

固相萃取-高效液相色谱法测定酱油中的7种有机酸

谭丽贤

(佛山市海天调味食品股份有限公司, 广东佛山 528000)

摘要: 提出了一种利用固相萃取-高效液相色谱法同时分析酱油中焦谷氨酸等7种有机酸的方法。酱油经制样后过 Strata SAX 固相萃取(SPE)小柱净化,在 Agilent SB-Aq (150 mm×4.6 mm×5 μm) 色谱柱上,0.01 mol/L 磷酸氢二铵(pH 2.7) 溶液为流动相,流速为 0.7 mL/min,柱温为 35 ℃,紫外检测波长为 210 nm 时,可以较好地分离和测定酱油中焦谷氨酸等7种有机酸。该方法相对标准偏差 0.13%~1.9%,回收率 95.0%~105%,各种酸的线性相关系数 $r > 0.9993$,具有较高的准确度和精密度,方法简便,可应用于酱油中有机酸的检测。

关键词: 酱油; 焦谷氨酸; 有机酸

文章编号: 1673-9078(2012)7-871-874

Determination of Seven Organic Acids in Soy Sauce by Solid Phase Extraction-high Performance Liquid Chromatography

TAN Li-xian

(Foshan Haitian Flavoring & Food Co., Ltd, Foshan 528000, China)

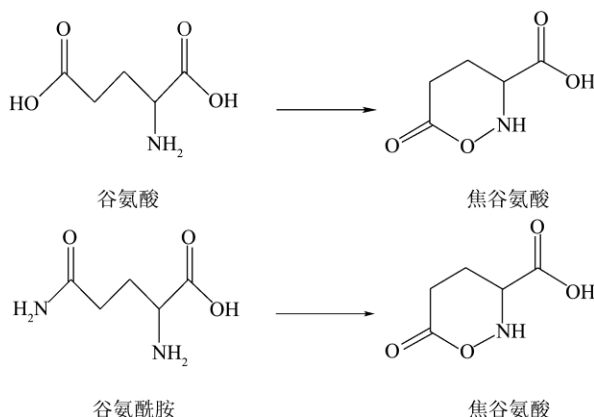
Abstract: A new method for simultaneous determination of seven organic acids in soy sauce was developed with solid phase extraction-high performance liquid chromatography. The sample was purified by a Strata SAX SPE cartridge after pretreatment, then separated using a reversed-phase Agilent SB-Aq (150 mm×4.6 mm×5 μm) column. 0.01 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (pH 2.7) solution was used as the mobile phase at a flow rate of 0.7 ml/min. The detection was performed on an ultraviolet detector at 210 nm. The relative standard deviations were 0.13%~1.9% and the recoveries were 95.0%~105%. The correlation coefficients for the linear equations were 0.9993~0.9999. The results mentioned above indicated that the method was simple, rapid and accurate. It could be applied to the determination of organic acids in soy sauce.

Key words: soy sauce; pyroglutamic acid; organic acid

酱油是我国的传统发酵调味品,由于其独特的风味、色泽以及丰富的营养价值,已成为我国、日韩、东南亚各国乃至欧美人民饮食生活中不可或缺的调味品。酱油中含有多种有机酸,最主要的是乳酸,其次是焦谷氨酸,此外还会有少量的琥珀酸、柠檬酸、醋酸、苹果酸等^[1],多种有机酸在酸味及风味方面对酱油的风味起到了一定的综合作用,但是焦谷氨酸是没有鲜味的,对酱油风味是不起作用的。酱油生产过程中蛋白质原料经蛋白酶作用产生谷氨酰胺,再由谷氨酰胺酶分解成谷氨酸,但是当酱油曲料中缺乏谷氨酰胺酶或其酶活力偏低时,谷氨酰胺便会经非酶解的渠道生成焦谷氨酸。与此同时,当谷氨酰胺浓度较低时,谷氨酸转化成焦谷氨酸的反应也会比较激烈^[2]。

一般酱油中的有机酸含量多以总酸为代表,但多种有机酸在不同条件下解离出氢离子的程度不同,各

种有机酸的解离度也不同,所以总酸作为测酸指标并不能恰如其分地反映酸的程度。



目前国内对于酱油中有机酸的研究比较多,所采用的分析方法主要有气相色谱法(GC)^[3]、高效液相色谱法(HPLC)^[4]、离子色谱法(IC)^[5]等,但是关于酱油中焦谷氨酸含量的检测报道较少。本文建立了固相萃取-高效液相色谱法测定酱油中焦谷氨酸等7种有机酸的方法,该方法能有效解决酱油蛋白质和色

