

摘 要: N-亚硝基化合物属强致癌物质,有挥发性 N-亚硝基二甲胺(NDMA)和非挥发性 N-亚硝基化合物(ATNC)两种。啤酒中的 NDMA 主要来源于麦芽,在制麦工艺过程中形成;ATNC 主要由微生物的硝酸还原反应产生。啤酒中的 N-亚硝基化合物的分析检测方法有热能分析法、气相色谱法和 HPLC 法。(孙悟)

关键词: 麦芽;啤酒;N-亚硝基化合物

中图分类号:TS262.5;TS261.4 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2005)09-0055-04

N-nitroso Compounds in Malt and Beer

LI Mei, WU Qian-jun and CHEN Hua-lei

(R&D Center of Tsingtao Brewery Co. Ltd., Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract: N-nitroso compounds including volatile N-Nitrosodimethylamine(NDMA) and non-volatile apparent total N-nitroso compounds(ATNC) showed genotoxic effects in animal model systems. NDMA in beer mainly came from malt and formed in malt preparation and ATNC was produced through reducing reaction of nitric acid. The measurement methods of N-nitroso compounds in beer mainly covered heat energy analyzer method, gas chromatography and HPLC method. (Tran. by YUE Yang)

Key words: malt;beer;N-nitroso compounds

N-亚硝基化合物属强致癌物质。根据亚硝基化合物的物理性质,分为挥发性和不挥发性两种,其中 N-亚硝基二甲胺(N-Nitrosodimethylamine, NDMA)是最具毒性的挥发性 N-亚硝基化合物。1965 年, Magee 等最先报道了 NDMA 的致癌活性。由于其对健康的严重威胁,很多国家都有 NDMA 限量规定。美国 FDA 法规限量:麦芽<10 μg/kg,啤酒<5.0 μg/kg;我国国标 2758-81 规定限量:啤酒<3 μg/L。

1978 年 7 月,德国的一个癌症研究小组^[1]首次分析出啤酒中含有 ppb 级的 NDMA。当时,据此推测德国人从食物中摄入的 NDMA,啤酒占 64%,远远高于肉制品等,该结果引起酿造界的极大关注,加快了英、美、德进行 NDMA 成因的研究,结论是啤酒中的 NDMA 来源于麦芽。当时主要采用烟道火直接烘干麦芽,由于大麦中的胺类的亚硝化反应而形成。据此制麦业开始对明火烘干麦芽工艺进行改造,1979 年以来啤酒中的 NDMA 得到控制,并逐渐下降,到 1989 年,欧美 97%的麦芽样品中 NDMA 含量小于 0.6 μg/L。现在 BRU(英国国际酿造

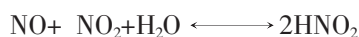
研究所)认为欧洲啤酒的 NDMA 一般都小于检出限量^[2](1 μg/L)。

非挥发性的亚硝胺由于分析困难等原因,对其成因尚未完全了解,一般认为,微生物的硝酸还原反应是形成 ATNC 的首要原因。测定时定义为外观的总 N-亚硝基化合物(apparent total N-nitroso compounds,ATNC)。欧盟规定,啤酒中的 ATNC 含量应<20 μg/kg。

1 NDMA 的生成与预防

麦芽是啤酒中 NDMA 的来源。制麦过程中的烘干工艺是 NDMA 污染的最初来源,燃料燃烧产生的二氧化氮会与在发芽中形成的蛋白(大麦醇溶蛋白)发生亚硝化反应,形成 NDMA^[3]。

