

老抽类酿造酱油中防腐剂检测及前处理方法改进

刘琳^{1*}, 徐丽¹, 郝鹏飞¹, 张雪琰¹, 张丽², 吕宁¹, 徐琴¹

(1. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心食品农产品检测中心, 青岛 266002;

2. 临沂出入境检验检疫局综合技术服务中心, 临沂 276034)

摘要: **目的** 优选和改进老抽类酿造酱油中防腐剂检测的前处理方法, 解决高蛋白、高粘稠、高色浓度类样品前处理干扰大的问题。 **方法** 对老抽类酿造酱油进行沉淀剂的优选和前处理的优化, 选择无水乙醇为沉淀剂。取均匀样品 5.0 g, 加入 10.0 mL 无水乙醇, 混匀后再加入水定容至 25 mL, 离心过滤, 采用高效液相色谱仪检测。 **结果** 对老抽类酿造酱油的前处理方法进行优化, 能有效地去除干扰物质。此方法有良好的线性, 在 1.0~500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, R^2 在 0.9999 以上, 添加回收率为 101%~108% 之间, 精密度为 0.58%~2.70%, 具有较好的精密度和重现性。 **结论** 该方法快速、简便、高效, 有效地解决了老抽类酿造酱油色浓、粘稠度高、干扰多等问题, 对高蛋白、高粘稠、高色浓度类样品前处理有借鉴作用。

关键词: 老抽类酿造酱油; 前处理; 防腐剂; 高效液相色谱法

Determination of preservative and pretreatment method improved in brewing soy sauce

LIU Lin^{1*}, XU Li¹, HAO Peng-Fei¹, ZHANG Xue-Yan¹, ZHANG Li², LV Ning¹, XU Qin¹

(1. Food and Agriculture Products Testing Agency, Technical center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 2. Comprehensive Technical Service Center for Linyi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Linyi, 276034, China)

ABSTRACT: Objective To improve the pretreatment method for preservative detection in brewing soy sauce, the interference problems of samples with high protein, high viscosity and high color concentration were solved. **Methods** Precipitating agent was preferred and pretreatment was optimized in brewing soy sauce, anhydrous ethanol was chosen as the precipitant. The sample was taken for 5 g, and was added 10 mL of anhydrous alcohol and mixing, and was added water to 25 mL, then by centrifugal filter, and then detected by the high performance liquid chromatography. **Results** The optimized pretreatment methods of brewing soy sauce could effectively remove the interfering substances. This method had a good linear relationship in the range of 1.0~500 $\mu\text{g/mL}$ with R^2 more than 0.9999, the adding recovery rate was between 101%~108%, the precision was 0.58%~2.70%, which showed the method had a good precision and reproducibility. **Conclusion** The method is rapid, simple, efficient, and effective to solve the problem of thick color, high viscosity, and many interference of brewing soy sauce. It offered reference for sample pretreatment with high protein, high viscosity and high color concentration.

KEY WORDS: brewing soy sauce; pretreatment; preservative; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 刘琳, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: liuqf53@126.com

*Corresponding author: LIU Lin, Engineer, Food and Agriculture Inspection Center, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China. E-mail: liuqf53@126.com

1 引言

酱油是人们日常生活中非常重要的调味剂之一,我国是酱油生产起源最早的国家,早在周朝人们就已开始经过发酵制作酱类,形成了酿造酱油的雏形。酿造酱油是以大豆或豆粕等植物蛋白质为主要原料,并辅以面粉、小麦粉等淀粉质原料,经微生物发酵作用,成为一种含有多种氨基酸、多肽、还原糖等营养物质,具有特殊体态的调味品。常见的酿造酱油主要有生抽、老抽、普通酿造酱油等,由于对色、香、味不同的追求,以满足不同层次的消费要求,不同的酿造酱油又添加了特殊辅料。老抽就是在生抽中加入焦糖色素、香菇等调味剂发酵制成,所以较浓稠。

