

# 气液色谱法分析发酵豆奶中的低碳有机酸

丁卓平 陈有容 齐凤兰 孙兴民

(上海水产大学, 200090)

**摘要** 有机酸来自有益菌的代谢产物。通过测定有机酸的组成来了解菌种类型,从而确认产品的保健价值,因此对有机酸测定很有必要。由于发酵豆奶中蛋白质含量较高,为此用硅藻土沉淀发酵豆奶中的蛋白质。此外,因短链脂肪酸及其酯化物的挥发性和水溶性强,分析较为困难。本文采用苯酯化法则测定结果的精密度高,回收率也较满意。在对四种不同菌种发酵豆奶测定的同时,还对市场上常见的生态口服液和酸奶作了测定。结果表明本测定方法也是适用的。

**关键词** 发酵豆奶,气液色谱法,有机酸,苯酯化

本文测试所用的发酵豆奶是采用世界著名公司提供的四株益生菌,经过现代生物技术制作而成。发酵豆奶中含有双歧杆菌,其营养保健作用早为世人瞩目。双歧杆菌可迅速在肠粘膜定植,产生大量醋酸和乳酸,使肠道酸化,阻止致病菌繁殖,增加肠道蠕动,加快致病菌的排出,进而维持肠道内的微生态平衡。双歧杆菌能分泌多种酶类,促进食品的降解和吸收[宝福凯, 1995]。双歧杆菌的上述生物化学作用,都与它在肠道内形成酸性环境相关,这是因为双歧杆菌利用多种糖类如葡萄糖、乳糖等而产酸。但不同菌种其代谢产物及代谢能力有所不同。通过测定有机酸的组成可以了解发酵制品所用的菌种,从而确认产品的保健价值,所以有必要对有机酸进行测定。发酵豆奶中乳酸、乙酸,甲酸和丙酸的含量甚微。有机酸在发酵制品中的含量虽然很少,但对制品的风味质量[Catrienus de Jong 和 Herman, T. Badings, 1990]及胶体稳定性起着重要的作用。由于短链脂肪酸及其酯化物的挥发性和水溶性强,所以比分析长链脂肪酸更为困难[Nobukop Kawai 等, 1985],因此在有机酸未成盐前和形成酯化物后要尽量避免对其进行加热、蒸发浓缩等处理。国外有采用有机溶剂萃取,浓缩后直接进行分析;也有用有机溶剂萃取分离后,将其衍生化为酯再进行分析[清野肇等, 1979]。由于这些方法在处理过程中使用大量有机溶剂作多次萃取,使挥发性和水溶性强的短链脂肪酸损失较多,其重现性和回收率都不能得到令人满意的结果。本文采用了苯酯化法[齐凤兰、杨志岩, 1991],并由于发酵豆奶中蛋白质等含量较高,因此在气相色谱分析前必须进行样品前处理。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 原料

发酵豆奶(代号 La、Bb、ABY、Yogurt),三种常见的生态口服液(代号 A、B、C),三种常见

的酸牛奶(代号 A、B、C)。

### 1.1.2 仪器

日立663-30气相色谱仪,配带日立833数据处理机和氢火焰离子化检测器,PHS-2型酸度计,78HW-1型恒温磁力搅拌器,MP8-1(1602)西德沙多利斯电子分析天平,TDL-4型台式离心机等。

### 1.1.3 试剂

甲酸、乙酸、丙酸(均为分析纯)、丁酸(色谱纯)、乳酸、丙酮(均为分析纯),0.0238 M 四丁基氢氧化铵标准溶液,苄基溴(化学纯)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 气相色谱分析条件

色谱柱,φ3mm×1m 玻璃填充柱。

担体,Chromasorb W. A. W. -DMCS 80-100目(英国产)。

固定液,10%丁二酸丁二醇聚酯。

气体流速,N<sub>2</sub>(载气)-35ml/min,H<sub>2</sub>-0.7kgf/cm<sup>2</sup>,空气-0.7kgf/cm。

温度,进样器180℃,柱温145℃,检测器180℃。

进样量为1μl。

### 1.2.2 标准溶液的配制

甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸的标准水溶液的体积浓度分别为0.05%、0.50%、0.50%、0.50%、1.00%。

