

乳制品中有机酸的 高效液相色谱测定法

引言

乳制品中存在有机酸,是由于乳脂的水解(脂肪酸)、作为酸味剂直接加入(例如柠檬酸、乳酸和丙酸)、正常的牛的生化代谢过程(例如柠檬酸、马尿酸、尿酸、乳清酸和抗坏血酸)或细菌生长的结果(例如丙酮酸、乳酸、醋酸和丙酸)。就营养上的原因来说,乳制品中这些酸的定量测定对风味研究是重要的,并作为细菌活动的一种指示物。

几位工作者报道了食品中有机酸测定的高效液相色谱法(HPLC)。Palmer和List应用一种特殊的前置注射器技术和差示折射计检测器的阴离子交换色谱法来定量果汁和酸化饮料中通常存在的15种食品酸类。Turkelson和Richards(1978)介绍了一种目前用于分析柠檬酸环状酸类(Cycle acids)的气-液色谱技术的极好摘要。此外,他们说明了一种测量食品(和尿)中有机酸的简易液相色谱法,这种方法是基于离子排斥和分配色谱为基础的,流出物用紫外检测器检测、用稀的无机酸做流动相。

考虑到简易性和HPLC固有的分析速度,乳制品中各种有机酸的研究用改良的Turkelson和Richards(1978)法进行。本文报道了全乳、酪乳、酸奶油、农家干酪、酸乳酪、Cheddar(英地名——译注)干酪和兰色干酪的典型分析结果。最后,介绍了一种满意质量和劣等质量的脱脂奶粉的比较分析作为实际应用例子。

实 验

装置和操作条件

用Varian5020型液相色谱仪。色谱仪配备一个手控的10微升狭孔注射器、一个Varichrom可变波长紫外/可见光检测器和一个绝热的色谱柱加热炉。色谱柱流出物在波长220和275nm、带宽8nm的检测器上检验。根据Varian9176型记录器测量的峰高定量。在流速0.7毫升/分钟和温度65℃下完成分析。

色谱柱

用长300mm×内径7.8mm的HPLC有机酸分析柱,柱内装有强阳离子交换树脂Aminex HPX-87(8%交联,9微米直径),通过离子排斥和分配色谱分离有机酸。

试剂

流动相为蒸馏水稀释试剂级硫酸制备的0.0090N-H₂SO₄。用分析纯有机酸做标准;在样品制备中用HPLC级乙腈做蛋白质变性

剂/溶剂。

校准与计算

包括广泛浓度范围的四种有机酸标准液是用贮备液配制的。这些标准液含有乳清酸、柠檬酸、丙酮酸、乳酸、尿酸、醋酸、丙酸、丁酸和马尿酸(准确的浓度见图1);在220nm注入双份10微升标准液进行测定。测得的峰高对浓度作图。这些曲线的斜率是各种酸的响应因子;线性相关系数和y-截距提供分析精密度的量度。以外标法为基础进行定量。

在上述色谱条件下,甲酸和尿酸恰好共同洗脱(保留时间RT=12.4分钟)。在50℃时分辨了色谱图上甲酸与尿酸的波峰,但导致较早洗提峰难以接受的分辨率。

分析样品可在两种波长上进行甲酸和尿酸的定量,不管它们是否共同洗提。制备这些含水标准物;10ppm尿酸、500ppm甲酸和10ppm

尿酸 + 500 ppm 甲酸。这些标准物以双份在 65℃, 220 和 275 nm 两个波长上进行色谱分析。所以, 下述计算法被用于确定两种酸在 220 nm 时的峰高:

$$\begin{aligned} (\text{未知物中尿酸的峰高})_{220} &= \frac{(\text{标准物中尿酸的峰高})_{220}}{(\text{标准物中尿酸的峰高})_{275}} \\ &\quad \times (\text{未知物中尿酸的峰高})_{275} \\ (\text{未知物中甲酸的峰高})_{220} &= (\text{未知物的总峰高})_{220} \\ &\quad - (\text{未知物中尿酸的峰高})_{220} \end{aligned}$$

