

气相色谱法测定食用酵素产品中乙醇含量

商健^{1,2*}, 刘锋军^{1,2}, 尚琪^{1,2}, 雷超^{1,2}, 朱蕊贞^{1,2}

(1. 渭南市检验检测研究院产品质量监督检验中心, 渭南 714000;

2. 陕西省发酵产品质量监督检验中心, 渭南 714000)

摘要: **目的** 建立气相色谱法测定食用酵素产品中乙醇含量, 为完善酵素检测方法标准提供技术支持。**方法** 称取 2 g 食用酵素产品, 加入超纯水定容至 20 mL, 涡旋混匀 1 min, 以 8000 r/min 离心 5 min, 经 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。**结果** 乙醇含量的保留时间为 7.765 min, 在 0.2~6.0 g/L 范围内线性关系良好, 相关系数为 1.0000; 对 10 种酵素样品重复测定 5 次, 所得相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)在 0.02%~1.46%之间, 3 个平行样品在 0.0024、0.2000、5.0000 g/L 的添加水平下回收率在 95.5%~102.5%之间。方法的检出限低至 2.4 mg/L。采用该法分析 10 种食用酵素产品中的乙醇含量, 结果表明, 60%的酵素产品中乙醇含量>0.5 g/100 g, 超出 QB/T 5323—2018《植物酵素》的要求。**结论** 该法简便快捷、精密度和准确度高, 适用于食用酵素产品中乙醇含量的测定。

关键词: 乙醇; 食用酵素; 气相色谱法

Determination of ethanol content in edible Jiaosu products by gas chromatography

SHANG Jian^{1,2*}, LIU Feng-Jun^{1,2}, SHANG Qi^{1,2}, LEI Chao^{1,2}, ZHU Rui-Zhen^{1,2}

(1. Weinan Institute of Inspection and Testing Product Quality Supervision and Inspection Center, Weinan 714000, China;

2. Shaanxi Provincial Supervision and Inspection Center for Fermented Product Quality, Weinan 714000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of ethanol content in edible Jiaosu products by gas chromatography, and provide technical support for improving the standards of Jiaosu detection methods. **Methods** Two grams of edible Jiaosu product was weighed, fixed in volume to 20 mL by adding ultra pure water, vortex mixed for 1 min, centrifuged at 8000 r/min for 5 min, and filtered through a 0.22 μm filter membrane before being measured on the computer. **Results** The retention time of ethanol was 7.765 min, and the linear relationship was good within the range of 0.2–6.0 g/L, with the correlation coefficient of 1.0000; the determination of the 10 kinds of Jiaosu samples was repeated 5 times, and the obtained relative standard deviations (RSDs) were within 0.02%–1.46%, the recoveries of the 3 parallel samples at the addition levels of 0.0024, 0.2000 and 5.0000 g/L were within 95.5%–102.5%. The limit of detection for the method was as low as 2.4 mg/L. The method was applied to analyze the ethanol content in 10 kinds of edible Jiaosu products, the results showed that the ethanol content in 60% Jiaosu products was more than 0.5 g/100 g, which exceeded the requirements of QB/T 5323—2018 *Plant Jiaosu*. **Conclusion** This method is simple, rapid, precise and accurate, and is suitable for the determination of ethanol

基金项目: 2020 年渭南市“特支计划”项目(2019-FWNL-RKX-2)

Fund: Supported by the Weinan City "Special Support Plan" Project in 2020 (2019-FWNL-RKX-2)

*通信作者: 商健, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品及化工产品质量与安全。E-mail: 2296163184@qq.com

*Corresponding author: SHANG Jian, Master, Engineer, Weinan Institute of Inspection and Testing Product Quality Supervision and Inspection Center, No.38, Chaoyang Road, Weinan 714000, China. E-mail: 2296163184@qq.com

content in edible Jiaosu products.

