

高效液相色谱法测定酱油中的 5-羟甲基糠醛

王妙飞¹, 张水华¹, 郭新东², 杜志峰², 吴玉奎², 王永华¹

(1.华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

(2.国家加工食品质量监督检验中心(广州), 广东 广州 510110)

摘要: 采用高效液相色谱法测定酱油中 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 的含量。样品经乙酸乙酯提取后, 用 C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇-水 (体积比为 5:95) 为流动相, 在 UV 284 nm 波长条件下进行检测。该方法快速、准确, 在 0.5~20 mg/L 范围内线性相关系数为 $r^2=0.9992$, 平均回收率为 82.4%~86.9%, 相对标准偏差为 3.2%~5.1%。方法的最低检测浓度为 0.1 mg/L。

关键词: 酱油; 5-羟甲基糠醛; 高效液相色谱法

中图分类号: O658; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0188-03

Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Soy by HPLC

WANG Miao-fei¹, ZHANG Shui-hua¹, GUO Xin-dong², DU Zhi-feng², WU Yu-luan², WANG Yong-hua¹

(1.College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangzhou), Guangzhou 510100, China)

Abstract: A new method for the determination of 5-hydroxymethylfurfural by high performance liquid chromatography in soy was developed. After extracted by ethyl acetate, the samples were analyzed on a C₁₈ column at 284 nm using a mixture of methanol and water (5:95, v/v) as the mobile phase. Within the linear range of 0.5~20.0 mg/L, the method was fast and accurate with the average recoveries rate and relative standard deviation of 82.4%~86.9% and 3.2%~5.1%, respectively. The minimum determination limit was 0.1 mg/L.

Key words: soy; 5-hydroxymethylfurfural; high-performance liquid chromatographic(HPLC)

酱油俗称豉油, 主要由大豆、淀粉、小麦、食盐等原料经过制油、发酵等程序酿制而成。酱油的成分比较复杂, 除食盐外, 还有氨基酸、糖类、有机酸、色素及香料等成分, 而含糖的食品在加工和贮存过程中, 会发生糖的热降解反应和美拉德反应, 这两个反应都会产生 5-羟甲基糠醛 (5-HMF), 见图 1。

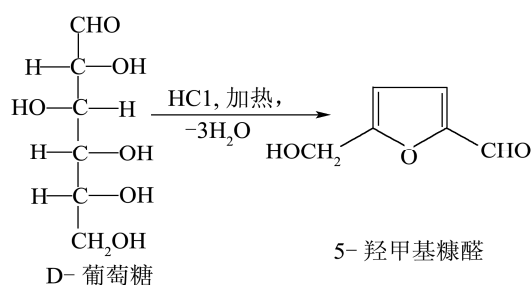


图 1 5-羟甲基糠醛的产生

Fig.1 The production of 5-HMF

反应所生成的 5-羟甲基糠醛对眼、黏膜、皮肤有刺激性, 过量食用会引起中毒, 造成动物横纹肌麻痹和内脏损害^[1]。

我国制定了蜂蜜中 5-羟甲基糠醛的限量要求^[2]反应所生成的 5-羟甲基糠醛对眼、黏膜、皮肤有刺激性, 过量食用会引起中毒, 造成动物横纹肌麻痹和内脏标准检测方法^[3], 而目前对于酱油中 5-羟甲基糠醛含量的检测尚未见报道。因而建立一种快速、方便、经济的检测方法, 有利于保障人们的消费安全。本文采用高效液相色谱法对 5-羟甲基糠醛进行定量测定, 建立一种快速分析酱油中 5-羟甲基糠醛的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

高效液相色谱仪: Agilent 1200 Series (二元液相泵, 在线脱气机, 自动进样器, 柱温箱, DAD 检测器); MS2 Minshaker 漩涡振荡器 (广州仪科实验室技术有限公司); 氮吹仪 (长沙中迅电子工程研究所)。5-羟甲基糠醛 (含量 99%, 美国 Sigma 公司), 其它试剂为国产分析纯试剂, 实验用水为去离子水。

1.2 标准溶液的配制

标准储备液: 准确称取 0.1000 g 5-羟甲基糠醛标准 (精确至 0.0001 g), 用少量甲醇溶解, 用水定容至 100 mL, 此标准溶液储备液的质量浓度为 1 000 mg/L。

收稿日期: 2007-11-02

作者简介: 王妙飞 (1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品分析及调味品科学。

1.3 HPLC分析

色谱柱: Diamonsil™ C¹⁸ 5 m, 150 mm×4.6 mm; 流动相: 甲醇:水=5:95 (V/V); 柱温: 30 ℃; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长: 284 nm; 进样体积: 20 μL。