当上述方法表明甲酸存在时, 乳制品中甲酸分析结果通过在 50℃ 再次用色谱法分来确证。

样品制备

购买和分析了全乳、酪乳、酸奶油、农家干酪、酸乳酪、cheddar 干酪和兰色干酪。对各种乳制品 (酪乳除外) 来说, 按下述程序制备样品: 5.00 克样品, 5.0 毫升蒸馏水和 20 毫升乙腈加至 50 毫升离心玻管中, 摇动 5 分钟,

在 7000 × G 离心 5 分钟。用 5 毫升注射器将上清液注入 10 微升狭孔中, 注射器与装有 0.2 μm 聚四氟乙烯滤膜的 Swinney 注射器滤器夹具相配合。酪乳样品制备使用同样的程序, 但样品为 10.0 克且不加蒸馏水。

除了上述乳制品外, 分析了两种脱脂奶粉。对于酪乳, 配成 20% (W/W) 水溶液并制备样品。

对全部样品进行的完全双份分析使平均偏差的计算成为可能, 平均偏差作为提取和色谱重现性的量度是有用的。

回收研究

为了确定试验的准确度, 评价了加至全乳中各种酸的回收。在添加已知量的酸之前和之后, 以双份分析了全乳。分析了加入两种不同浓度的酸; 进行了完全双份分析。

结 果 与 讨 论

标准色谱图

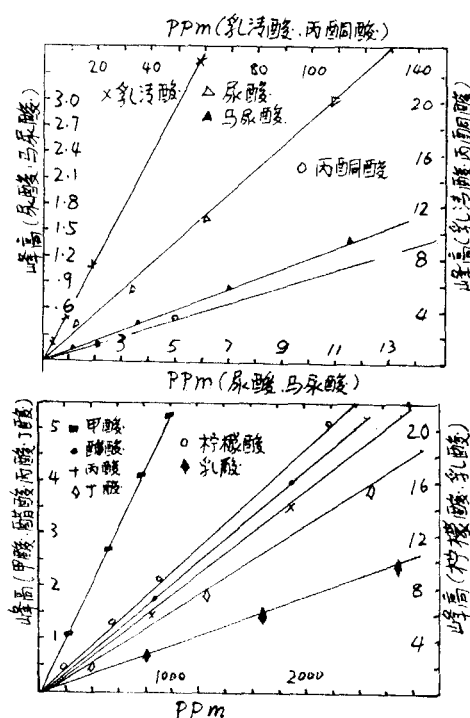


图 1 使用以下色谱条件的校准曲线: 注入 10 μl, 0.0090 N H₂SO₄ 流动相, 65℃, 在 220 nm UV 检测, 0.7 毫升/分流速。

为了确定各种酸的保留时间, 对各种酸的原始含水标准物分别进行色谱分析。然后, 用色谱法分析酸的混合溶液, 并改变色谱条件以获得峰的最大分辨率。改变洗脱液的 pH 和温度对通过 Aminex HPX-87 树脂的酒中的有机酸的分辨率的影响前已报道过 (Bio-Rad, 1979)。色谱条件的改变是以此项工作为基础进行的。最初的色谱法是在环境温度下和用 0.0045 N H₂SO₄ 作流动相完成的。在这些条件下, 柠檬酸与丙酮酸共同洗脱, 而马尿酸的保留时间过长 (超过 60 分钟)。在环境柱温下增加流动相的浓度至 0.0090 N H₂SO₄, 导致乳酸和柠檬酸的共同洗脱, 但缩短了马尿酸的保留时间。用 0.0090 N H₂SO₄ 流动相并提高柱温至 65℃, 分辨了乳酸、柠檬酸和丙酮酸, 容许较大的流速并进一步缩短马尿酸的保留时间。选择 0.0090 N H₂SO₄ 流动相和 65℃, 提供了乳制品中发现的有机酸令人满意的分辨率。