KEY WORDS: ethanol; edible Jiaosu products; gas chromatography

0 引言

“酵素”起源于日本^[1-2],是以动植物、菌类等为原料,经微生物发酵技术制得的功能性产品,目前酵素已被应用于环保、日化、饲用和农用等,其中包括富含酶、益生菌、矿物质和特定的生物活性成分的食用酵素产品。食用酵素是有益菌通过新陈代谢发生一系列生化反应合成的具有多种生物活性的功能性发酵食品,发酵过程的参与使其在保留原料本身营养成分的同时还产生了新的活性成分,不仅可以改善产品风味,更能带来益生保健的功效。近年来随着健康饮食观念的普及,食用酵素产品也开始在我国受到广泛关注^[3]。食用酵素产品数量的逐年增长,吸引国内专家学者对该领域开展研究,其中食用酵素中各组分含量的检测方法标准成为亟待解决的问题。为建立规范的食用酵素体系,确立科学的食用酵素认知标准,中国生物发酵产业协会在T/CBFIA 08001—2016《酵素产品分类导则》中将食用酵素定义为以动物、植物和食用菌等为原料,经微生物发酵制得的含有特定生物活性成分的可食用的酵素产品。现有的相关文献显示,食用酵素类产品的功效与其所含活性物质息息相关,其中糖类、有机酸、脂肪酸、多酚类、氨基酸类、维生素类等含量较为丰富^[4-9]。近年来保健类食用酵素产品与日俱增,其具有美白抗衰老、改善肠胃功能、抗氧化、抗肿瘤和提高机体免疫力^[10-15]等功效。乙醇是酵素无氧发酵过程中生成的一种代谢产物,它不仅影响酵素产品风味口感,还是衡量酵素产品质量的一个重要指标^[16-18]。此外,食用未明确标定乙醇含量的酵素产品易导致酒精测试结果超标^[19],长期服用会引起肝功能异常。QB/T 5323—2018《植物酵素》及T/CBFIA 08003—2017《食用植物酵素》中一致规定“液态和半固态食用植物酵素中乙醇含量不得超过0.5 g/100 g”。目前,酵素的团体标准均采用GB/T 12143—2008《饮料通用分析方法》,即滴定法测定乙醇含量。但该方法前处理复杂,需经中和、蒸馏、氧化等烦琐操作后方能滴定,过程中会因乙醇的损失造成测定结果精度降低,且该方法不适用于大量样品的同时检测。国内对酵素中乙醇含量的测定方法也进行了一定程度的改进,如张红雨等^[20]建立了气相色谱法测定紫山药低醇发酵饮料中乙醇含量的内标法,张海燕^[16]利用液相色谱法研究乙醇含量在发酵周期内的变化规律,杨小幸等^[17]参照GB 5009.225—2016《食品安全国家标准 酒中乙醇浓度的测定》考察苹果酵素的乙醇含量,但基本都存在检测样品较单一、适用范围较窄等问题,针对各种类型食用酵素产品中乙醇含量测定的总体方法尚鲜有报道。本研究建立了测定食用酵素产品中乙醇含量的气相色谱外标法,以

期为完善食用酵素产品方法标准和帮助生产企业加强酵素产品质控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇、无水乙醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);食用酵素产品:由日常送检的生产厂商直接提供,共计10个样品。

1.2 仪器与设备

7890A 气相色谱仪,带火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)(美国安捷伦科技有限公司);BT224S 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);VG3S25 漩涡振荡器(德国 IKA 公司);GL-20G-II 低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂);0.22 μm 滤膜(天津津腾实验设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

准确称取2 g(精确至0.01 g)试样置于20 mL 聚丙烯离心管中,超纯水定容至刻度,涡旋混匀1 min,以8000 r/min 离心5 min,经0.22 μm 滤膜过滤后上机分析。

1.3.2 乙醇标准溶液的配制

称取无水乙醇5.0055 g(精确至0.001 g),用超纯水定容至50 mL 容量瓶中,得到乙醇标准储备液100.11 g/L。分别移取0.20、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00 mL 乙醇标准储备液至100 mL 容量瓶中,用超纯水稀释定容至刻度线,得到质量浓度分别为0.20022、0.50055、1.0011、2.0022、4.0044、6.0066 g/L 的标准使用液。

