

己酸发酵液和黄水中有机酸分析(第一报)

陈志强¹,孔祥亮¹,李长虹¹,赵建松¹,魏金宝¹,金佩璋²

(1.山东孔府家酒股份有限公司,山东 曲阜 273100; 2.江苏南京市一校园 5-413号,江苏 南京 210018)

摘要: 分析检测己酸发酵液和黄水中有机酸,其关键技术是有机酸的有效提取及分析方法。经试验,采用乙醚一次性萃取法,萃出的酸可达80%~90%,检测数据较蒸馏法要准确得多,且试样用量很少(1~5 ml),计算简便。该法较准确、简便,实用性强,已应用于生产中。分析中应注意:1.在试样中加入NaCl,以减少有机酸在水相的溶解度。2.操作一致,使各种因素造成的偏差相互抵消,并做标准酸回收试验进行校正。(丹妮)

关键词: 分析检测; 己酸发酵液; 黄水; 有机酸; 乙醚萃取法

中图分类号: TS261.7; O65 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2004)06-0085-03

Analysis of Caproic Acid Fermenting Liquid and Organic Acids in Yellow Water (I)

CHEN Zhi-qiang¹, KONG Xiang-liang¹ and JIN Pei-zhang² et al.

(1.Shandong Kongfujiajiu Co. Ltd., Qufu, Shandong 273100; 2. Nanjing Yizhiyuan Unit 5-413, Nanjing, Jiangsu 210018, China)

Abstract: The key techniques in the analysis of caproic acid fermenting liquid and organic acids in yellow water are effective distilling of organic acids and the consequent analytic methods. Through experiments, single aether extraction was applied and the percentage of extracted acid could achieve 80%~90%. Compared with distilling method, aether extraction had the advantages of accurate detection data, small sample use level (1~5 ml), and simple calculation. The method was of strong practicality and used widely in production. Some problems should be noticed in the analysis: 1. addition of NaCl in samples to reduce the solubility of organic acids in aqueous phase; 2. coherent operation to prevent the deviation caused by varieties of reasons, besides, standard acid recovery test done for correction. (Tran. by YUE Yang)

Key words: analysis and detection; caproic acid fermenting liquid; yellow water; organic acid; aether extraction

衡量己酸发酵液质量好坏与改进培养条件,提高发酵液质量和掌握黄水中有机酸含量以合理利用,关键的问题是需要解决有机酸的提取和分析方法,这些试样中固体杂质很多,乳酸含量往往太高,不能直接进样做毛细管气相色谱分析。我们曾用蒸馏法企图将挥发酸从试样中分离出来。以大罐己酸发酵液为试样蒸馏时无论加乙醇或水,有机酸蒸出效果均不理想。

1 蒸馏实验

1.1 蒸馏实验操作法

吸取大罐发酵液 100 ml(总酸为 1869.1 mg/100 ml),加入 100 ml 60%(v/v)乙醇,直接加热常压蒸馏,为避免较高沸点的酸回流影响蒸出率,在蒸馏瓶上部与导气管的连接部分均保温,蒸出液与残留液用标准 NaOH 溶液滴定,总酸以乙酸计(mg 乙酸/100 ml 发酵液),结果见表 1。

项目	体积 (ml)	酒精度 (%, v/v)	酸量 (mg/100 ml)	占总酸比例 (%)
馏出液 1	100	60	121.3	6.49
馏出液 2	55	/	90.6	4.85
残液	50	/	1657.2	88.66

将馏出液 1,馏出液 2 直接进样,用毛细管气相色谱测酸,残

液经乙醚萃取后进样分析,结果见表 2(乙醚萃取方法见后述),馏出液 1 色谱图见图 1。

项目	馏出液 1	馏出液 2	残液 (两次萃取)
滴定酸值	121.3	90.6	916.5
甲酸	未计*	无	无
乙酸	49.4	30.9	243.5
GC 分析			
丙酸	17.5	12.5	49.9
异丁酸	1.8	1.2	1.74
丁酸	4.9	3.1	24.2
戊酸	2.6	2.2	7.9
己酸	8.3	9.5	73.1
总量	84.5*	58.9	400.3