收稿日期: 2012-03-28

基金项目: 广东省科技计划项目(2010A010500009)

作者简介: 谭丽贤(1980-),女,工程师,主要从事调味品检验和分析

素含量高导致干扰有机酸分析以及造成色谱柱污染等问题,为酱油制造工艺及质量鉴别提供相关资料。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

安捷伦 1100 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司,美国),配紫外检测器;Strata SAX 固相萃取(SPE)小柱(3 mL, 500 mg, 美国 Phenomenex 公司);785 全自动电位滴定仪(瑞士万通公司)。

焦谷氨酸、酒石酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、琥珀酸均购自美国 Sigma 公司;甲醇为色谱纯试剂(美国 TEDIA 公司);盐酸、氢氧化钠、磷酸及磷酸氢二铵为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

1.2 色谱条件

色谱柱:Agilent SB-Aq (150 mm×4.6 mm×5 μm);流动相:0.01 mol/L 磷酸氢二铵,用磷酸调至 pH=2.7;流速:0.7 mL/min;柱温:35 °C;波长:210 nm;进样量:20 μL。

1.3 标准曲线

准确称取焦谷氨酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸各 0.500 g,用水溶解后定容至 50 mL,得到浓度为 10 g/L 的标准储备液;分别取 5.00 mL 单一标准储备液于 50 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,得到浓度为 1.0 mg/mL 的标准使用液。4 °C 下储存。

1.4 样品前处理

称取酱油样品 10.0 g 于 100 mL 烧杯中,加入约 40 mL 水,用 10% 氢氧化钠调节 pH 值至 8.2,转入 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。将 Strata SAX 固相萃取(SPE)小柱以此用 3 mL 甲醇活化,3 mL 水平衡,备用。吸取 0.50 mL 上述酱油溶液转移至 SAX 固相萃取柱中以自然流速过柱,待样品全部吸附后用 3 mL 水淋洗,流速约 3 mL/min,抽至近干后,用 2.00 mL 盐酸(1+20)以不超过 1 mL/min 流速洗脱。洗脱液过 0.22 μm 微孔滤膜后,供 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

有机酸均为极性小分子弱酸,易溶于水,在水系流动相中以离子形式存在而不能在非极性的键合相色谱柱固定相上保留。有机酸的解离常数不是很大($pK_a > 2$),在 pH 2~3 时,有机酸的解离反应向逆反应方向进行,解离受到抑制。这时有有机酸可在非极性 C18 柱的固定相上保留而得到分离。但由于使用 pH 值如此低的流动相,且使用全水相流动相分析,对硅

胶柱的键合相非常不利,导致色谱柱固定相填料塌陷,寿命大大降低,色谱峰的重现性也会受到严重影响,因此不能使用一般的 C18 色谱柱进行分析。SB-Aq 柱使用二异丙基侧链官能团硅烷,空间位阻关键的硅氧烷键合到硅胶表面,此亲水性表面,即使是使用 100% 水溶液低 pH 值流动相,也可以有效防止固定相的塌陷。使用 SB-Aq 柱分析极性化合物仍可以获得良好的重复性和出色的峰形,且低 pH 和高温条件下的使用寿命和稳定性都非常好。

2.2 固相萃取(SPE)小柱的选择

酱油的前处理一般可采用直接进样、液液萃取、有机溶剂沉淀法去蛋白、固相萃取法等。由于酱油含有丰富的蛋白质和色素,使用直接进样法往往不能排除杂质对目标峰的干扰;液液萃取法是利用目标分析物在两种不相溶液体之间通过分配对样品进行分离而达到目标分析物纯化和消除干扰物质的目的,但有机酸通常是易溶于水的极性小分子物质,不能通过有机溶剂萃取法进行分离纯化;有机溶剂沉淀法去蛋白通过降低溶液介电常数,破坏蛋白质的水化膜而使蛋白质沉淀析出,但是仅使用有机溶剂沉淀法只能去除酱油中的蛋白质并不能有效去除色素等其它杂质;固相萃取(SPE)是利用固体吸附剂将液体样品中的目标分析物吸附,与样品的基体和干扰化合物分离,然后再用洗脱液洗脱,达到分离目标分析物的目的,此法能应用在酱油中有机酸的分析中,达到有效去除干扰物的目的。