随着老抽酱油更多特殊辅料的添加,在营养增多、酱油浓稠增大的同时,酱油成分及添加剂检测的干扰也越来越多,对检测前处理提出了进一步的挑战。早先广泛使用的酱油前处理方法在老抽类酱油检测上已不能完全满足,所以本实验将对老抽类酱油前处理检测方法进行优化,提高检测准确度和灵敏度,使优化后方法能够满足老抽类酱油及相似性质样品检测需求。

2 材料与方法

2.1 试剂与标准品

苯甲酸、山梨酸(国家标物中心),纯度均>99.5%;无水乙醇(国药集团,分析纯);0.02 mol/L 乙酸铵(国药集团,分析纯);甲醇(色谱纯);22%乙酸锌(纯度99.0% 天津市化学试剂三厂,分析纯);10.6%亚铁氰化钾(纯度99.5% 医药集团上海化学试剂公司,分析纯);试验用水 Millipore 超纯水。

2.2 仪器与设备

1260 HPLC(美国 Agilent 公司)配二极管阵列检测器;Waters Symmetryshield (3.5 μm , 4.6 mm *150 mm),美国 Waters 公司);PL602-S 天平(Mettler-Toledo 公司);MILLI-Q 纯水仪(Millipore 公司);MS 3 basic

混匀器(美国 IKA 公司);CR22G 离心机(日本 HITACHI);移液枪(10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 5000 μL , Eppendorf 公司);0.22 μm 、0.45 μm 滤膜(德国 Membrana 公司);

2.3 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetryshield (3.5 μm , 4.6 mm \times 150 mm),美国 Waters 公司;流动相 $v(\text{甲醇}):v(0.02 \text{ mol/L 乙酸铵})=20:80$;流速:1.2 mL/min;检测波长:230 nm;进样量:20 μL ;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;外标法定量。

2.4 标准溶液配置

分别取适量苯甲酸、山梨酸标准品,配成标准储备液及标准系列溶液,待用。标准储备液浓度及标准系列溶液浓度如表 1

2.5 样品前处理

称取均匀的待测样品 5.0 g(精确至 1.0 mg)入 25 mL 离心管中,加入 10.0 mL 无水乙醇,在振荡器上混合均匀,加入水定容至 25 mL,放入离心机中 5000 r/min,离心 5 min,取离心后上清液,过 0.22 μm 针头滤膜,入进样小瓶中待测。

3 结果与讨论

3.1 沉淀剂的选择

苯甲酸、山梨酸这 2 种防腐剂易溶于水和乙醇,本实验分别选择乙酸锌+亚铁氰化钾混合沉淀剂、无水乙醇、无水乙醇+乙酸锌+亚铁氰化钾混合沉淀剂进行试验比较,这 3 种沉淀剂是沉淀蛋白、脂肪经常使用的。比较结果如表 2。

由上表可以看出,对于先前方法常用的乙酸锌+亚铁氰化钾混合沉淀剂在老抽类酱油上蛋白沉淀效果良好,但是上清液呈深棕褐色,澄清度很差,而且很粘稠,很难通过 0.22 μm 、甚至 0.45 μm 的滤膜,给老抽前处理带来很大的困难,总体沉淀效果不理想。当加入乙酸锌+亚铁氰化钾混合沉淀剂沉淀完全后,再加入无水乙醇,混匀离心后,上层清液呈棕褐色澄

表 1 标准储备液浓度及标准系列溶液浓度

Table 1 Standard stock solution concentration and a series of standard solution concentration

名称	储备液浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	标准系列浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$									
苯甲酸	1000	1	5	10	20	30	50	100	300	500	
山梨酸	1000	1	5	10	20	30	50	100	300	500	

表 2 不同沉淀剂沉淀效果对比表
Table 2 Comparison of the effects of different precipitant precipitation

沉淀剂名称	沉淀效果		
	蛋白质沉淀效果	澄清度	沉淀后上清液过滤难易程度
乙酸锌+亚铁氰化钾混合沉淀剂	好	差	差
乙酸锌+亚铁氰化钾混合沉淀剂+无水乙醇	好	差	好
无水乙醇	好	好	好

