

反相高效液相法和荧光光度法测定啤酒中草酸含量的应用和比较

刘立梅

(江苏食品职业技术学院,江苏 淮安 223001)

摘要: 对 HPLC 法、分光光度法和荧光光度法测定啤酒中草酸含量的实验条件进行了优化和比较。结果表明, HPLC 法和分光光度法实验重复性较好,回收率较高,检测范围较宽,能较好满足实际检测的需要,但 HPLC 法对实验设备的要求较高,而分光光度法不适合于要求较高的场合。荧光光度法由于检测限较低,非常适合于低草酸含量啤酒(如加钙啤酒)的测定。

关键词: 检测方法; HPLC; 荧光光度法; 分光光度法; 草酸; 啤酒

中图分类号:TS262.5;TS261.7;O657.31;O657.72 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2009)05-0117-04

Application and Comparison of RP-HPLC and Fluorophotometry to Measure Oxalic Acid Content in Beer

LIU Li-mei

(Jiangsu Food Occupational Techniques College, Huaian, Jiangsu 223001, China)

Abstract: The experimental conditions for the measurement of oxalic acid content in beer by HPLC, by spectrophotometry and by fluorophotometry were optimized and compared. The results showed that spectrophotometry and HPLC method were better in repeatability, recovery and detectability and they could meet the demands of practical measurement, however, the equipments demand of HPLC was comparatively higher and the spectrophotometry was not suitable in higher-demands occasion. Fluorophotometry was preferred for beer with low-content of oxalic acid such as calcium-added beer because of its low detection limit.

Key words: detection methods; HPLC; fluorophotometry; spectrophotometry; oxalic acid; beer

作为非挥发性有机酸的一种,少量的草酸赋予啤酒清爽的酸味,但酸含量过高会导致啤酒出现非生物性浑浊,主要表现为啤酒储存一段时间后瓶底会出现白色沉淀,将瓶倒置,沉淀会分散到酒体中看似消失,但静止后会重新形成^[1]。

食品中草酸的测定方法主要有分光光度法、荧光法、液相色谱法^[2~3],本研究将这些方法应用于啤酒中草酸含量的测定,对其测定条件进行优化,对各种方法的优劣进行比较,以期对啤酒中草酸的准确测定提供参考。

1 材料与设备

1.1 材料与设备

材料:啤酒,本学院实训中心自制;三氯化钛;草酸标准品(二水草酸);氯化钙;罗丹明 B;硫酸;磷酸;磷酸二氢钾。

仪器:751 紫外可见分光光度计;PHS-3C 酸度计;荧光光度计;HPLC (LC-10AD)、紫外检测器、Diamondsil-C18 柱;ODS-C18 柱。

收稿日期:2008-12-31

作者简介:刘立梅(1952-),女,江苏淮安人,副教授。

1.2 分析方法

1.2.1 分光光度法

1.2.1.1 标准曲线的绘制

分别准确吸取 5 mL 浓度分别为 0 mg/L、8 mg/L、16 mg/L、24 mg/L、32 mg/L、40 mg/L、48 mg/L 和 56 mg/L 标准草酸溶液于 10 mL 比色管中,加入 3% 的三氯化钛溶液,用蒸馏水定容到 10 mL,25 °C、400 nm 下测定吸光度,绘制标准曲线;三氯化钛溶液加入量、显色时间和 pH 条件需经实验优化。

1.2.1.2 样品预处理

取 500 mL 啤酒样品,加入 50 g 活性炭,于 65 °C (磁力搅拌器控温)、搅拌脱色 40 min,过滤得到脱色后的啤酒,再真空浓缩(控制温度在 5 °C 以下)至 200 mL。

1.2.1.3 样品测定

准确吸取预处理后的啤酒样品 5 mL,按照 1.2.1.1 测定。

1.2.2 荧光光度法

1.2.2.1 标准曲线的绘制

取7支10 mL的比色管,依次准确地加入一定量的硫酸和重铬酸钾溶液、1.2 mL罗丹明溶液,加水稀释至5 mL,再在编号为1~7的试管中分别加入0 mg/L、4 mg/L、8 mg/L、12 mg/L、16 mg/L、20 mg/L和24 mg/L的标准草酸溶液2 mL,定容至10 mL,恒温水浴一段时间,快速冷却后测定其荧光度 ΔF ,绘制标准曲线。实验中,需要优化的条件主要有硫酸和重铬酸钾添加量、反应温度和反应时间。