本文比较了 Strata C18、Strata SAX、Strata-X-AW 3 种 SPE 柱对酱油中有机酸萃取效果以及去除干扰物的效果。分别将调节 pH 后的样品溶液直接过 SPE 柱,收集 Strata C18 柱的流出液以及 Strata SAX 和 Strata-X-AW 柱洗脱液进 HPLC 分析,结果表明 Strata C18 对酱油中的色素有较好的吸附作用,但对蛋白质的吸附作用较差,流出液中的蛋白质严重干扰了有机酸的分析。Strata SAX 和 Strata-X-AW 柱通过阴离子交换方式能有效吸附有机酸,而蛋白质和部分色素则不被吸附,从而达到去除干扰物的目的。但从分析结果看,有机酸在 Strata-X-AW 柱保留不如 Strata SAX 柱,导致有机酸的回收率偏低。究其原因,虽然有机酸均属于弱酸,但在其 $pK_a > 2$,在弱阴离子交换柱中保留较弱,需要使用强阴离子交换柱才能有较好的保留,因此选择 Strata SAX 柱进行酱油中有机酸的净化。

2.3 样品 pH 值的选择

由于 SAX 柱是以硅胶为基质的强阴离子交换 SPE 柱,其主要官能团为三甲基胺丙基,主要作用力是阴离子交换,因此为了保证有机酸被 SPE 柱有效吸

附, 需要通过调节样品 pH 值使有机酸以阴离子形式被吸附。由于有机酸均为弱酸, 其盐呈若碱性, 因此可用 10% 氢氧化钠溶液将样品 pH 调值 8.2, 以确保所有有机酸均以离子形式存在于样品溶液中。结果表明, 当样品 pH 值为 8.2 时, 7 种有机酸的回收率达到 90% 以上。

2.4 上样量和洗脱剂用量的选择

为了使目标分析物从 SPE 柱上被洗脱出来, 洗脱剂应选择强酸溶液, 有机酸在酸性条件下以分子形式存在, 致使 SPE 柱对其保留性大大降低, 从而达到洗脱的目的。而洗脱剂的用量同样需要严格控制, 洗脱剂用量不足时目标分析物不能完全从 SPE 柱上洗脱, 洗脱剂用量过多时会导致稀释倍数过大, 本文比较了 1 mL、2 mL、3 mL 3 种上样量对 7 种有机酸洗脱效果的影响, 结果表明洗脱剂为 1 mL 时回收率能达到 90% 左右, 洗脱剂为 2 mL 以上时回收率能达到 95% 以上, 因此选择洗脱剂用量为 2 mL。

由于酱油的成分比较复杂, 除蛋白质等大分子不被 SAX 柱吸附外, 某些色素类以离子形式存在的有机小分子依然会被 SAX 柱吸附, 因此为了保证 7 种目标分析物被 100% 吸附, 需要选择大规格 SPE 柱, 本实验采用了较大规格的 500 mg/3 mL 柱。与此同时, 需要控制样品的上样量, 较大的上样量会导致目标分析物不能完全被吸附, 较少的上样量会使稀释倍数增大。本文比较了 0.5 mL、1 mL、2 mL 3 种上样量对 7 种有机酸吸附效果的影响, 结果表明上样量为 2 mL 时 7 种有机酸的回收率只有 80% 左右, 上样量为 1 mL 时回收率能达到 90% 左右, 上样量为 0.5 mL 时回收率能达到 95% 以上, 因此选择上样量为 0.5 mL。

2.5 回归分析和检出限

表 1 回归分析和检出限

Table 1 Regression analysis and detection limits

有机酸	回归方程	相关系数	检出限/ng
酒石酸	$y=2.83x+152$	0.9995	18.6
苹果酸	$y=1.80x+1.54$	0.9999	39.7
乳酸	$y=0.949x+9.03$	0.9996	73.5
乙酸	$y=1.12x+3.31$	0.9999	64.3
柠檬酸	$y=2.33x+1.94$	0.9999	30.1
焦谷氨酸	$y=14.0x+168$	0.9993	4.7
琥珀酸	$y=1.45x-8.68$	0.9999	50.0

分别取 7 种有机酸标准使用液 0.10、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 mL, 用水稀释至 10 mL, 配成一系列标准溶液, 采用上述色谱条件进样 20 μ L 分析, 于 210 nm 处测量峰面积, 以有机酸的浓度为横坐标 (x, mg/mL), 峰面积为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得到