N₂O₃ 也叫亚硝酸酐,是弱酸溶液中的亚硝化基团。



在大麦中,大麦芽碱(对二甲氨基乙基苯酚)、禾胺(芦竹碱、2-二甲氨基甲基吡啶)、N-甲基酪胺都是含有(CH₃)₂N-基团的叔胺。具体结构式如图 1。

收稿日期:2005-03-07

作者简介:李梅(1972-),女,吉林人,硕士,工程师,从事啤酒分析工作。

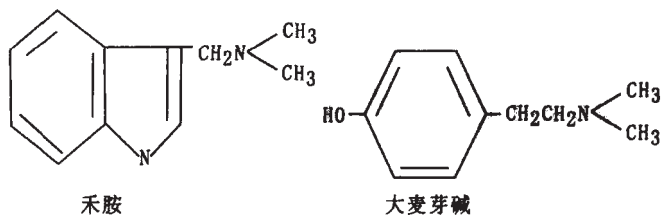


图 1 结构式

实验表明,任何带有(CH₃)₂N-基团的叔胺可以通过亚硝化反应生成 NDMA。反应机理如图 2。

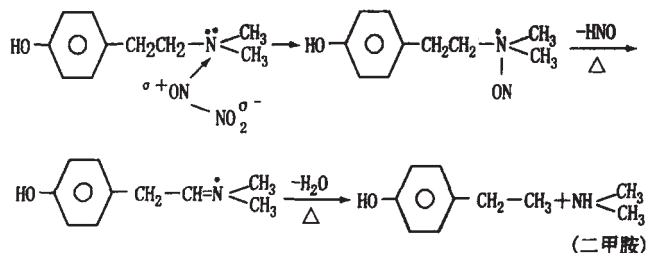


图 2 反应机理

水解反应要求温度在 75~90℃之间,这就是直到最后烘干阶段 NDMA 才大量产生的原因(见图 3)。

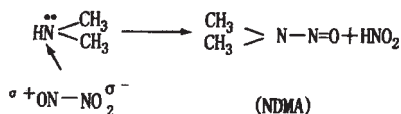


图 3 水解反应

亚硝胺一经形成非常稳定,破坏亚硝胺会对麦芽造成损伤。因此,应重点预防亚硝胺的形成。预防措施主要有:①制麦时采用硫磺熏蒸。SO₂可以抑制亚硝化反应,制麦时采用硫磺熏蒸可以显著降低麦芽的 NDMA 含量,而且成本不高。也可以添加其他酸类,如磷酸等。但酸会腐蚀烘干设备。②在 N₂O₃ 同胺发生反应前将其破坏。使用抗坏血酸(Vc),可在水溶液中将亚硝酸酐转化成无害的 NO,但成本过高。③降低火焰温度。大气中氮原子形成 NO_x 的化学反应对温度依赖性很高。对于明火加热干燥炉,降低火焰温度是很有效的途径。现在,啤酒生产企业普遍使用间接加热炉,蒸汽经过换热器加热干燥炉内空气,再用鼓风机使热空气循环来烘干麦芽。这样不但可以降低 SO₂ 产生量,保护环境,而且还可以降低亚硝胺的形成。

调整制麦工艺后,NDMA 含量大幅降低。1990 年美国啤酒中 NDMA 含量仅相当于 10 年前的 1%~5%。这说明啤酒行业采取有效的措施,预防和降低 NDMA 的努力是成功的。

2 ATNC 的产生原因

与挥发性的 NDMA 相比,酿造者对非挥发性的 N-亚硝基化合物的了解很少。这是由于分析技术的原因,

难以对微量的非挥发性的 N-亚硝基化合物进行定性定量。Massey^[4](1984)研究采用化学发光技术检测 N-亚硝基化合物,定义为 ATNC。Massey^[5](1990)检测了啤酒中的 ATNC,42%的啤酒中 ATNC 含量达 569 μg (N-NO)/kg。啤酒中 NDMA 和 ATNC 的含量没有相关性。发酵过程取样检测发现,细菌的硝酸盐还原反应影响 ATNC 的形成,但对 ATNC 没有影响。同时证明,在发酵期间形成的 ATNC 可以消除掉,方法是酸洗酵母,选择性地使细菌污染物失活。

微生物的硝酸盐还原反应是形成 ATNC 的首要原因。Smith^[6](1991)研究指出,微生物的硝酸盐还原作用是酿造过程形成 ATNC 的首要途径,从糖化醪中分离的嗜热脱硝酸盐细菌可以还原硝酸盐,最终影响 ATNC 含量,这一作用对 ATNC 的影响远远高于发酵过程的污染菌的作用。