1.3.3 甲醇和乙醇混合标准溶液的配制

分别准确称取0.1 g(精确至0.001 g)甲醇和无水乙醇至100 mL 容量瓶中,超纯水定容至刻度,混匀后得到乙醇(1.3500 g/L)和甲醇(1.1000 g/L)混合标准溶液,密封保存于(0~4) °C 冰箱中备用。

1.3.4 气相色谱条件

色谱柱:石英酒柱(50 m×250 μm, 0.25 μm);初始柱温40 °C,保持1 min后,以4 °C/min 升至130 °C,再以20 °C/min 升至200 °C,保持5 min,后运行40 °C 3 min;进样口温度:200 °C;FID 检测器温度:250 °C;进样方式:分流进样(分流比30:1),进样量1 μL;流速为1.0 mL/min。

1.3.5 乙醇含量计算

乙醇含量计算公式见式(1)

$$\omega = \frac{\rho \times V \times 0.1}{m} \quad (1)$$

式中, ω 为样品中乙醇含量(g/100 g), ρ 为试样测定液中乙醇的含量(g/L), V 为样品前处理定容体积(mL), m 为食用酵素样品称样量(g), 0.1 为换算系数。

1.3.6 数据处理

采用 Origin Pro2019b 软件作气相色谱图, 标准工作曲线根据 Excel 2016 版绘制。

2 结果与分析

2.1 分离度实验

酵母菌经无氧发酵生产乙醇的同时常伴随甲醇的生成, 两者化学性质相似, 极易干扰乙醇的测定。因此在测定食用酵素产品中乙醇含量前, 要进行分离度实验, 结果见图 1。

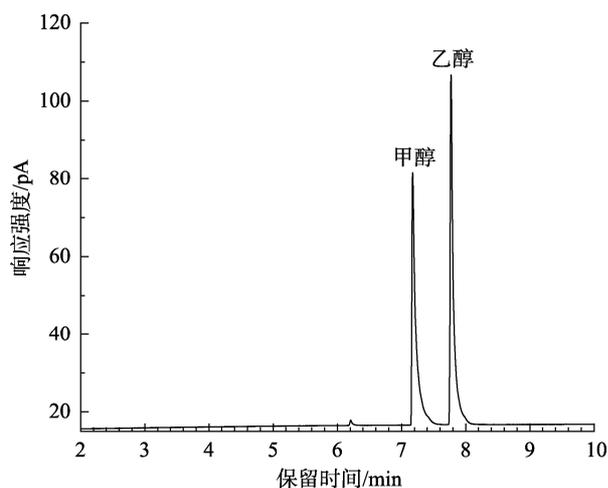


图 1 甲醇乙醇色谱图

Fig.1 Chromatogram of methanol and ethanol

由图 1 可知, 在该色谱条件下甲醇和乙醇峰形对称, 甲醇的保留时间为 7.174 min, 乙醇的保留时间为 7.765 min, 采用安捷伦 7890A 仪器自带软件计算其分离度为 5.44 (>2), 表明甲醇和乙醇能实现较好的分离。