含有有机酸混合物的标准溶液的色谱图在图 2 中说明。在乳酸之前立即洗脱的较小的未

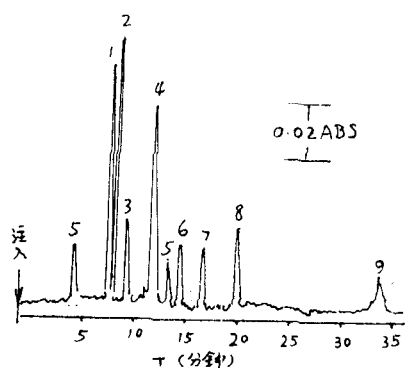


图2 一种含有下列酸的标准溶液色谱图：(1) 20.4 ppm 乳酸，(2) 10.00 ppm 柠檬酸，(3) 50 ppm 丙酮酸，(4) 16.80 ppm 乳酸，(5) 6.3 ppm 尿酸，(6) 80.0 ppm 醋酸，(7) 92.5 ppm 丙酸，(8) 12.30 ppm 丁酸，(9) 6.7 ppm 马尿酸。色谱条件同图1。

加分析的峰或许是乳酸异构物。它们存在于考虑作标准溶液用的四种不同的分析纯乳酸中。

标准校准曲线

标准曲线数据在表1中介绍，在酸的广阔范围内明显地显示极好的线性响应。此外，计算了容量因子 (K') 和灵敏度 (产生的峰高信号相当于检测器噪声两倍的酸的浓度)。

各种酸的实际校准曲线在图1中说明，对每一种酸校准标准作双份测定；作图的峰高值是平均值。双份测定的相对平均偏差，在各种情况下均低于2%。

对乳制品的典型分析结果和色谱图

对各种商业乳制品双份测定的典型结果和平均偏差在表2中介绍。对乳酸报导的结果

和Larson与Hegarty (1979) 报导的用比色技术测得的结果密切相符。

全乳、酸奶油、酸乳酪、Cheddar干酪和兰色干酪的典型色谱图在图3中说明。对所有色谱图来说，起始溶剂峰出现在4至6分钟之间，并起因于水、磷酸盐和其它未保留成分。在所有样品色谱图中，在约18分钟处出现的反峰，是由乙腈变性剂/溶剂引起的。在色谱图 (特别是在Cheddar干酪和兰色干酪样品) 中出现几个未鉴定的峰。除Cheddar干酪和兰色干酪外，在所有样品中，尿酸峰 (在大约12.4分钟洗脱) 有一个勉强可检测并在尿酸峰极大值之后洗脱的未鉴定的肩峰。当样品在275nm再次用色谱法分析时，此肩峰消失；它不是甲酸。在65℃遇到的尿酸与甲酸共同洗脱问题，可以通过在两种不同的检测器波长下进行色谱分析来克服。必要时，可以在50℃再次用色谱法分析，如前所述。仅仅降低柱温至50℃，而保持其它色谱条件不变，结果得到极好的分辨率 ($R=1.5$)。乳酸、甲酸、尿酸和醋酸的分辨率在50℃时是令人满意的。对乳酸、甲酸、尿酸和醋酸来说， K' 值分别是1.553, 1.745, 1.936和2.043。

在两种检测器波长下进行色谱分析的技术是有利的。它被用来定量鉴定样品色谱图中的乳酸和尿酸。乳酸和尿酸吸收220和275nm处的紫外线辐射。两种波长下的峰高比被用于各种酸的计算。同样，峰高比也用来计算样品

含水校准标准物的容量因子 (K')、灵敏度和校准曲线数据^a 表1

酸	K' ^b	灵敏度 ^c ($\mu\text{g/g}$)	校准曲线数据		
			响应因子, 斜率 ($\mu\text{g/g/ph}$)	Y-截距 ($\mu\text{g/g}$)	相关系数
乳酸	0.41	0.1	2.78	-0.40	0.9999
柠檬酸	0.56	4.0	110	1.62	0.9999
丙酮酸	0.74	0.6	15.9	-0.21	0.9999
乳酸	1.54	10.0	273.	8.03	0.9999
尿酸	1.70	0.1	3.70	0.01	0.9995
甲酸	1.70	6.6	185.	2.51	0.9991
醋酸	1.97	17.	453	7.06	0.9999
丙酸	2.50	19.	538	-0.36	0.9999
丁酸	3.27	22.	621	-0.16	0.9999
马尿酸	6.34	0.3	8.67	0.32	0.9998