*注: 馏液 1 中甲酸峰较大,与丙酸峰不相上下,但未做校正因子,故没计量,说明总量 84.5 是偏低的,若加上甲酸近于全馏分出峰(GC 总量以 121.3 计),其中乳酸极微或无。

乳酸以差减法计:

馏液 2 中乳酸=滴定值-GC 值=90.6-58.9=31.7 mg

残液中乳酸=1657.2-400.3=1256.9 mg

乳酸总量=1256.9+31.7=1288.6 mg/100 ml 试样(乙酸计)

1.2 实验结果

通过初步实验,发现大罐发酵液质量极差。

1.2.1 乳酸量大约占总酸的 68.94%(1288.6/1869.1)。

收稿日期:2004-07-13

作者简介:陈志强(1973-),男,山东曲阜人,大专,助理工程师。

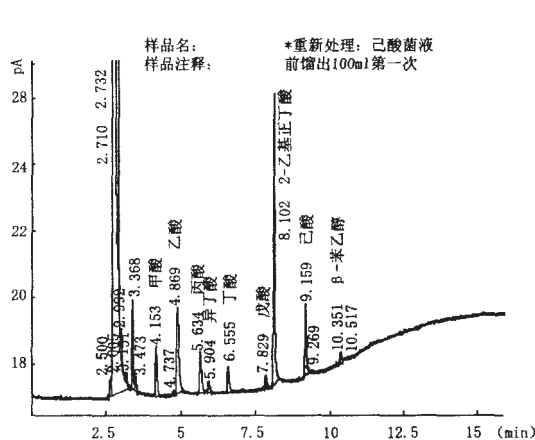


图1 大罐发酵液馏出液

1.2.2 有相当含量的奇数碳酸,以甲酸为主(甲>丙>戊)。

1.2.3 蒸馏提酸效果差, 馏液1+馏液2中酸量只占总酸的9.64%。

1.2.4 有机酸以乙酸为主,在色谱分析测出酸的总量中占55.8%(馏液1+馏液2+残液),而其中75%在残液中。同样,己酸在色谱酸总量中占15.65%,其中80%在残液中。

为进一步了解大罐发酵液质量不好的原因,用乙醚萃取法检查了试管和卡氏罐发酵液中的有机酸,并将卡氏罐发酵液做了加乙醇和加水蒸馏的对比试验(见表3)。通过实验说明二者蒸出率都很低。若用水蒸汽蒸馏效果会好一些,但太麻烦,所以改用乙醚萃取法进行比较。

表3 蒸馏对比实验

蒸馏方法	体积(ml)	蒸出酸(mg)	蒸出率(占总酸)(%)
1. 加乙醇蒸馏			
馏液1	100	58.8	4.8
馏液2	65	134.8	11.03
残液		1028.8	84.16
2. 加水蒸馏			
馏液1	100	104.3	8.23
馏液2	52	109.2	8.62
残液		1053.1	83.14

注:卡氏罐发酵液总酸1213.2 mg/100 ml。

2 乙醚萃取实验

2.1 一次性乙醚萃取法

通常乙醚萃取是在分液漏斗中多次萃取,为减少乙醚在水中溶解度,在溶剂乙醚中加一定比例戊烷,合并溶剂层,用无水芒硝脱水后直接进样做GC分析,或经低温浓缩后进样,不仅手续繁杂,对批量试样定量分析也较困难。为满足批量试样快速测定并得到定量结果的目的,采用一次性萃取法。试样先加NaCl饱和,乙醚用量是水相的4倍,以增加有机酸萃取率,在二相平衡分配条件下,直接吸取醚层进行GC分析。