1.4 实验方法

1.4.1 提取

准确移取 5 mL 样品置于离心管中, 加入 5 mL 乙酸乙酯在旋涡振荡器上充分涡动萃取 30 s 后, 置于离心机中于 3500 r/min 离心 3 min, 收集上层清液, 重复两次上述萃取操作, 合并上层清液, 置于 40 ℃ 水浴中用氮气吹干, 用流动相定容至 1 mL。

1.4.2 回收率及精密度实验

在样品中准确加入一定量的标准溶液, 摇匀, 提取步骤同 1.4.1, 检测方法见 1.3。重复上述实验 6 次, 测定方法的回收率和精密度。

2 结果与讨论

2.1 提取方法的选择

由于 5-羟甲基糠醛为小分子化合物, 不容易采用固相萃取小柱净化, 本试验分别选取乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷三种有机溶剂提取酱油中的 5-羟甲基糠醛。结果如表 1 所示, 二氯甲烷提取的回收率最低, 只有 74.1%; 而用乙酸乙酯和乙腈提取的回收率相差不大, 但是由于乙腈毒性大, 容易造成环境污染, 且价格昂贵, 本实验选取了乙酸乙酯作为提取溶剂。

表 1 不同有机溶剂对 5-羟甲基糠醛提取效果的影响

5-hydroxymethylfurfural	
溶剂	回收率/%
二氯甲烷	74.1
乙酸乙酯	88.8
乙腈	87.9

2.2 检测波长的确定

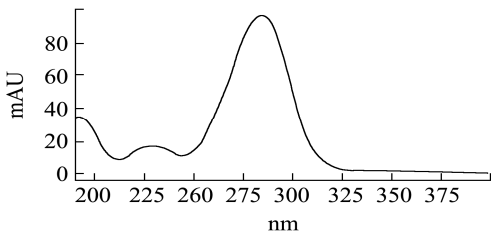


图 1 紫外吸收光谱图

Fig.1 UV-spectrogram of 5-hydroxymethylfurfural

取 5-羟甲基糠醛标准溶液, 在 200~400 nm 的波

长范围进行紫外光谱扫描 (图 1), 从光谱图中可以看出, 5-羟甲基糠醛的最大吸收波长为 284 nm, 故选择 284 nm 作为定量检测波长。

2.3 流动相的选择

本实验分别选取了乙腈-水、乙腈-0.02 mol/L 乙酸胺溶液、甲醇-水、甲醇-0.02 mol/L 乙酸胺溶液作为流动相。当选择乙腈作为流动相中的有机相时, 虽然 5-羟甲基糠醛的峰形较好, 但是出峰太快, 易受样品中其它杂质的干扰。所以最终确定的流动相为甲醇-水 (V/V=5/95), 分离色谱图见图 2。

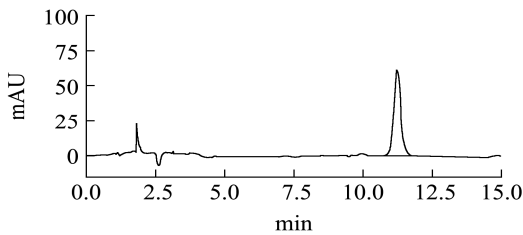


图 2 5-羟甲基糠醛的标准色谱图

Fig.2 HPLC-chromatogram of 5-hydroxymethylfurfural

2.4 方法的线性关系

配制 6 个不同浓度的标准溶液, 分别为 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 5.0 mg/L, 10.0 mg/L, 20.0 mg/L, 在上述条件下进行色谱测定, 以质量浓度 (x, mg/L) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标作图可得一标准曲线 (图 3)。经最小二乘法计算, 得 5-羟甲基糠醛的回归方程为: $y=66.262x-9.5294$, 相关系数为 $r^2=0.9992$; 5-羟甲基糠醛浓度在 0.5~20 mg/L 范围内与峰面积具有良好的相关性。

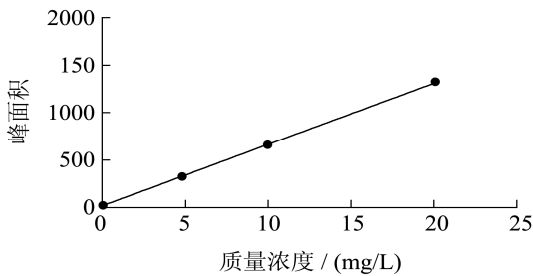


图 3 5-羟甲基糠醛检测标准曲线

Fig.3 Standard curve of 5-hydroxymethylfurfural

2.5 方法的准确度及精密度

采用质量分数添加回收率来表示本方法的准确度和精密度, 在不含 5-羟甲基糠醛的样品中, 添加已知含量的 5-羟甲基糠醛标准溶液, 按照上述规定的色谱操作条件测定其含量, 计算其回收率及变异系数, 结果见表 2。