2.2 线性关系

在所采用的仪器条件下, 对 1.0011 g/L 乙醇标准使用液按照 1.3.4 色谱条件进行分析测定, 结果见图 2。

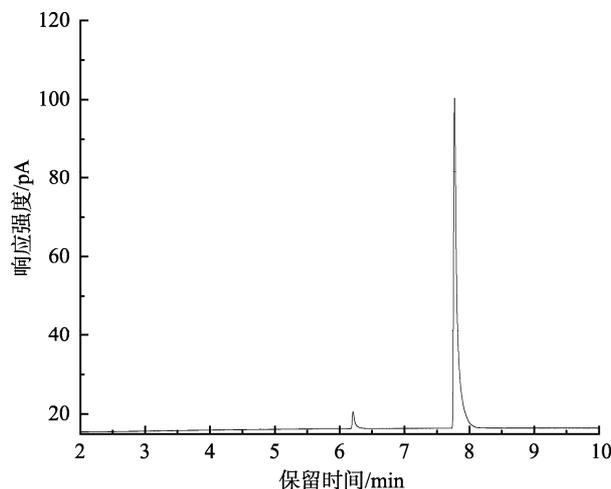


图 2 乙醇标准溶液色谱图

Fig.2 Chromatogram of ethanol standard solution

将配制好的 6 个标准使用液在 1.3.4 色谱条件下测定, 以溶液的进样浓度为横坐标(X , g/L), 目标组分峰面积为纵坐标(Y), 绘制乙醇的标准曲线, 进行线性回归并计算相关系数。结果表明, 乙醇标准曲线的回归方程为 $Y=278.4X-1.8765$, 线性范围为 0.2~6.0 g/L, 相关系数 r^2 为 1.0000, 线性关系良好。

2.3 精密度和检出限

在所采用的仪器条件下, 对食用酵素产品进行重复进样, 以考察方法的稳定性, 结果见表 1。由表 1 可知, 乙醇保留时间偏差、峰面积偏差和峰高偏差较小, 均能满足实验要求。用超纯水逐级稀释乙醇标准溶液直至信噪比(S/N)小于 3 时计算方法的检出限, 得出乙醇的检出限为 2.4 mg/L, 结果表明本方法灵敏度较高, 能够满足微量乙醇含量测定的要求。

2.4 加标回收率实验结果

依据 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》考察加标回收率, 加入不同水平的乙醇标准溶液(加入量见表 2), 按照 1.3.1 处理样品后上机分析, 计算乙醇含量测定的回收率, 结果见表 2。由表 2 可知, 乙醇含量测定的加标回收率在 95.5%~102.5%之间, 表明该法可行, 能满足实验室质控要求。

表 1 乙醇的稳定性实验结果($n=6$)
Table 1 Stability test results of ethanol ($n=6$)

进样次数	保留时间/min	峰高	峰面积	保留时间偏差/%	峰高偏差/%	峰面积偏差/%
1	7.765	9	39.8	0.013	0	0.50
2	7.765	9.2	40.3	0.013	2.22	0.75
3	7.766	9.2	40.3	0	2.22	0.75
4	7.765	9	39.8	0.013	0	0.50
5	7.767	9	40.3	0.013	0	0.75
6	7.768	8.8	39.4	0.026	2.22	1.50

表 2 乙醇加标回收率实验结果($n=3$)
Table 2 Results of adding standard recovery rate tests of ethanol ($n=3$)

本底值/(g/L)	加入量/(g/L)	测定值/(g/L)	回收率/%
	0.0024	0.5227	95.8
0.5204	0.2000	0.7114	95.5
	5.0000	5.6454	102.5

2.5 实际食用酵素产品中乙醇含量测定结果

用上述方法测定 10 种食用酵素产品中乙醇的含量, 根据公式(1)计算(g/100 g), 结果见表 3。60%的食用酵素产品中乙醇含量超出标准要求(0.5 g/100 g), 合格样品仅为 40%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 0.02%~1.46%。可见, 乙醇含量依然是影响酵素产品质量的一个关键因素, 精确测定酵素产品中乙醇的含量也成为产品质量检验的一项重要指标。酵素生产过程中乙醇含量容易出现问题, 其原因可能如下: (1)发酵周期较短, 食用酵素发酵初期, 碳水化合物浓度高, 酵母菌在无氧条件下将其大量转化为乙醇, 使乙醇含量达到高值; (2)发酵方式落后, 本实验收集的 10 种酵素样品均来自国内的生产企业, 索婧怡等^[3]报道我国食用酵素依然以传统的自然发酵方式为主, 自然法采用密闭条件发酵, 具有代谢产物复杂且常常难以控制等特点; 目前, 文献报道减少发酵工艺过程中乙醇的产生有很多方法, 如在发酵过程中可加入酿造米醋及较高浓度的异麦芽糖、蔗糖或红糖等^[21], 又如无氧发酵和有氧发酵相结合, 将乙醇进一步转换成乙酸等。

表 3 样品乙醇含量实验结果($n=5$)