以甲基橙为指示剂,用盐酸标准液标定四丁基氢氧化铵溶液,求得四丁基氢氧化铵溶液的浓度为0.0238M。

### 1.2.3 样品前处理

取10.00g 样品于离心管中,加入0.5g 硅藻土,加水搅拌均匀,以1000g 离心5min。取上清液,沉淀用5-10ml 水洗涤,离心,取上清液,重复多次至上清液 pH 值大于6(用 pH 试纸检验),生态口服液试样取10.00ml。

往上清液中准确加入0.50%(V/V)丁酸水溶液(内标物)1.00ml,然后用0.0238M 四丁基氢氧化铵标准液中和至 pH 9.00,记下四丁基氢氧化铵标准液的体积。

将中和液移入75ml 瓷蒸发皿中,于沸水浴上蒸发至近干,冷却至室温。以少量丙酮分次将有机酸盐转移至10ml 的容量瓶中,定容,取2.00ml 于5ml 的容量瓶中,按公式(1)求苄基溴的加入量。加入苄基溴,摇匀,于室温下酯化2h 后,即要进样分析。

$$\text{苄基溴的加入量}(\mu\text{l}) = \frac{171.64M \cdot V}{1.438} \times \frac{2}{10} \times 1.5 \quad (1)$$

式中, M—四丁基氢氧化铵标准溶液的摩尔浓度,

V—中和时消耗四丁基氢氧化铵标准溶液的体积(ml),

171.64:苄基溴摩尔质量,

1.438:苄基溴比重,

1.5:苄基溴加入量为理论值的1.5倍。

### 1.2.4 定性分析

依据标准混合酸的组分保留时间对各样品进行定性分析。

### 1.2.5 定量分析

用内标法定量,以丁酸为内标物,依据相对质量校正因子公式计算出各种标准酸的相对质量校正因子,各组分的含量由内标法测得。

### 1.2.6 精密度和回收率

对 Yogurt 酸豆奶进行5个平行试验,并对其结果进行误差分析。

测定回收率,取四份 Yogurt 酸豆奶各10.00g,分别加入0.00、1.00、2.00、3.00ml 的1.00%(V/V)的乳酸水溶液。其后面的处理方法与1.2.3中的各步完全相同。这样可以利用公式(2)计算回收率。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{A-B}{C} \times 100 \quad (2)$$

式中, A—加入标准乳酸后样品中乳酸的测定总量,

B—样品中的乳酸的测定量,

C—加入的标准乳酸量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理

在样品的蒸发过程,如果析出的沉淀物较多,可以将其转入另一蒸发皿中,再用少量蒸馏水洗涤。这样可以减少过多固形物对有机酸盐溶解的影响。在蒸发至近干时,要呈湿润状,利用余热将水份蒸干。

### 2.2 定性分析

标准混合酸及 Bb 发酵豆奶色谱图见图1,图2(其它试样的色谱图因类同从略)。图中1—甲酸,2—乙酸,3—丙酸,4—丁酸(内标物),5—乳酸。标样及样品中各组分中的保留时间见表1。

表1 试样中各组分的保留时间  
Tab. 1 Retention time of various components in samples

	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	乳酸
标 样	3.52	4.16	5.28	7.10	28.86
生态口服液 A	3.45	4.08	5.16	6.92	27.93
生态口服液 B	3.46	4.08	5.19	6.95	28.12
生态口服液 C	3.48	4.11	5.19	7.00	28.23
La 发酵豆奶	3.46	4.10	5.20	6.96	27.42
Bb 发酵豆奶	3.46	4.09	5.17	6.93	28.16
ABY 发酵豆奶	3.46	4.09	5.18	6.94	28.06
Yogurt 酵豆奶	3.48	4.10	5.22	6.98	28.16
酸豆奶 A	3.49	4.14	5.20	7.02	28.30
酸牛奶 B	3.48	4.12	5.24	7.00	28.34
酸牛奶 C	3.50	4.14	5.22	7.03	28.26