3 N-亚硝基化合物的分析检测

3.1 热能分析法

热能分析仪(TEA)的研制成功提高了 N-亚硝基化合物的检出限。TEA 是基于化学发光法检测亚硝基化合物的特定仪器。首先采用特殊金属或金属氧化物催化,将样品在 400~450℃热裂解,所有亚硝胺的 N-NO 键被切断。热裂解产物与 O₃ 反应,将 NO 转化成激发态的 NO₂*。当激发态的 NO₂* 衰减时在近红外区释放能量,释放的光波由光电倍增器捕获并检测。

TEA 出现后,很多以前没有检测出亚硝胺污染的样品发现存在污染,如啤酒。1978 年,德国的 Dr. Preussmann^[1]等首次分析出啤酒中含有 ppb 级的 NDMA。他们共对 158 种欧洲啤酒样品进行可挥发性亚硝胺的分析,70%的样品被证实含有 NDMA,平均含量为 2.7 μg/L,最高含量达到 68 μg/L。这引起了美国酿酒师协会的高度重视。表 1 是美国某商业实验室对啤酒样品中 NDMA 的分析检测数据^[7]。

表 1 GC-TEA 测定啤酒中的 NDMA 结果			
样品代码	NDMA(μg/L)	内标回收率	NDMA(μg/L)(校正)
B-11-21	7.3	98	7.4
B-12-8	7.2	96	6.9
C-1-1	6.7	83	8.1
C-1-4	6.3	77	8.2
平均值(ppb)			7.6
标准偏差(ppb)			0.7

3.2 气相色谱法及其样品的前处理方法

分离分析挥发性亚硝胺时,通常采用气相法。

采用 GC-TEA 和 GC-MS 分析样品前,都要对样品进行一定的处理。主要的前处理方法有硅藻土吸附法、真空低温蒸馏法、水蒸汽蒸馏法、直接萃取法等。

3.2.1 硅藻土吸附法

称取 25 g±0.1 g 啤酒置于 600 mL 烧杯中。加入内标(亚硝基二丙胺)1 mL 和 25 g 硅藻土。搅拌均匀,在层析柱末端放置玻璃棉,在玻璃棉上覆盖 20 g 无水 Na_2SO_4 。通过漏粉斗和捣棒将混合物填充于层析柱内。用 75 mL 二氯甲烷以 1~2 mL/min 速度洗脱,大约会得到 35 mL 洗脱液,洗脱液经旋转蒸发仪和氮吹仪浓缩至 1 mL。

3.2.2 真空低温蒸馏法

在双颈瓶中加入 50.00 g 脱气的样品和玻璃珠,加入 4 mL NaOH 溶液(1 mol/L),混匀后蒸馏。在 53.3 kPa 真空度下低温蒸馏,待样品剩余 10 mL 左右时,把真空度调节到 93.3 kPa,直到样品蒸发至近干为止。

把蒸馏液移入 250 mL 的分液漏斗,加 4 mL 盐酸(0.1 mol/L),用 20 mL 二氯甲烷提取 3 次,每次 3 min,合并提取液,用 10 g 无水硫酸钠脱水后转移至 K-D 浓缩器中,于 55 °C 水浴上浓缩至 10 mL,再以缓慢的氮气吹至 1.0 mL。

3.2.3 水蒸汽蒸馏法

水蒸汽蒸馏是分离和纯化与水不相混溶的挥发性有机物常用的方法。它可在较低温度时将沸点较高的有机物分离并提纯。在常压下应用水蒸汽蒸馏,能在低于 100 °C 时将高沸点组分与水一起蒸出来,可以从大量树脂状杂质或不挥发性杂质中分离有机物,除去不挥发性杂质。NDMA 沸点为 152 °C,化学性质稳定,长时间与水共沸不会发生化学反应,几乎不溶于水,在 100 °C 时蒸汽压 ≥ 1.33 kPa,完全适用于水蒸汽蒸馏。