样品	测定结果/(g/100 g)					RSDs/%
1	0.1358	0.1361	0.1360	0.1358	0.1353	0.23
2	1.5427	1.5423	1.5426	1.5431	1.5425	0.02
3	0.7288	0.7285	0.7295	0.7282	0.7280	0.08
4	0.5826	0.5820	0.5829	0.5811	0.5815	0.13
5	0.5795	0.5794	0.5791	0.5757	0.5783	0.27
6	0.7704	0.7703	0.7706	0.7701	0.7802	0.57
7	0.3684	0.3681	0.3676	0.3687	0.3669	0.19
8	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	无
9	0.6655	0.6646	0.6653	0.6704	0.6683	0.37
10	0.0599	0.0611	0.0588	0.0602	0.0607	1.46

3 结 论

本研究建立了气相色谱外标法定性定量测定食用酵素产品中乙醇含量的检测方法。该方法灵敏度高、加标回

收率高、精密度好, 且该法采用水提取乙醇, 前处理操作简单。应用此法测定 10 种酵素乙醇含量后发现, 60%的酵素产品中乙醇含量超范围。与 GB/T 12143—2008 中乙醇的测定方法相比, 本方法消耗试剂大大减少、操作步骤显著简化、测定时长明显减少。同时本方法还可以减小人肉眼观察颜色带来的随机误差, 提高精密度和准确度。本方法简单、准确、可靠, 因此可推广应用于食用酵素产品中乙醇的检测, 代替原有的滴定法, 实现快速准确测定乙醇含量的目的, 为完善食用酵素产品方法标准和帮助生产企业加强酵素产品质控提供技术支持。

参考文献

- 刘加友, 王振斌. 微生物酵素食品研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 273-276.
LIU JY, WANG ZB. Research progress on microbial ferment food [J]. Food Ferment Ind, 2016, 42(1): 273-276.
- 陈丹. 浅谈食用酵素[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(12): 210-214.
CHEN D. Discussion on ferments for diet [J]. Food Res Dev, 2016, 37(12): 210-214.
- 索婧怡, 朱雨婕, 陈磊, 等. 食用酵素的研究及发展前景分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(19): 271-283.
SUO JY, ZHU YJ, CHEN L, *et al.* The research and development prospect of edible Jiaosu [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(19): 271-283.
- 庞锦伟, 姚欣, 雷超, 等. 气相色谱-质谱法测定酵素产品中短链脂肪酸[J]. 中国酿造, 2017, 36(8): 165-167.
PANG JW, YAO X, LEI C, *et al.* Determination of short-chain fatty acids in ferments by gas chromatography-mass spectrometry [J]. China Brew, 2017, 36(8): 165-167.
- 高庆超, 常应九, 马蓉, 等. 微生物酵素的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(2): 190-195.
GAO QC, CHANG YJ, MA R, *et al.* Research progress on microbial ferment [J]. Food Res Dev, 2020, 41(2): 190-195.
- KWAW E, MA Y, TCHABO W, *et al.* Impact of ultrasonication and pulsed light treatments on phenolics concentration and antioxidant activities of lactic-acid fermented mulberry juice [J]. LWT Food Sci Technol, 2018, 92: 61-66.
- 陈小伟, 程勇杰, 蒋立新, 等. 草莓酵素发酵过程中代谢产物及抗氧化性的变化研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 157-165.
CHEN XW, CHENG YJ, JIANG LX, *et al.* Studies on the changes of metabolites and antioxidant activity during the fermentation process of strawberry Jiaosu [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2020, 20(5): 157-165.
- 王珍珍, 沙如意, 王高坚, 等. HPLC 法同时测定食用植物酵素中 12 种有机酸[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 279-285.
WANG ZZ, SHA RY, WANG GJ, *et al.* Simultaneous determination of twelve organic acids in edible plant source Jiaosu by HPLC [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(19): 279-285.
- 马蓉, 高庆超, 常应九, 等. 黑果枸杞酵素发酵过程中理化成分变化及微生物类型分析[J]. 食品科技, 2019, 44(9): 30-37.
MA R, GAO QC, CHANG YJ, *et al.* The changes of physicochemical components and the analysis of microbial types during fermentation of *Lycium ruthenicum* Murr. enzymes [J]. Food Sci Technol, 2019, 44(9):