清状, 粘稠度较低, 可通过 0.22 μm 的滤膜, 沉淀效果好。当无水乙醇加入到老抽酱油中后, 老抽酱油立刻沉淀, 混匀离心后, 上层清液呈淡黄色澄清状, 粘稠度低, 很顺利通过 0.22 μm 的滤膜, 沉淀效果非常好。综合上述, 在老抽检验中, 最简便、沉淀效果最好的沉淀剂为无水乙醇, 所以本实验选无水乙醇为沉淀剂。

3.2 前处理方法的选择

老抽类酿造酱油发酵过程中加入了大量焦糖色素和香菇等营养调味物质, 导致颜色深, 粘稠度高, 分析干扰大等特点, 本实验选择了 3 种方法进行实验, 实验如下:

(1) 样品只用无水乙醇定容

样品只用无水乙醇沉淀定容, 沉淀效果好, 上清液澄清, 粘稠度低, 而且很容易过滤膜, 对上清液过滤进行分析, 如图 1

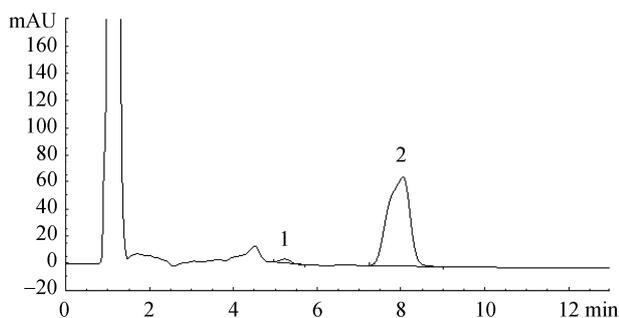


图 1 (1) 方法谱图

Fig. 1 (1) Chromatogram
(1, 苯甲酸 2, 山梨酸)
(1. Benzoic acid 2. Sorbic acid)

从图 1 可以看出, 目标峰有肩峰且峰形很差, 不能使用此前处理方法。

(2) 样品加入 10 mL 无水乙醇, 与样品混合均匀, 用水定容至 25 mL, 离心, 过滤上清液进行分析, 如图 2。从图 2 可以看出, 干扰物质少, 目标峰可以完全分离, 回收率较高。但是在做样的过程中, 当加入

水时, 由于老抽中的焦糖色素易溶于水, 加入水后, 沉淀物中的焦糖色素会有部分溶解到上清液中, 上清液会由淡黄色变成浅棕色, 但是由分析图可以看出, 对目标物的分析影响很小, 可以忽略。

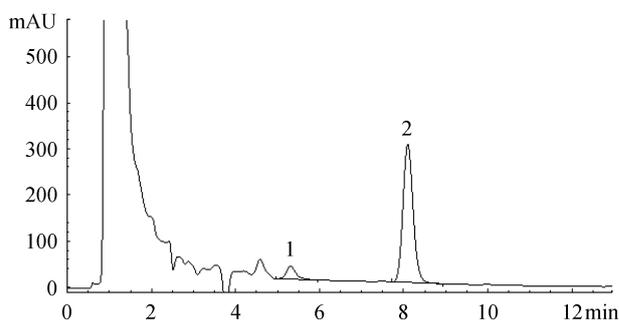


图 2 (2) 方法谱图

Fig. 2 (2) Chromatogram
(1, 苯甲酸 2, 山梨酸)
(1. Benzoic acid 2. Sorbic acid)

(3) 样品加入 10 mL 无水乙醇, 与样品混合均匀, 离心, 取上清液 4 mL 入另一个 15 mL 离心管中, 用水定容到 10 mL, 混匀, 过滤进行分析。为了防止沉淀中的焦糖色素复溶, 把上清液取出后, 再加水稀释。结果显示分析效果峰形等与(2)效果相似, 回收率较(2)低。前处理效果如图 3。



图 3 前处理效果图

Fig. 3 The picture of pretreatment effect
(从左到右分别为加入乙酸锌+亚铁氰化钾混合沉淀剂、
(1)、(2)效果图)
(From left to right is Zinc acetate + Potassium ferrocyanide mixture precipitator, 2.1, 2.2)