1.2.2.2 样品测定

准确吸取2 mL脱气后的啤酒,按照1.2.2.1的方法测定 ΔF 。

1.2.3 反相高效液相法(RP-HPLC)

1.2.3.1 标准溶液测定

准确配制100 mg/L的标准草酸溶液,脱气后进样,进样量10 μ L,测定其峰面积。流动相为0.1 mol/L的磷酸-磷酸二氢钾溶液,pH由实验确定,流速0.5 mL/min,柱温25 $^{\circ}$ C,检测波长为215 nm。

1.2.3.2 样品的测定

啤酒样品先用滤纸过滤,再微孔过滤,再经过预处理柱处理后直接进样,进样体积为20 μ L,测定条件同1.2.3.1,测定其峰面积,用外标法定量。

2 结果与分析

2.1 分光光度计法实验条件的确定

2.1.1 三氯化钛溶液添加量的确定

吸取5 mL浓度为16 mg/L标准草酸溶液于10 mL比色管中,加入不同量3%的三氯化钛溶液,用蒸馏水定容到10 mL,立即测定400 nm下吸光度,结果见图1。

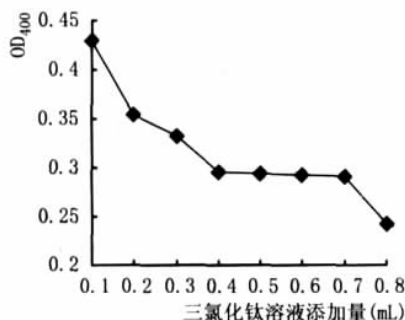


图1 三氯化钛溶液不同添加量对显色反应的影响

从图1可知,当3%的三氯化钛的溶液浓度添加量为0.4~0.7 mL时,显色反应较为稳定,添加量偏低或偏高都会影响到吸光度的稳定性,因此本实验选择三氯化钛的最佳添加量为0.4 mL。

2.1.2 显色反应体系pH的确定

调节16 mg/L的草酸标准溶液pH为1~7,吸取5 mL该溶液于10 mL比色管中,加入3%的三氯化钛溶液0.4 mL,用蒸馏水定容到10 mL,立即测定400 nm下的吸光度,结果见图2。

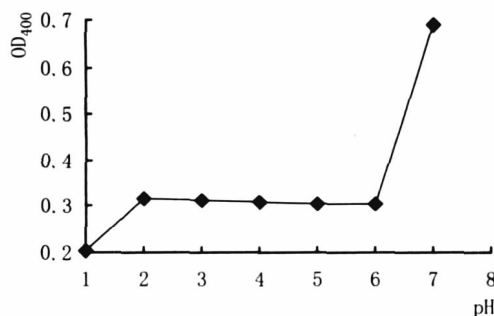


图2 pH对显色反应的影响

从图2可知,当pH在2~6时,显色反应较为稳定,当pH偏低时影响较大,另外当pH偏高时,体系会出现浑浊,从而严重影响比色值。

2.1.3 显色反应时间的确定

调节16 mg/L的草酸标准溶液pH为2,吸取5 mL该溶液于10 mL比色管中,再加入3%的三氯化钛溶液0.4 mL,蒸馏水定容到10 mL,测定400 nm不同反应时间的吸光度,结果见图3。