- 30-37.
- [10] 朱政, 周常义, 曾磊. 酵素产品的研究进展及问题探究[J]. 中国酿造, 2019, 38(3): 10-13.
ZHU Z, ZHOU CY, ZENG L. Research progress and problems exploring of ferment products [J]. China Brew, 2019, 38(3): 10-13.
- [11] 饶智, 陈彦坤, 刘斌, 等. “药食同源”植物酵素研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 290-294.
RAO Z, CHEN YK, LIU B, *et al.* Research progress on “herb-food homology” plant Jiaosu [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(9): 290-294.
- [12] 韩齐, 赵金敏, 高小琴, 等. 功能性酵素发展研究现状[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 337-345.
HAN Q, ZHAO JM, GAO XQ, *et al.* Development status of functional fermented enzymes [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(1): 337-345.
- [13] 付龙威, 汤晓娟, 林祥娜, 等. 枇杷酵素自然发酵过程中有机酸及其抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 42-47, 54.
FU LW, TANG XJ, LIN XN, *et al.* Studies on the organic acid and antioxidant activity of loquat enzyme during spontaneous fermentation process [J]. Food Res Dev, 2021, 42(4): 42-47, 54.
- [14] 胡学智. 论植物发酵和酵素[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(11): 1356-1365.
HU XZ. Plant fermentation and Jiaosu [J]. Chin J Microecol, 2019, 31(11): 1356-1365.
- [15] 赵芳芳, 莫雅雯, 蒋增良, 等. 功能性微生物酵素产品的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 283-287.
ZHAO FF, MO YW, JIANG ZL, *et al.* Research progress on functional microbial ferment product [J]. Food Ferment Ind, 2016, 42(7): 283-287.
- [16] 张海燕. 自然发酵苹果酵素理化指标和抗氧化活性动态分析[J]. 甘肃农业科技, 2020, (11): 37-40.
ZHANG HY. Dynamic analysis of physicochemical indexes and antioxidant activities of apple Jiaosu during natural fermentation process [J]. Gansu Agric Sci Technol, 2020, (11): 37-40.
- [17] 杨小幸, 周家春, 陈启明, 等. 苹果酵素天然发酵过程中代谢产物的变化规律[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 15-19.
YANG XX, ZHOU JC, CHEN QM, *et al.* Changes in metabolites during natural fermentation of apple into enzyme drink [J]. Food Sci, 2017, 38(24): 15-19.
- [18] 刘晓艳, 覃旋, 钱敏, 等. 酱油中微量乙醇的气相色谱分析方法的建立[J]. 中国调味品, 2020, 45(12): 130-133.
LIU XY, TAN X, QIAN M, *et al.* Determination of trace ethanol in soy sauce by gas chromatography [J]. China Cond, 2020, 45(12): 130-133.
- [19] 陈国通, 毛琼玲, 左书瑞, 等. 气相色谱法测定低酒精度饮料中乙醇的含量[J]. 食品与机械, 2018, 34(2): 58-61.
CHEN GT, MAO QL, ZUO SR, *et al.* Determination the content of ethanol in low alcohol beverages by gas chromatography [J]. Food Mach, 2018, 34(2): 58-61.
- [20] 张红雨, 宋曙辉, 周家华, 等. 紫山药低醇发酵饮料中乙醇含量的气相色谱法测定[J]. 食品工业技, 2014, 35(1): 307-309, 314.
ZHANG HY, SONG SH, ZHOU JH, *et al.* Determination of alcohol in purple yam low-alcohol fermented beverage by gas chromatography [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(1): 307-309, 314.
- [21] 毛建卫, 吴元锋, 方晟. 微生物酵素研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2010, 39(3): 42-44.
MAO JW, WU YF, FANG C. Research progress of microbial enzymes [J]. Bull Ferment Sci Technol, 2010, 39(3): 42-44.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



商 健, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品及化工产品质量与安全。
E-mail: 2296163184@qq.com