称取 10 g 粉碎麦芽(啤酒除气后量取 100 mL)置于水蒸汽蒸馏装置的蒸馏瓶中,加 100 mL 水(啤酒不加水),摇匀。在蒸馏瓶中加入 30 g 氯化钠,充分摇动使其溶解。将蒸馏瓶与水蒸汽发生器及冷凝器连接好,并在锥形接收瓶中加入 40 mL 二氯甲烷及少量冰块,收集 200 mL 馏出液。

样品经水蒸汽发生器蒸馏后,还要用有机溶剂萃取。在锥形接收瓶中加入 40 g 氯化钠和 2 mL 的硫酸(1+3),搅拌使氯化钠完全溶解。然后转移到 500 mL 分液漏斗中,震荡 5 min,静止分层。将二氯甲烷转移到另一锥形瓶中。再用 80 mL 二氯甲烷分 2 次提取水层,合并提取液 120 mL。将提取液用无水硫酸钠干燥后,用旋转蒸发仪于 50 °C 水浴浓缩至 1 mL。

3.2.4 直接萃取法

考虑到回收率,有时可以不经水蒸汽蒸馏直接用有机溶剂萃取。图 1 是啤酒和麦芽的前处理过程^[8]。

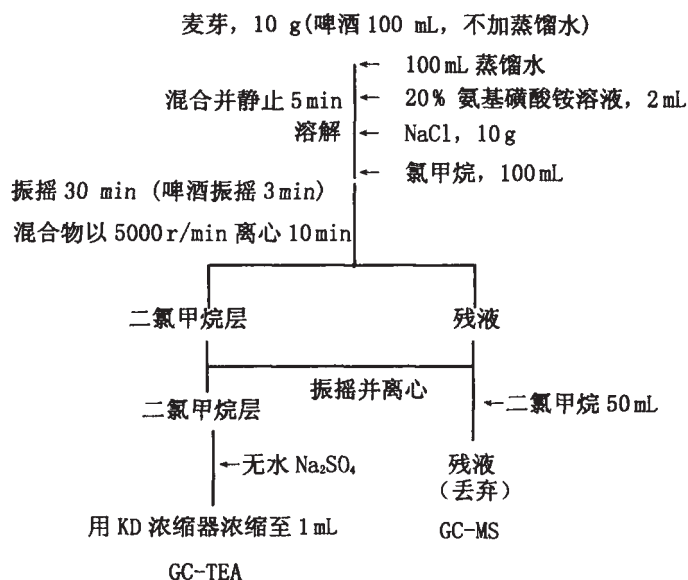


图 1 啤酒和麦芽的处理过程

3.2.5 几种样品处理方法的比较

硅藻土吸附法最为简便,可快速筛分样品是否存在亚硝胺污染。硅藻土吸附法和真空低温蒸馏法仅适用于啤酒样品,是 ASBC 和国标采用的方法。

由于质谱离子源容易受到污染,对样品的纯净度要求高。水蒸汽蒸馏法得到的样品能较好地满足此要求。尤其对于麦芽这种固体样品最为适合。但由于操作步骤多,回收率要低于直接萃取法。

直接萃取法是日本麒麟公司的方法,仪器设备简单,操作时间快,回收率较高。

3.3 HPLC 法^[9]

随着 HPLC 与 TEA、MS 等检测器接口难题的解决,可以用 HPLC 代替 GC 用于分析液体样品中的 NDMA,如啤酒。非挥发性亚硝胺的分离用 HPLC 法更为普遍,用 GC 法分离非挥发性亚硝胺需要衍生化形成一种挥发性化合物。

HPLC-UV 和 HPLC-荧光用溴化氢-乙酸化学断裂 N-亚硝基键,使之生成相应的仲胺。所得仲胺被衍生化,形成具有紫外吸收或荧光的化合物,从而可用常规方法检测。常用的衍生化试剂有丹磺酰衍生物和 2,4-二硝基苯化合物等。色谱柱条件: C18 柱;流动相:乙腈/水=55/45;流速:1.2 mL/min。表 2 为 Cardenes 等人的实验数据^[10]。