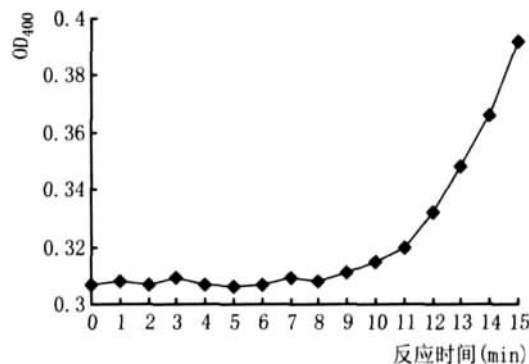


图3 反应时间对显色反应的影响

从图3可知,8 min内显色反应较稳定,超过8 min后,吸光度值开始缓慢增加,至11 min后吸光度增加明显,因此,选择测定时间限定在8 min内。

综上所述,分光光度法的最佳测定条件为:3%的三氯化钛溶液添加量为0.4 mL,标样或样品的pH为2,比色时间在8 min内完成。

2.2 荧光光度法实验条件的确定

罗丹明B在水中有强荧光,重铬酸钾可氧化罗丹明B溶液从而降低荧光,但在硫酸介质中速度很慢,对罗丹明B的荧光强度几乎没有影响,但添加草酸后,能显著加强重铬酸钾氧化罗丹明B溶液的速度,从而导致荧光强度的迅速降低,甚至荧光消失。因此,可通过找到荧光强度改变值与草酸含量的关系,从而准确测定啤酒样品中草酸的含量。

2.2.1 硫酸溶液添加量的确定

在10 mL比色管中依次准确地加入0.8 mL重铬酸钾溶液、1.2 mL罗丹明溶液和不同量的硫酸,加水稀释至5 mL,再加入12 mg/L的标准草酸溶液2 mL,定容至10 mL,45 $^{\circ}$ C恒温水浴10 min,快速冷却后测定其荧光度。

ΔF , 结果见图 4。

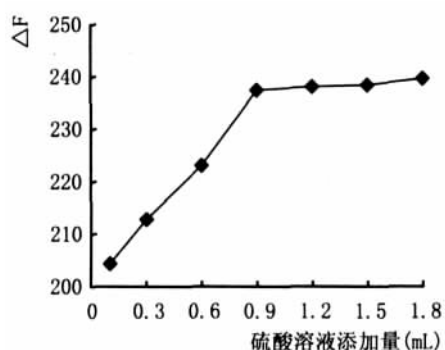


图4 硫酸添加量对荧光强度的影响

从图4可知,硫酸添加量达到0.9 mL后, ΔF 值基本不变,但硫酸添加量也不宜过高,否则其氧化性和高酸度会影响草酸添加后重铬酸钾对荧光强度降低的贡献,从而影响实验的准确性,本实验选择硫酸添加量为1.2 mL。

2.2.2 重铬酸钾添加量的确定

在10 mL比色管中依次准确加入1.2 mL罗丹明溶液、1.2 mL的硫酸和不同量的重铬酸钾饱和溶液,加水稀释至5 mL,再加入12 mg/L的标准草酸溶液2 mL,定容至10 mL,45 °C恒温水浴10 min,快速冷却后测定其荧光度 ΔF ,结果见图5。

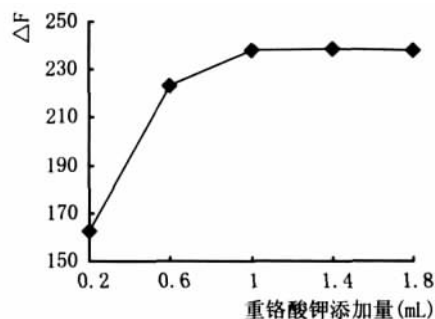


图5 重铬酸钾添加量对荧光强度的影响

从图5可知,重铬酸钾添加量达到1.0 mL以上, ΔF 基本不变,重铬酸钾添加量偏低时,不能彻底氧化罗丹明B,因此 ΔF 降低。

2.2.3 反应温度的确定

在10 mL比色管中依次准确加入1.2 mL罗丹明溶液、1.2 mL的硫酸和1.0 mL的重铬酸钾饱和溶液,加水稀释至5 mL,再加入12 mg/L的标准草酸溶液2 mL,定容至10 mL,采用不同温度水浴10 min,快速冷却后测定其荧光度 ΔF ,结果见图6。由图6可知,40~55 °C比较理想,实验选择45 °C。