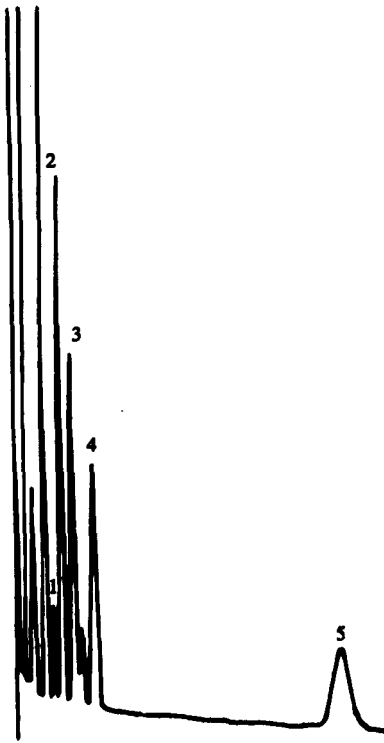


图1 标准混合酸

Fig. 1 Standard of organic acids

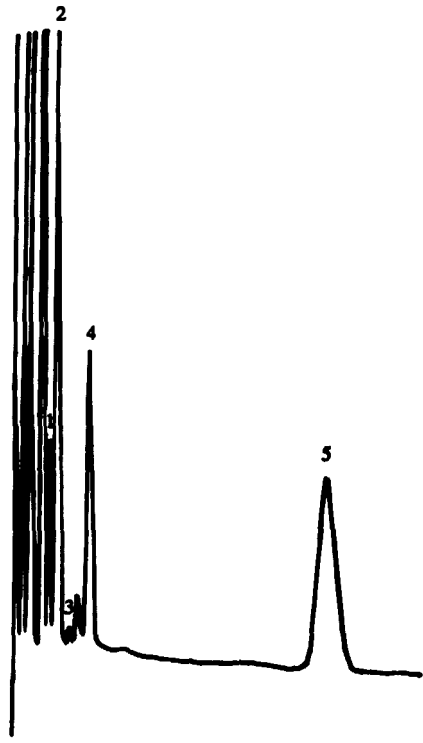


图2 Bb 发酵豆奶

Fig. 2 Bb fermented soybean milk

### 2.3 定量分析

以丁酸为内标进行定量计算。首先根据标准混合酸色谱图中各组分的峰面积、比重、体积浓度、质量百分含量得到相对质量校正因子(三次平均值)见表2。根据微机计算出各样品中各组分的含量见表3。

表2 各有机酸的相对质量校正因子计算数据表

Tab. 2 Relative corrected factors of organic acids

	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	乳酸
体积浓度%	0.05	0.50	0.50	0.50	1.00
质量浓度%	88.0	99.5	99.5	99.5	85.0
比重(g/ml)	1.22	1.05	0.99	0.96	1.20
A1	12036	97164	71163	76713	109638
A2	13087	121490	80738	84832	100569
A3	12276	98935	70859	76433	108140
f1'	0.716	0.863	1.116	1.000	1.496
f2'	0.691	0.827	1.100	1.000	1.800
f3'	0.700	0.844	1.117	1.000	1.509
f'	0.702	0.845	1.111	1.000	1.601

注:表中的 A1、A2、A3分别为三次平行的峰面积, f1'、f2'、f3'为其相对质量校正因子, f'为三次的平均值。

表3 样品中各有机酸组分的含量

Tab. 3 Content of organic acids in samples

	甲酸(g/kg 或 g/l)	乙酸(g/kg 或 g/l)	丙酸(g/kg 或 g/l)	乳酸(g/kg 或 g/l)
口服液 A	0.2573	0.5167	0.0440	15.6532
口服液 B	0.1084	0.1233	0.0122	2.7444
口服液 C	0.1516	0.1556	0.0073	2.5194
La 发酵豆奶	0.1106	0.1810	0.0124	5.6940
Bb 发酵豆奶	0.1077	1.5761	0.0114	1.9641
ABY 发酵豆奶	0.1313	0.9638	0.0149	6.8855
Yogurt 酸豆奶	0.0337	0.0526	0.0088	4.5582
酸牛奶 A	0.0741	0.0614	0.0135	9.9249
酸牛奶 B	0.0362	0.0610	0.0132	7.9411
酸牛奶 C	0.0341	0.0515	0.0231	9.9038

注:上表中对于口服液中各成分的单位为 g/l,其它均为 g/kg。

可见各样品中乳酸含量为最高,其次是乙酸,甲酸和丙酸含量甚微。生态口服液 A 中乳酸含量远高于口服液 B、C。利用双歧乳酸杆菌发酵的 Bb 发酵豆奶、生态口服液 A 和利用混合菌发酵的 ABY 发酵豆奶,乙酸含量较高,这是由于双歧乳酸杆菌产生乙酸的缘故。由于酸牛奶中只有乳酸菌,所以乳酸含量很高,其它酸则含量甚微。