综上所述,综合了分析效果和前处理方法的繁琐程度,本实验选择无水乙醇加水定容方法进行前处理。

3.3 线性范围、检出限、精密度和重现性

以 3.1、3.2 选择的前处理条件检测 5 种老抽中苯甲酸、山梨酸,结果如表 3

老抽营养丰富,富含大量的蛋白质等物质极易变质,为了增长保质期,所以会加入防腐剂。由表 3 可以看出,试验的老抽样品中加入了大量的防腐剂,

而且不同老抽防腐剂含量差距加大,所以需要高适用度的曲线。

由表 4 可以看出,方法的线性范围大,线性系数高,灵敏度高。

对老抽中苯甲酸、山梨酸进行添加回收验证,如表 5

由表 5 可以看出,回收率在在 101%~108%之间,此前处理方法回收率较好。

由表 6 看出,相对偏差在 0.58%~2.70%之间,样品的精密度很高,重现性好。

表 3 5 种老抽苯甲酸、山梨酸检出情况表
Table 3 Result of benzoic acid and sorbic acid in 5 kinds of soy sauce

项目	老抽 1	老抽 2	老抽 3	老抽 4	老抽 5
苯甲酸含量/mg·kg ⁻¹	38	622	700	ND	ND
山梨酸含量/mg·kg ⁻¹	383	ND	ND	376	463

表 4 2 种防腐剂线性方程
Table 4 The linearity of 2 kinds of preservatives

名称	曲线方程	相关系数	线性范围/mg·mL ⁻¹	检出限/mg·mL ⁻¹
苯甲酸	$Y=63.04484X+7.1294145$	0.99999	0.126~500	0.126
山梨酸	$Y=70.8928X+27.524519$	0.99995	0.152~500	0.152

表 5 老抽样品中苯甲酸、山梨酸回收率
Table 5 The recovery rate of Benzoic acid and sorbic acid in soy sauce samples

名称	添加量/mg·kg ⁻¹	实测值/%	回收率/%
苯甲酸	50	52.30	104.59
	100	108.86	108.86
	200	211.39	105.69
山梨酸	50	53.67	107.34
	100	101.32	101.32
	200	216.99	108.50

表 6 老抽样品中苯甲酸、山梨酸的精密度(n=6)
Table 6 The precision of benzoic acid and sorbic acid in Soy sauce samples (n=6)

名称	本底含量/mg·kg ⁻¹	添加量/mg·kg ⁻¹	实测值/mg·kg ⁻¹						平均回收率/%	相对标准偏差/%
			1	2	3	4	5	6		
苯甲酸	ND	50	52.61	52.55	51.15	52.85	52.46	52.15	104.59	1.16
		100	108.64	108.97	109.31	108.32	109.81	108.13	108.86	0.58
		200	214.69	208.76	213.10	209.63	212.93	209.21	105.69	1.18
山梨酸	423.09	50	478.08	476.54	477.92	476.67	477.25	474.09	107.34	2.70
		100	523.67	524.09	525.81	524.98	524.48	523.40	101.32	0.88
		200	639.92	639.98	642.28	634.32	639.37	644.62	108.50	1.59

4 结 论

本实验对老抽类酿造酱油进行了沉淀剂比较和前处理的优化, 解决了老抽类酿造酱油色浓、粘稠度高、干扰多等问题, 得到了良好的回收率、精密度和重现性。结果表明: 此方法能够适合老抽类酿造酱油的检测分析条件, 有效地提高了前处理效率和准确度, 对高蛋白、高粘稠、高色浓度类样品前处理有借鉴作用。