操作:取试样1~5 ml(视酸量多少而异),在25 ml带盖刻度试管中,加水定容至5 ml,加2 g NaCl使之溶解呈饱和状态,正确加入20 ml乙醚,先轻摇开盖排气,然后使劲振荡2 min,使二相充分接触,静置分层,倾出醚层于另一带盖干燥试管中,加少量无水芒硝脱水。吸取醚液5 ml加0.1 ml内标(2%乙基正丁酸)注样进行GC分析。

仪器:安捷伦6820,配6820工作站,INNOWax毛细管柱,0.32 mm×30 m。

柱温:①50℃(1 min)→4℃/min→220℃(10 min)(用于黄水分析)

②140℃(1 min)→8℃/min→220℃(10 min)(用于发酵液分析)

计算:本实验是以20 ml乙醚作为计算基准,实际上操作过程中乙醚有一定挥发损失,水相与溶剂相有互溶。实验中曾仔细观察,试样定容5 ml,加2 g NaCl溶解后刻度为5.5 ml,萃取完毕,水相为5 ml,总体积略高于满刻度25 ml,说明以20 ml乙醚计还是可行的,但操作务必一致,使乙醚体积基本不变。色谱分析数据(利用白酒分析参数)若为mg/100 ml酒样,只需将色谱分析提供的数据乘以乙醚对试样稀释倍数即为mg/100 ml发酵液。

取5 ml试样时乘以4(5×4=20);1 ml试样时乘以20(1×20=20),以此类推。

2.2 萃取结果

试管、卡氏管和大罐发酵液萃取分析结果见表4。

表4 卡氏管和大罐发酵液萃取分析结果 (mg)

项目	试管	卡氏管	大罐
总酸	296	1213.2	1869.1
萃出酸		519.2	931.6
乙酸	59.3	187.5	355
丙酸	4.6	5.3	110.3
GC分析			
异丁酸	3.8	3.5	1.14
丁酸	197.2	97.9	18.3
戊酸	2.0	2.0	4.4
己酸	26.7	31.2	52.6
总量	293.6	390.8*	541.6
GC酸总量/萃出酸(%)	100	75.3	58.1
萃出酸/总酸(%)		42.8	49.8

注:试样均萃取一次。*包括甲酸63.4 mg(利用乙酸的f'值)。

由表4可见,(1)总酸:大罐>卡氏管>试管。(2)试管的乙醚萃出物几乎全部在色谱分析时出峰,说明基本无乳酸,但丁酸>乙酸>己酸(197.2>59.3>26.7);(3)卡氏管乙醚萃出酸占总酸的42.8%,其中75.3%能出峰,乙酸>丁酸>己酸(187.5>97.9>31.2);(4)大罐乙醚萃出酸占总酸的49.8%,其中58.1%能出峰,有相当量甲酸外,丙酸>己酸>乙酸>丁酸(110.3>52.6>35.5>18.3)。

根据上述分析结果,改进培养基和培养条件,使发酵液中己酸逐步提高(略)。

萃取时各种酸在两相间平衡分配,但它们不可能在一次萃取时百分之百进入醚层,因此在一致的操作条件下(使各种因素造成的偏差相互抵消),做标准酸添加回收试验,求出各酸的校正值是必要的。此外,为了了解萃取过程中各种酸的行径,我们对试样做了多次萃取对比实验。

3 水相的再次萃取对比实验

本实验将大罐发酵原液和蒸馏残液萃取后的水相进行第二次萃取,将两次萃出酸量进行比较,见表5。

先用滤纸条把上层溶剂吸干,但在试管中很难在不接触水层条件下把残余溶剂吸干,而且与两相界面分得是否清晰有很大关系。大罐原液是取5 ml萃取的,界面多泡沫,残存醚液多,将使第二次萃取结果偏高。蒸馏残液经加热蒸馏处理后仅剩50~55 ml,故萃取时取样2.5 ml(与5 ml原液相当),用水定容至5 ml,萃取分层两相界面十分清晰,使第二次萃取更为可靠。第一次萃出酸与两次含量相比己酸>90%,丁酸80%左右,乙酸85%左右。