2.2.4 反应时间的确定

在10 mL比色管中依次准确加入1.2 mL罗丹明溶液、1.2 mL的硫酸和1.0 mL的重铬酸钾饱和溶液,加水稀释至5 mL,再加入12 mg/L的标准草酸溶液2 mL,定

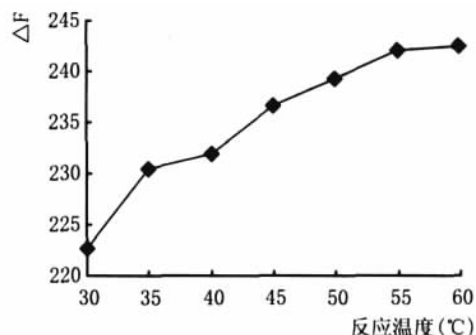


图6 反应温度对荧光强度变化的影响

容至10 mL,采用45 °C水浴不同时间,快速冷却后测定其荧光度 ΔF ,结果见图7。

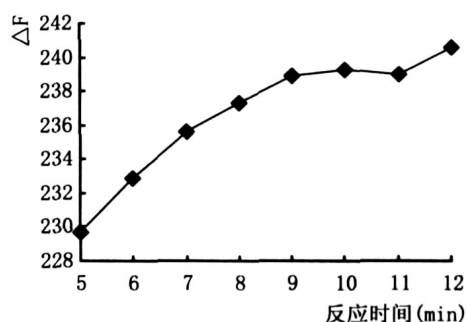


图7 反应时间对荧光强度的影响

从图7可知,采用10 min的反应时间较为合适。

2.3 HPLC 实验条件的确定

由于啤酒中含有多种有机酸,而草酸只是其中的一种,用HPLC测定草酸含量,关键是将草酸能与其他有机酸分开,而这其中,流动相的浓度以及流动相的pH对分离效果影响最大,本实验重点考察pH选择用 H_3PO_4 调节流动相 KH_2PO_4 的pH分别为2.2、2.5、2.8、3.1、3.4和3.7,结果见图8。

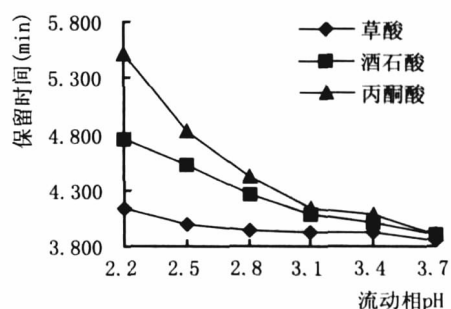
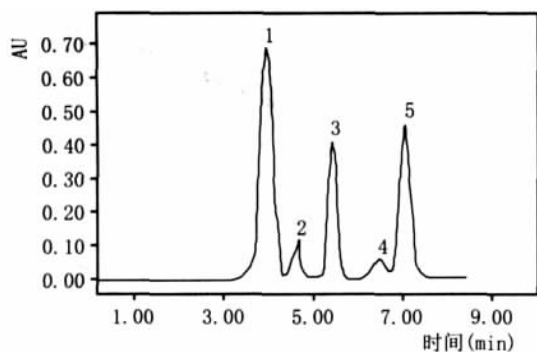


图8 流动相pH对有机酸保留时间的影响

酒石酸和丙酮酸与草酸出峰时间可能重合。从图8可以看出,随着pH的增加,三者之间的保留时间越来越接近,因此选择pH2.2较为理想,实验中还发现,流动相的浓度对草酸的保留时间影响不显著。因此,实验选择流动相的浓度为0.1 mol/L。在此条件下草酸标样和啤酒样品的HPLC图分别见图9和图10。