表 2 HPLC-荧光法测啤酒中的 NDMA ($\mu\text{g/L}$)

啤酒种类	样品数量	<0.04	0.04~0.29	0.30~0.50	0.50~1.10	均值
Blonde	26	19	3	3	1	0.19
Dark	13	9	2	1	1	0.14
Wheat	5	5	0	0	0	0.04
总数	44	33	5	4	2	0.16

内标回收率: 98.6%

4 采用 GC-MS 法测定麦芽和啤酒中的 NDMA

研究采用直接萃取的前处理方法 , 用 GC-MS 测定啤酒和麦芽中的 NDMA。2 个麦芽样品和 7 个啤酒样品的检测结果均为未检出。

5 小结

从发现啤酒中含有 NDMA 以来 , 国外同行对它的监测一直没有间断。最近 ,比利时 Brandt 等^[11]研究发现一些多年饮用啤酒的人群中结肠癌的发病率最高 ,主要是因为 20 世纪 80 年代啤酒中的高含量亚硝胺 ,亚硝胺又再度引起酿造界的关注。国内对亚硝胺的研究较少 ,未见相关报道。

参考文献 :

[1] Spiegelhalter, B., Eisenbrand, G. & Preussmann, R. , Food and Cosmetics Toxicology[M]. 1979.

[2] David Long. Food safety in the brewing sector: meeting the challenge of legislative developments and consumer expectation[J]. Proc. Eur. Brew. Conv., Dublin, 2003.

[3] W.A.Hardwick , et al. N-Nitrosodimethylamine in malt beverages-anticipatory action by the brewing industry[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology , 1982 (2) 38-66.

[4] Massey, R. C., et al. The application of a chemical denitro-

sation and chemiluminescence detection procedure for estimation of the apparent concentration of total N-nitroso compounds in foods and beverages[J]. Food Additives and Contaminants, 1984(1):11-16.

[5] Massey, R. C., et al. An investigation of the levels of N-nitrosodimethylamine, apparent total N-nitroso compounds and nitrate in beer[J]. Food Additives and Contaminants, 1990,7(5) 605-615.

[6] Smith, N. A., N-nitrosamines in brewing, Proc. Eur. Brew. Conv[M]. Lisbon, 1991 : 561-568.

[7] Hardwick, Wm. A. The determination of NDMA in beer and in brewing materials. MBAA[J] Technical Quarterly, 1981, 18(2) 95-96.

[8] Tomiko Tezuka et al. Determination of N-nitrosodimethylamine in malt and beer with TEA-GC system[J]. Dept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd. 1980,(22) 51-54.

[9] R.Macrae 著 ,曹志军 ,等翻译.现代实用高效液相色谱分析法 [M]. 1991 218-229.

[10] Lourdes Cardenes et al, J. LIQ. CHORMATOGR and A-TOTECHNOL[J].2002 25(6) 977-984.

[11] Van den Brandt, P.A. The British Beer & Pub Association. Proceedings of the 30th International Medical Advisory Group Conference[C]. Brussels, Belgium. 2002 ,13-16.



五粮液、茅台、泸州老窖和全兴大曲 获‘ 纯粮固态发酵白酒 ’标志

本刊讯 2005 年 8 月 9 日 ,中国食品工业协会白酒专业委员会在北京发布通知 ,确认五粮液、茅台、泸州老窖和全兴大曲 4 个白酒行业知名品牌系全部采用纯粮固态发酵工艺生产 ,加上此前公布的剑南春酒 ,目前共有 5 个品牌的 15 个产品获准使用纯粮固态发酵白酒标志 ,这 5 个品牌白酒的出厂价格每瓶从 30 多元到 300 多元不等 ,消费者购买纯粮固态发酵传统工艺白酒的选择余地更大了。