a. 数据适用于下述色谱条件: 10 μl 注射, 0.0090 N H_2SO_4 流动相, $T=65^\circ\text{C}$, 紫外检测器220nm。

b. $K' = (t_r - t_m)/t_m$, 其中 t_r = 酸峰的保留时间, t_m = 未保留组份的保留时间。

c. 灵敏度 = $2N$ (N 为噪声—译注)。

典型商业乳制品的有机酸成分

表 2

乳制品	浓度, $\mu\text{g/g}$								
	乳酸	柠檬酸	丙酮酸	乳酸	尿酸	甲酸	醋酸	丙酸	马尿酸
全乳	83.6 ± 1.0	940 ± 40	< 4	< 60	21.8 ± 0.2	< 40	< 100	< 120	15.4 ± 0.9
酪乳	39.3 ± 1.2	60 ± 1	< 2	5890 ± 10	13.9 ± 0.6	110 ± 10	850 ± 10	< 60	< 1
酸奶油	48.6 ± 2.4	120 ± 0	< 4	4810 ± 160	18.8 ± 1.1	< 40	900 ± 30	180 ± 20	< 2
农家干酪	39.8 ± 0.5	430 ± 10	< 4	650 ± 10	11.1 ± 0.2	< 40	< 100	< 120	7.5 ± 0.4
酸乳酪	72.5 ± 2.5	710 ± 30	24 ± 0	14550 ± 150	11.8 ± 0.0	< 40	120 ± 20	< 120	< 2
Cheddar干酪	4.9 ± 0.2	25 ± 2	26 ± 2	5140 ± 40	16.7 ± 0.1	420 ± 40	600 ± 10	$?^b$	< 2
兰色干酪	7.3 ± 0.1	40 ± 2	27 ± 1	3080 ± 10	20.8 ± 0.4	420 ± 20	250 ± 20	$?^b$	< 2

a. 不精确代表完全双份测定的平均偏差。

b. 见正文说明。

有机酸加至均化牛乳中的回收研究

表 3

酸	在牛乳中的量 mg/l	试 验 1				试 验 2			
		加入 mg	总 计		回收 %	加入 mg	总 计		回收 %
			计算 mg	实测 mg			计算 mg	实测 mg	
乳清酸	81.8 ± 0.5	20.4	102.2	100.8 ± 1.9	98.6	61.3	141.3	132.6 ± 2.5	92.7
柠檬酸	1003 ± 27	990.2	1993	1973 ± 22	99.0	2971	3974	3905 ± 50	98.3
丙酮酸	< 4	47.1	47.1	45.2 ± 0.8	96.0	141.4	141.3	135.8 ± 1.4	96.0
乳酸	< 60	1623	1623	1595 ± 7	98.3	4869	4869	4772 ± 35	98.0
尿酸	22.3 ± 0.4	21.3	43.6	40.9 ± 1.2	93.8	64.0	86.3	82.2 ± 0.9	95.2
甲酸	< 40	666.0	666.0	659.0 ± 20	98.9	1998	1998	1994 ± 47	97.3
醋酸	< 100	1855	1855	1773 ± 19	95.6	5565	5565	5448 ± 62	97.9
丙酸	< 120	1957	1957	1893 ± 27	96.7	5871	5871	5572 ± 16	94.9
丁酸	< 140	1112	1112	964.1 ± 35	86.7	3336	3336	2816 ± 45	84.4
马尿酸	14.5 ± 0.6	20.9	35.4	32.0 ± 0.3	90.4	62.8	77.3	76.9 ± 0.1	99.5