2.4 各测定方法之间的比较与分析



注:1 为草酸;2 为酒石酸;3 为丙酮酸;
4 为苹果酸;5 为 α -酮戊二酸

图 9 啤酒中几种有机酸标样色谱图

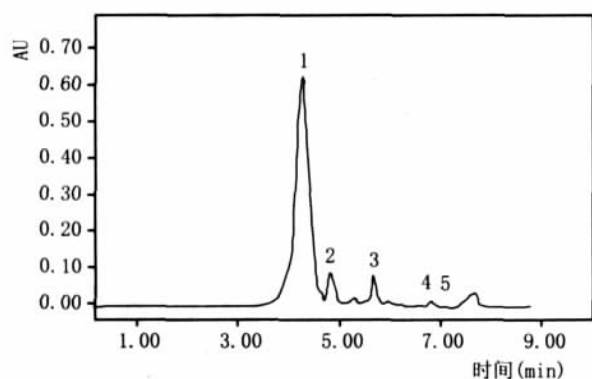


图 10 啤酒色谱图

2.4.1 各测定方法实验结果的重复性比较

采用上述 3 种方法对自制的酒样进行 8 次平行测定,结果见表 1。

表 1 啤酒中草酸含量测定实验结果

测定次数	草酸含量(mg/L)		
	分光光度法	荧光光度法	HPLC 法
1	34.52	31.22	31.53
2	31.22	38.42	32.33
3	36.19	38.66	33.16
4	35.07	37.54	35.27
5	30.69	36.88	35.09
6	35.89	29.12	34.32
7	33.56	36.22	32.48
8	31.99	29.07	31.55
平均值	33.64	34.64	33.22
RSD(%)	6.32	11.93	4.54

从表 1 可以看出, 分光光度法和 HPLC 法实验重复性较好, 而荧光光度法则相对较差, 原因可能是啤酒样品中的草酸含量超过了荧光光度法的检测上限。

2.4.2 各测定方法草酸回收率实验结果比较

在啤酒样品中加入 20 mg/L 的草酸标准溶液, 测定

各测定方法草酸的回收率, 结果见表 2。

表 2 不同测定方法的草酸回收率

测定次数	回收率(%)		
	分光光度法	荧光光度法	HPLC 法
1	92.9	90.5	100.4
2	91.5	89.3	99.6
3	90.8	88.9	99.8
平均	91.7	89.6	99.9

从表 2 可以看出, HPLC 法草酸回收率最高, 荧光光度法最低, 原因可能是加标后的啤酒样品中的草酸含量远远超过了标准曲线的线性范围。

2.4.3 各测定方法检测限比较

根据标准曲线的线性范围, 各测定方法的检测范围见表 3。

表 3 不同测定方法的检测限

项目	测定方法		
	分光光度法	荧光光度法	HPLC 法
检测限(mg/L)	8~80	0.5~20	2~100

从表 3 可看出, 分光光度法和 HPLC 法检测范围较宽, 分光光度法适合于一般性的检测。HPLC 法检测成本较高, 一般适合于要求较高的场合, 如分析草酸对啤酒非生物稳定性影响。荧光光度法的检测限较低, 适合于草酸含量较低的啤酒样品(如加钙啤酒), 很多啤酒中草酸的含量都超出了此检测范围, 因此需对样品进行预处理。

3 结论

3.1 分光光度法的最佳测定条件为: 3% 的三氯化钛溶液添加量为 0.4 mL, 标样或样品的 pH 为 2, 比色时间在 8 min 内完成; 荧光光度法最佳测定条件为: 硫酸添加量为 1.2 mL, 重铬酸钾添加量为 1.0 mL, 反应温度 45 °C, 反应时间 10 min; HPLC 法选择流动相 pH 为 2.2。

3.2 从实验重复率、草酸回收率及检测限考察, HPLC 法和分光光度法能较好满足实际检测的需要, 但 HPLC 法对实验设备的要求较高, 不经济且不方便。荧光光度法由于检测限较低, 适合于低草酸含量啤酒的测定。

参考文献:

- [1] Aho.K, The effect of wort composition on fermentation and beer flavor[J]. Mallasja Olut, 1993, (1): 4-13.
- [2] Xiao-Qin Xu, Zhi-Qi Zhang, Kinetic spectrophotometric determination of oxalic acid based on the catalytic oxidation of bromophenol blue by dichromate[J]. Mikrochimica Acta. 2000, 135(3-4): 0169-0172.
- [3] 刘景, 李崎, 顾国贤. 反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定麦汁中的草酸[J]. 中国酿造, 2005, 151(10): 43-46.