线性回归方程; 同时进行样品添加试验, 以信噪比 (S/N) 为 3 确定各有机酸在酱油样品中的检出限, 结果见表 1, 色谱图见图 1。

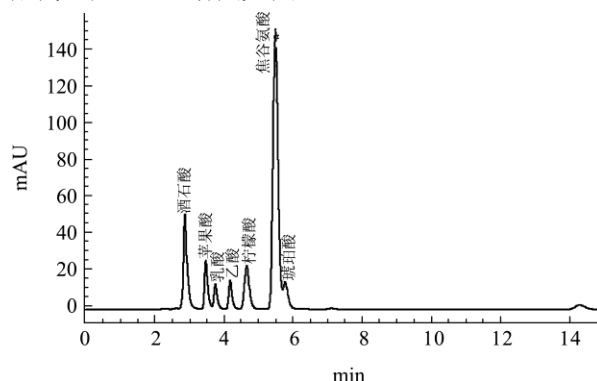


图 1 有机酸混合标准色谱图

Fig.1 HPLC Chromatogram of the organic acid standards mixtures

2.6 回收率和精密度

表 2 回收率和精密度

Table 2 Recovery and precision

有机酸	加标量/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
酒石酸	1.0	96.1	1.9
	2.0	100	1.7
	10.0	99.8	1.9
苹果酸	1.0	95.9	1.9
	2.0	98.0	0.7
	10.0	98.4	1.3
乳酸	1.0	105	0.31
	2.0	98.0	0.13
	10.0	104	1.0
乙酸	1.0	95.0	1.4
	2.0	98.5	0.44
	10.0	98.2	0.72
柠檬酸	1.0	96.0	1.1
	2.0	99.0	0.35
	10.0	99.9	1.3
焦谷氨酸	1.0	95.0	0.75
	2.0	102	0.69
	10.0	102	1.1
琥珀酸	1.0	95.0	1.2
	2.0	99.5	1.4
	10.0	99.9	1.0

准确称取酱油样品 10.00 g 作为本底, 加入适量有机酸混合标准溶液, 制成加标浓度分别为 1.0、2.0、10.0 mg/mL 酱油加标样品, 按 2.4 所述方法处理并按 2.2 所述色谱条件检测, 每一加标水平平行测定 6 次, 计算平均测定值、平均回收率和相对标准偏差 (RSD)。

7种有机酸的加标回收率和精密度结果见表2。结果表明,在不同的加标水平下,7种目标有机酸的回收率稳定,精密度良好,满足酱油样品中有机酸的分析要求。

表3 酱油中有机酸的含量 (g/kg)

Table 3 Contents of the organic acids in soy sauce

样品	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	焦谷氨酸	琥珀酸
1	-	-	3.70	4.48	2.01	8.87	2.01
2	-	-	5.49	2.72	4.18	4.57	2.57
3	-	-	5.04	0.59	5.23	6.12	1.83

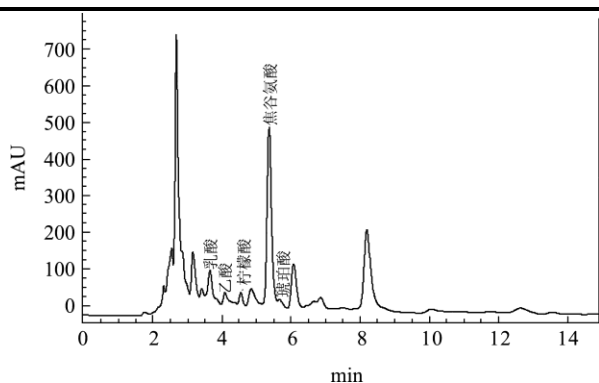


图2 酱油样品的色谱图

Fig.2 HPLC Chromatogram of organic acids in soy sauce

2.7 酱油中有机酸的分析

应用本方法对3个酱油样品进行有机酸含量测定,结果见表3,其中一个样品的色谱图见图2。

3 结论

利用固相萃取SPE技术,通过优化SPE条件,并结合高效液相色谱仪进行检测,建立了酱油中焦谷氨酸等7种有机酸的测定方法,该法简单、快速、操作方便,准确度和精密度高,适用于酱油样品中有机酸的测定。研究结果为建立酱油有机酸指纹图谱提供研究方法,并为酱油酿造过程中的质量控制及其产品质量检验提供了准确的依据。

参考文献

- [1] 《上海调味品》资料室.酱油中的有机酸[J].上海调味品,1997,3:28
- [2] 包启安.酱油科学与酿造技术[M].中国轻工业出版社,2011
- [3] 杜曦,周锡兰,余录,等.葡萄及葡萄酒中有机酸测定的衍生化气相色谱法[J].酿酒,2008,3:82-84
- [4] 毕丽君,张骊,张鸿发.固相萃取高效液相色谱法分析酱油中的有机酸[J].分析化学,2000,11:1391-1394
- [5] 徐伟,于刚,薛长湖,等.抑制型离子色谱同时测定分离检测鱼酱油中的九种有机酸[J].食品科学,2008,4:306-309