表 2 5-羟甲基糠醛添加回收率和相对标准偏差

Table 2 Recovery and RSD of 5-hydroxymethylfurfural								
添加量 (mg/L)	回收率/%						平均回收率	相对标准偏差
	1	2	3	4	5	6	/%	/%
5	84.3	81.4	89.2	86.1	77.8	75.7	82.4	5.1
10	87.8	84.6	78.4	82.3	79.7	89.7	83.8	4.5
50	91.2	87.9	83.9	85.3	89.8	83.3	86.9	3.2

由表 2 可知,本方法测定的酱油中的 5-羟甲基糠醛的回收率为 82.4%~86.9%,变异系数为 3.2%~5.1%,对实际酱油样品中 5-羟甲基糠醛的最低检出浓度为 0.1 mg/L。因此,利用本方法进行酱油中的 5-羟甲基糠醛的分离和含量测定,灵敏度高,重现性好,能为酱油生产和市场检测提供可靠的依据。

2.6 实际样品的测定

表 3 酱油中 5-羟甲基糠醛的浓度 (mg/L)

Table 3 Concentration of 5-hydroxymethylfurfural in soy						
样品名称	鲜味生 抽	生抽 王	草菇老 抽	老抽王	美味鲜酱 油	美味老抽 王
5-羟甲基 糠醛的含 量 (mg/L)	--	0.89	47.56	13.09	--	7.30

注:表中“--”为未检出。

应用本法对 6 种市售酱油进行测定(表 3)。结果表明,老抽中普遍存在较高含量的 5-羟甲基糠醛,而在大部分的生抽中未检出。

3 结论

本方法采用乙酸乙酯提取,高效液相色谱法测定酱油样品中 5-羟甲基糠醛的含量,回收率为 82.4%~86.9%,最低检出浓度为 0.1 mg/L。目前国家尚未制订酱油中 5-羟甲基糠醛含量的检测方法,因而本方法的建立可以为标准方法的建立提供一个有力的参考。

参考文献

[1] 侯平然,刘佐才,方贞华,等.转化糖浆中 5-羟甲基糠醛的形成[J]. 冷饮与速冻食品工业,2001,7(1):1-3

[2] 中华人民共和国国家标准. GB/T 18796-2002 蜂蜜[S].中国标准出版社,2002

[3] 中华人民共和国国家标准. GB/T 18932.18-2003 蜂蜜中羟甲基糠醛含量得测定方法液相色谱—紫外检测法[S].中国标准出版社,2003

(上接第 179 页)

面粉中添加剂连二亚硫酸钠的有效方法。其特点是考虑了面粉中硫元素的本底,在扣除面粉中硫元素的本底含量后,提高了检测方法的准确性,快速,简单,有利于促进对面粉中添加剂连二亚硫酸钠进行有效的检测和监管。

参考文献

[1] 刘光启,马连湘,刘杰.化学化工物性数据手册[M].北京:化学工业出版社,2002

[2] 孙平.食品添加剂使用标准[M].北京:化学工业出版社,2004

[3] 中华人民共和国食品卫生法[S].

[4] 孙占怀.连二亚硫酸钠不是“保鲜粉”[J].化学教育, 2006, (4):1-2

[5] 周大卫,杨彦丽,林立,等.食品中硫元素检测方法的研究现状[J].粮油加工,待发表

[6] 陈华奇,吊白块-一种有毒的“食品添加剂”[J].中学化学教学参考.2002.225(5):64

[7] 田纪春.禁用面粉增白剂后保证中国传统面食品色泽品质的对策[J].麦类作物学报,2007,27(2):364-367

[8] 周大卫,杨彦丽,林立,等.面粉中硫含量的本底测定[J].中国粮油学报.待发表

[9] 孙继红,周大卫,曹宝森.面粉中本底硫含量的检测方法[P].中国发明专利,申请号:200710118757.0(2007)

[10] 孙继红,周大卫,曹宝森.面粉中连二亚硫酸钠的检测方法[P].中国发明专利,申请号:200710118758.5(2007)

[11] 韩占江,王伟华.硫对小麦产量和品质影响的研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(7):1409-1410

[12] 黄庭刚,蒋清民,张宝林.高锰酸钾氧化玉米淀粉过程研究[J].河南化工,2006,23(11):26-28