色谱图中具有适当保留时间的峰高, 与标准的峰高比计算相似。

各个峰所表现的无特征的紫外分光行为被认为是 Cheddar 干酪和兰色干酪中的丙酸。当注入标准溶液时, 在220nm波长下于16.2分钟处观察到丙酸峰, 但在275nm没有引起检测器响应。这是对除了 Cheddar 干酪和兰色干酪外所报告的所有含丙酸的样品观察到的。就这些样品来说, 特征的丙酸峰是在220nm波长, 16.2分钟时观察到的, 但当在275nm再次用色谱法分析时并不消失。在两种波长下对16.2分钟峰检测器的响应接近同样的强度。这就认为此峰不是丙酸, 或者, 至少它们不完全是干酪中的丙酸。

对照和劣质脱脂奶粉有机酸含量的比较表 4

酸	$\mu\text{g/g}$	
	对照样品	"劣质"样品
乳清酸	47.9	45.7
柠檬酸	1630	1220
丙酮酸	25.0	44.8
乳酸	< 150	4320
尿酸	103	75.3
甲酸	< 100	< 100
醋酸	< 200	305
丙酸	497	2010
丁酸	< 300	< 300
马尿酸	85.2	42.7

在样品色谱图中观察到具有分子量比丙酸大的非脂肪酸。这无疑是由于用紫外检测法时检测器对这些酸的灵敏度差。正如表1所示,乳清酸、尿酸、马尿酸和丙酮酸在低浓度时容易定量。用10.00克样品和20毫升乙腈的样品制备程序连同100微升窄孔注射一直被用来提高表1中的灵敏度达20因子。这种技术可用于具有差的检测器灵敏度的酸的低浓度检测,包括乳酸、醋酸、丙酸和丁酸。

回收研究

加至全乳中的有机酸的回收率,除丁酸外,所有酸都超过90%。丁酸的平均回收率为85.6%。回收数据见表3。

脱脂奶粉——应用实例

测试了一种低热值的A级脱脂奶粉和一种类似的对照样品的灰分碱度,分别为170和39毫升1N HCl/100g粉。异常高的灰分碱度表示在干燥之前样品可能已经腐败和酸性的细菌代

谢物可能已被中和。可滴定酸度、溶解度指数结果和微生物学试验表明在两种样品中没有显著的差异。正如图4a和4b的比较以及表4中的分析数据所说明的那样,一定发生了过度的发酵。这正是怎样用HPLC分析作为解决问题的方法的一个实例。

抗坏血酸

似乎有可能用这种技术来定量乳制品中低含量的抗坏血酸。用220nm的检测器波长,25℃柱温和0.0090N H₂SO₄洗脱液可以检出1 ppm抗坏血酸水溶液的微升注射(RT约10.4分钟)。在牛奶中的抗坏血酸可能被检测之前,用H₂S前处理是必要的。通常用偏磷酸/醋酸提取液代替乙腈以沉淀蛋白质。抗坏血酸在升高柱温时不能导入,因为会发生化学降解。在柱温45℃时,损失约88%的抗坏血酸,而在65℃时损失达96%。