## 2.4 分析方法的精密度与回收率

### 2.4.1 精密度

以10.00g Yogurt 酸豆奶为样品,做5次平行实验,求精密度(以相对平均偏差表示),其结果见表4。由于样品中甲酸、丙酸含量较低,故其相对平均偏差较乳酸、乙酸高,总的来说本法的精密度是高的。

表4 各有机酸组分的相对平均偏差

Tab. 4 Deviation of organic acids

	甲酸(g/kg)	乙酸(g/kg)	丙酸(g/kg)	乳酸(g/kg)
精1#	0.0335	0.0481	0.0089	4.3268
精2#	0.0334	0.0522	0.0092	4.2659
精3#	0.0359	0.0504	0.0098	4.2358
精4#	0.0428	0.0515	0.0109	4.2397
精5#	0.0374	0.0515	0.0097	4.3231
平均值	0.0366	0.0507	0.0097	4.2822
平均偏差	0.0028	0.0012	0.0003	0.0341
相对平均偏差	8%	2%	5%	1%

### 2.4.2 回收率

由于样品中乳酸含量较高,故选用乳酸测回收率。取3份10.00g Togurt 酸豆奶,分别加入1.00ml,2.00ml,3.00ml 1.00%(V/V)乳酸水溶液,进行分析测定,按公式(2)计算回收率,结果见表5。

表5 样品中的回收率  
Tab. 5 Recovery of organic acid in sample

样品	样品中乳酸的量 ( $10^{-2}$ g)	加入标准乳酸的量 ( $10^{-2}$ g)	加入标准乳酸后样品中测得乳酸的总量 ( $10^{-2}$ g)	回收率 (%)
回0#	4.5582	0.00	4.5582	
回1#	4.5582	1.02	5.7097	112.9
回2#	4.5582	2.04	6.8811	113.9
回3#	4.5582	3.06	7.9856	112.0

## 3 结论

(1)实验结果表明本研究方法精密度很高、回收率也较满意,适合酸豆奶和酸牛奶制品的测定,也适合营养口服液测定。

(2)与其它方法比较,该方法快速、准确、简单、适合批量测定。

(3)测定结果表明:一般酸牛奶和酸豆奶中乳酸含量最高,乙酸、甲酸和丙酸含量甚微。含有双歧杆菌的 Bb 发酵豆奶、ABY 发酵豆奶中除乳酸含量高外,乙酸含量也较高,甲酸和丙酸含量甚微。尽管生态口服液 A 中乙酸含量较生态口服液 B、C 高,但其甲酸也很高,对其营养价值须作进一步探讨。

## 参 考 文 献

- [1] 齐凤兰、杨志岩,1991.气相色谱分析啤酒中的有机酸.天津微生物,(1):50-53.
- [2] 宝福凯,1995.双歧杆菌研究现状和应用前景.生物学通报,30(12):17-18.
- [3] 清野 肇ら,1979.短鎖脂肪酸を含む油脂の脂肪酸組成のGC分析.油化学,28(2):35-40.
- [4] Catrienus de Jong and Herman, T. Baings, 1990. Determination of Free Fatty Acids in Milk and Cheese. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13:94-98.
- [5] Nobukop, Kawai *et al.*, 1985. Determination of Fatty Acid Composition of Food Containing Short Chain Fatty Acids. 油化学,34(11):21-25.

## DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS IN FERMENTED SOYBEAN MILK BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ding Zhuo-ping, Chen You-rong, Qi Feng-lan and Sun Xing-min

(*Shanghai Fisheries University, 200090*)

**ABSTRACT** Measurement of organic acids derived from metabolites of biologically nourishing species of bacteria in fermented soybean milk was studied in this paper. In gas-liquid chromatograph it is very necessary to pretreat the sample due to its high content in proteins and nonvolatile solubles. Firstly, for the pretreatment the precipitation of proteins in fermented soybean milk with diatomites was carried out. Moreover, as short-chain fatty acids and their esters are highly volatile and water soluble, it is rather difficult for measurement by gas-liquid chromatography. Therefore, a method of benzyl esterification was adapted in the experiment. The experimental results showed high precision and good recovery. In addition, organic acids in some tonic oral liquids and yogurts were also measured.

**KEYWORDS** fermented soybean milk, gas-liquid chromatography, organic acids, benzyl esterification