参考文献

- [1] GB/T 5009.29-2003 食品中苯甲酸、山梨酸的测定[S].
GB/T 5009.29-2003 The determination of Benzoic acid and sorbic acid in foods [S].
- [2] GB/T 23495-2009 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定 高效液相色谱法[S].
GB/T 23495-2009 The determination of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in food by HPLC[S].
- [3] GB 21703-2010 食品安全国家标准 乳和乳制品中苯甲酸和山梨酸的测定[S].
GB 21703-2010 The determination of benzoic acid and sorbic acid in milk and dairy products Food safety national standards[S].
- [4] GB/T 22325-2008 小麦粉中过氧化苯甲酰的测定 高效液相色谱法[S].
GB/T 22325-2008 The determination of Benzoylperoxide in wheat flour by high performance liquid chromatography[S].
- [5] 王刚, 王文平, 梁桂娟. 高效液相色谱法测定酱油及食醋的苯甲酸和山梨酸[J]. 中国酿造, 2012, 31(6): 182-184
Wang G, Wang WP, Liang GJ. Determination of benzoic acid and sorbic acid in soy sauce and vinegar by high performance liquid chromatography [J]. China Brewing, 2012, 31(6): 182-184
- [6] 陈俊, 周路明. 亚铁氰化钾-乙酸锌在 HPLC 测定酱油中防腐剂的应用[J]. 中国调味品, 2007(10): 72-74
Chen J, Zhou LM. Potassium hexacyanoferrate-Zinc acetate is used in preservative of sauce by HPLC [J]. China Condiment, 2007(10): 72-74
- [7] 王新运, 万新军, 程乐华, 等. 高效液相色谱法同时测定酱油中的苯甲酸和山梨酸[J]. 应用化学, 2010, 39(9): 1413-1418
Wang XY, Wan XJ, Cheng LH, *et al.* Study on simultaneous determination of benzoic acid and sorbic acid in soy by HPLC[J]. Appl Chem Ind, 2010, 39(9): 1413-1418
- [8] 李洋, 陈学宏, 谭睿. 蛋黄派中苯甲酸高效液相色谱检测方法研究[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(6): 69-71
LI Yang, CHEN Xue-hong, TAN Rui. Determination of Benzoic Acid in Yolk Pie by HPLC [J]. Sichuan Food Ferment, 2009, 45(6): 69-71
- [9] 赵笑虹, 李秋荣, 刘浩. 酱油中防腐剂山梨酸和苯甲酸的气相色谱快速分析方法[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(2): 111-112
Zhao XH, Li QR, Liu H. Quick detection of sorbic acid and benzoic acid in soy by gas chromatography [J]. Guangzhou Food Sci Technol, 2004, 20(2): 111-112
- [10] 牛波, 邹清华. 气相色谱法测定酱油中山梨酸和苯甲酸的含量[J]. 中国医药指南, 2011, 9(12): 218-219.
Niu B, Zou QH. Detection of sorbic acid and benzoic acid in soy by gas chromatography [J]. Guide China Med, 2011, 9(12): 218-219.
- [11] 董春洲, 吴萍. 固相微萃取气相色谱法测定饮料中山梨酸和苯甲酸[J]. 化学分析计量, 2012, 21(6): 23-25.
Dong CZ, Wu P. Determination of sorbic and benzoic acid in beverages by solid-phase microextraction and gas chromatography [J]. Chem Anal Meter, 2012, 21(6): 23-25.
- [12] 张卫佳, 蒋其斌, 夏天兰. 高效液相色谱法测定食醋中的苯甲酸和山梨酸[J]. 生命科学仪器, 2007, 5(10): 37-38.
Zhang WJ, Jiang QB, Xia TL. Determination of benzoic acid and sorbic acid in vinegar by high performance liquid chromatography [J]. Life Sci Instrum, 2007, 5(10): 37-38.
- [13] 周茶, 舒畅, 敖宗华, 等. 高效液相色谱法快速测定食醋中的苯甲酸和山梨酸[J]. 中国调味品, 2007, (2): 59-62.
Zhou T, Shu C, Ao ZH, *et al.* Determination of benzoic acid and sorbic acid in vinegar by HPLC [J]. China Condiment, 2007, (2): 59-62.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



刘 琳, 工程师, 硕士研究生, 主要研究方向为食品检测。
E-mail: liuqf53@126.com