4 黄水中有有机酸分析

乙醚萃取法同样适用于黄水中有有机酸分析,例如黄水1#外观

试样	总酸 (mg/100ml)	萃出酸		GC分析						含量
		第一次	第二次	乙酸	丙酸	异丁酸	丁酸	戊酸	己酸	
大罐原液	1869.1	931.6		354.9	110.3	1.14	18.3	4.4	52.6	541.6
			417.3	101.6	9.6	—	11.4	1.4	11.37	135.3
总量			1348.9	456.5	119.9	1.14	29.7	5.8	63.97	676.9
第一次萃出率(%)				77.8	92.0		61.6	75.9	82.2	80
大罐蒸馏残液	1657.2	716.3		210	46.4	1.74	19.2	7.4	67.6	352.3
			200.2	33.5	3.5	—	5.0	0.5	5.5	48.0
总量			916.5	243.5	49.9	1.74	24.2	7.9	73.1	400.3
第一次萃出率(%)				86.3	93		79.3	93.7	92.5	

注: 乙酸在 INNOWax 柱上测定变化较大, 结果往往一次比一次低, 出现原液反低于残液现象。

质量好, 总酸(乙酸计)1650 mg/100 ml, 萃取后分析结果见表6。黄水2# 外观质量较差, 总酸 3330 mg/100 ml, 分析结果见表7。

成分	GC分析	以乙酸计	在GC总量中(%)	在总酸中(%)
乙酸	483.0	483.0	48.9	29.3
丙酸	32.3	26.1	2.6	1.58
异丁酸	7.6	5.2	0.53	0.32
丁酸	292	198.5	20.1	12.0
己酸	528	274.6	27.8	16.6
总量	1342.9	987.4		
乳酸	993.9	662.6		40.1

*乳酸以差减法计: 1650 - 987.4 = 662.6 (乙酸计), 662.6 × 9/6 = 993.9 (乳酸计)。

成分	GC分析	以乙酸计	在总酸中(%)
乙酸	381.9	381.9	11.5
丙酸	22.2	18.0	0.54
异丁酸	7.1	4.8	0.15
丁酸	101.2	68.8	2.1
异戊酸	9.65	5.7	0.17
戊酸	5.86	3.5	0.1
己酸	98.6	51.3	1.54
总量	626.4	533.9	
乳酸	4194.2	2796.1	83.97

由于黄水中除了酸还有其他成分, 若用快速升温法易被忽略,

因而宜用 50 °C(2 min) $\xrightarrow{4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 220 °C(10 min) 升温条件见图2 (黄水), 黄水萃取时取样 2 ml, 所以结果应将色谱数据乘 10 倍, 见表8(内1 乙酸正戊酯, 内2 乙基丁酸)。

黄水1#和2#都是只萃取一次, 可看出1#有效酸(除乳酸)含量占总数60%以上, 而2#虽总酸含量高, 比1#高出1倍, 但主要是乳酸, 有效酸仅15%左右, 掌握这些信息有利于了解发酵工艺情况和对黄水的合理应用。

5 小结

己酸发酵液和黄水中己酸分析, 先要将有机酸从试样中分离出来, 根据有关资料介绍, 我们也采用蒸馏的方法, 但提酸率太低, 乙酸75%, 己酸80%留在蒸馏残液中。

经试验, 本文推荐乙醚一次性萃取法。

5.1 试样用量很少, 仅1~5 ml, 所以像试管培养的小样亦能测定。

成分	GC数据	换算成mg/100 ml 试样
异戊醇	0.92	9.2
乳酸乙酯	22.17	221.7
乙酸	38.18	381.8
丙酸	2.22	22.2
异丁酸	0.71	7.1
丁酸	10.12	101.2
异戊酸	0.96	9.6
戊酸	0.58	5.8
己酸	9.86	98.6
β -苯乙酸	4.88	48.8

注: 乙酸乙酯和乙缩醛均未分开, 故不计量; 丁酸乙酯和正丙醇均未分开, 故不计量; 乙醚、甲酸乙酯和甲醇亦未计算。