据中国食品工业协会白酒专业委员会负责人介绍 ,五粮液等 4 个品牌白酒都是在《全国白酒行业纯粮固态发酵白酒行业规范》发布后提交了申请报告 ,中国食品工业协会白酒专业委员会依照《规范》的要求 ,严格履行了产品微量成分检测、感官质量鉴评和生产现场审核等程序 ,审核证实五粮液等 4 个品牌的白酒完全符合《规范》和《纯粮固态发酵白酒审定规则》的要求。中国食品工业协会白酒专业委员会负责人介绍 ,这 4 个产品全部是具有悠久历史的中国白酒知名品牌 ,其生产工艺和产品风格各具特色。现场审核查实 ,宜宾五粮液股份有限公司现有纯粮固态发酵窖池 29882 个 ,可以认为是全世界最大的固态发酵饮料酒生产基地 ,按其投料量和发酵周期计算 ,在满负荷生产时五粮液公司具备年产纯粮固态基础酒 25 万吨以上的生产能力 ,经加浆降度后可生产不同酒精度的商品酒 40 万吨 ,而生产记录显示五粮液品牌白酒每年供应市场 6000~8000 吨 ,仅占该公司商品酒产能的 2 %左右 ,因而 ,五粮液的生产能力是酿造优质白酒的基础保障。并且 ,五粮液采用优质基酒加陈年调味酒进行勾兑调味 ,其工艺先进 ,技术可靠 ,产品表现出绵柔净爽、独具陈香的风格。现场审核时发现 ,贵州茅台酒近年来正在步入快速发展期 ,其纯粮固态发酵白酒生产能力已超过 10000 吨 ,目前正在进行第二个万吨基地的建设。据茅台集团董事长、白酒专家季克良介绍 ,由于酱香型白酒工艺独特 ,从古至今茅台酒一直全部采用纯粮固态发酵工艺生产 ,茅台酒举世无双的优异品质和独特的典型风格 ,就是来源于茅台酒始终坚持的纯粮固态发酵 ,以及采用不同轮次、不同贮存时间的基酒相互勾调 ,按期贮存 ,使成品酒保持恒定的质量水准和幽雅细腻、留香持久的独特风格。季克良还表示 ,茅台的技术创新表现为根据市场需求不断提高产品质量和新产品研发 ,茅台从没有采用添加食用酒精和其他非自身发酵物质的新工艺。此外 ,据白酒行业专家介绍 ,被誉为我国浓香型白酒“鼻祖”的泸州老窖特曲酒属单粮浓香型的典型代表 ,在 1915 年巴拿马万国博览会获金质奖章 ,并从 1952 年起 5 次蝉联中国名酒金奖。而全兴大曲是老八大名酒之一 ,其绵软甜净的风格 ,在白酒行业独树一帜。

对于在白酒行业推广纯粮固态发酵行业规范、引导行业科学健康发展的举措 ,国家发改委经济运行局副局长牛建国指出 :发布实施纯粮固态发酵白酒行业规范 ,公布纯粮固态发酵白酒标志 ,可以引导白酒企业进行规范的生产经营和宣传推广活动 ,也可以保护消费者的利益 ,政府应给予大力支持。同时 ,要继续坚持纯粮固态发酵白酒标志审核和管理的科学性、公正性和权威性 ,企业要自觉接受规范的约束 ,不断提升产品的质量 ,维护纯粮固态标志的信誉 ,政府部门、新闻舆论以及社会公众有责任和义务监督标志的实行情况 ,使它成为全社会公认的信誉标志 ,努力提升中国传统白酒产品在国内外市场的竞争能力。

《纯粮固态发酵白酒行业规范》发布近半年来 ,已在白酒行业引起热烈响应。最近 ,四川、山东、江苏、贵州、河南、安徽、湖北省和北京、重庆市等地食品工业协会又审核推荐了一批申请纯粮固态发酵白酒标志的产品名单 ,中国食品工业协会白酒专业委员会表示将严格按照既定工作程序逐一审核 ,并将结果及时向消费者公布。(江源)