结 论

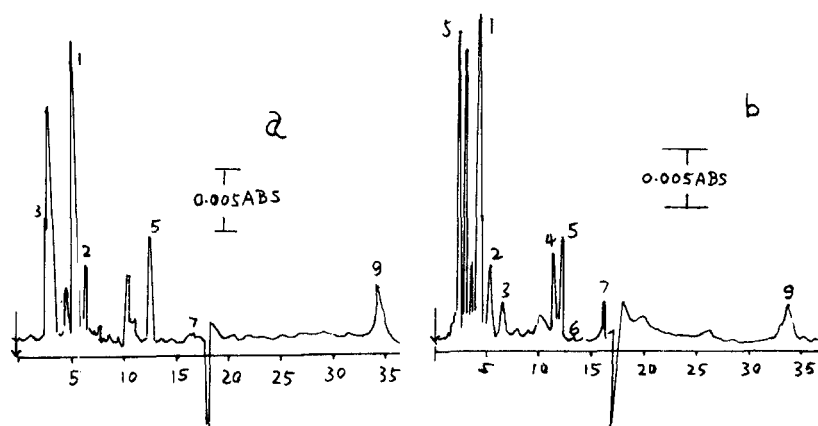


图3—正常(对照)(a)和劣质(b)脱脂奶粉的色谱图。色谱条件同图1。峰的号码对应于图2中的号码。

对检测来说,使用两种不同的UV波长,在最佳分析响应和辨别干扰方面是很重要的。此外,改变柱温和流动相的pH值被用来使分辨率

成为最佳。

Bio-Rad HPX-87柱一直用于分析在规定基础上贮藏8个月的乳制品样品。没有观察到

含油脂干食品脱氧剂的研究

陈政明、王家有、李忠华、石妈园

摘 要

本脱氧剂是以还原铁粉、填充剂、水和食盐为原料,目的是把含油脂干食品周围的空气中的氧气脱掉,从而防止含油脂干食品中的油脂酸败,使之能长期贮藏。现研制成的脱氧剂,其脱氧量为161.31毫升/克(标准状态下为145.82毫升/克),比日本市售的A、B、C、D型强得多,但低于E、F型。在国内属先进水平。本脱氧剂制作简单,成本费低(脱去5公升空气中的氧气只需1分钱),为实用提供了可能性。

× × × ×

一、前言

含油脂干食品中的油脂等易氧化组份,在其周围有空气的条件下,容易氧化变质,最为突出的是油脂酸败,这不仅影响口味,严重时可引起中毒,如日本曾发生多起因吃了油脂酸

败的速煮面而引起食物中毒。如何有效地防止油脂酸败一直是干食品贮存中的难题之一。为了防止干食品油脂酸败,已采用真空包装法,惰性气体置换法。但由于这二种方法在实际操作时都未能把食品周围的氧气较彻底地除去,据测定尚有4%以上的氧气残留着,而此氧气量已足以把食品氧化至不堪食用。因此,这些方法只能减慢氧化速度,其效果有一定限度。以后发展到使用抗氧化剂,但由于有些食物添加剂对人体的影响,正被限制使用。由此,近些年来人们渴望能研制出一种无毒、价廉、高效的脱氧剂,把放了含油脂干食品的密闭容器内的氧气较彻底地吸收掉,从而达到防止其氧化变质,延长保存期的目的。

许多国家已在这方面做了研究,例如为了除去用惰性气体置换空气后所残存的氧气,美国研究了防止食品氧化的脱氧袋,在惰性气体中加入一定量的氢气,氢在钯催化剂的作用下

分析的结果所证实。细菌活动降低了马尿酸的浓度,有时也降低了柠檬酸的浓度。

这种改进的Turkelson和Richards的HPLC法,对于以下述考虑为根据的乳制品中有机酸分析的研究是适当的:(a)每个样品所需的分析时间少于1小时;(b)可以检出低于0.01%的每种有机酸;(c)观察到在广泛范围内含水标准物的线性校准曲线;(d)表2中所有结果的相对标准偏差,用统筹方差计算得 $\pm 4.75\%$;(e)除丁酸外,观察到有机酸加至牛奶中的回收率对每一种有机酸来说都超过90%。

赖献桐摘译自 J. of Food Sci. 46(1981), 52-57。

分离本领的恶化。在用色谱法分析乳酸和柠檬酸标准液的早期尝试中,当用阴离子交换Micro Pak AX-10柱试验时是失败的。此外,曾观察到柠檬酸峰的极端非线性。分析是在环境温度下用 KH_2PO_4 水溶液做流动相进行的。评价了三种不同的Micro Pak AX-10柱。

HPLC法的一个可能有益的应用是通过定量细菌代谢物对微生物学研究提供支持数据。丙酮酸、乳酸、甲酸、醋酸和丙酸的生产容易用这种HPLC技术来控制。此外,几位工作者曾报道,乳清酸容易被乳制品发酵中使用的各种细菌所利用(Larson和Hegarty, 1979; Chen和Larson, 1971; Empie和Melachouris, 1977)。这种意见为本文介绍的各种培养乳制品有机酸