

# 气相色谱法测定发酵乳中的 7 种短链脂肪酸

丁岩\*,王娟,张迪

(Ofmom 中国有限公司妈咪爱营养研发中心,北京,101300)

**摘 要** 建立了气相色谱法检测发酵乳中 7 种短链脂肪酸(甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸)的方法。利用衍生化对样品进行前处理,通过色谱柱对样品进行分离,通过保留时间进行定性,峰面积进行定量。7 种短链脂肪酸的线性范围是 20~2 000 mg/L;方法定量限为 20 mg/L;方法检出限为 5 mg/L;相关系数( $R^2$ )均大于 0.999,加标回收率范围是 93.57%~108.20%,结果的相对标准偏差(RSD)为 2.40%~9.56%。该方法准确,灵敏度高,重现性好,可用于检测发酵乳中短链脂肪酸的含量。

**关键词** 短链脂肪酸;气相色谱;发酵乳

短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)通常是指碳链中碳原子数少于 6 的有机脂肪酸,主要包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸等<sup>[1-3]</sup>。SCFAs 存在于胃肠道中,对胃黏膜有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。乳品在发酵过程中会产生 SCFAs,SCFAs 是发酵乳的主要风味营养物质之一<sup>[5]</sup>。

目前,最常用的测定 SCFAs 含量的方法有液相色谱法<sup>[6-9]</sup>、气相色谱法<sup>[10-14]</sup>和质谱法<sup>[15-20]</sup>,其中高效液相色谱法虽然前处理操作简单,但要求样品基质简单。对于基质复杂的样品,例如发酵乳,则干扰过多,分离度差,定性及定量都较为困难,且需要消耗大量的有机试剂。对于气相色谱法来说,由于羧基的极性较强,在气相色谱柱中容易产生吸附作用,导致结果的重现性差,这种情况尤其在低浓度时会发生,因此 SCFAs 在进入气相色谱柱前最好进行衍生化,同时衍生化还可以降低这些挥发性酸的蒸发损失<sup>[21]</sup>。质谱法具有检测灵敏度高,定性准确的优点,但是对于小分子化合物(尤其是分子质量小于 50 的化合物,例如甲酸),其在质谱上没有响应或响应很低。气相色谱-质谱联用技术<sup>[15-18]</sup>基本采用的是全扫描模式,没有充分利用质谱灵敏度高的优势。采用顶空气相色谱-质谱联用技术<sup>[17-19]</sup>,存在的问题是,样品的基质和标准系列的基质很难完全一致,准确定量存在困难。液相色谱-质谱联用技术检测 SCFAs<sup>[20]</sup>,应用还不是很广泛。另外质谱检测成本过高。

综合考虑,本方法选择用衍生化方法进行前处理,由于衍生物中含有溴元素,所以选择气相色谱带电子捕获检测器进行监测。本方法优化了复杂的衍生化前处理过程,使操作变得简单、快速,消除了杂质干扰,提高了分离度,检测结果准确、可靠,适用于发酵乳中各种 SCFAs 的测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

发酵乳,实验室自制;脱脂乳粉原料,雀巢公司;丙酮、正己烷,均为色谱纯,默克集团;质量分数为 1%的酚酞乙醇溶液、 $\alpha$ -溴苯乙酮及 18-冠-6 醚, sigma 公司;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{H}_3\text{PO}_4$  和 KOH,分析纯,百灵威公司;甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、异丁酸、异戊酸标准品,百灵威公司。

实验室配制试剂:不同质量浓度(2、20、100 g/L)的 KOH 水溶液;体积分数为 0.5%的  $\text{H}_3\text{PO}_4$  水溶液;磷酸盐缓冲溶液<sup>[22]</sup>(0.08 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液, pH 6.8):用 0.08 mol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液调节 0.08 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液至溶液 pH 值为 6.8;衍生化试剂<sup>[22]</sup>(0.151 mol/L 的  $\alpha$ -溴苯乙酮和 0.006 mol/L 的 18-冠-6 醚混合的丙酮溶液):称取  $\alpha$ -溴苯乙酮(2-溴苯乙酮)0.300 5 g 和 18-冠-6 醚 0.015 9 g 于同一 10 mL 容量瓶中,用丙酮溶解并定容到 10 mL 刻度,充分混匀,根据用量现用现配。

### 1.2 仪器与设备

7890B 气相色谱(带电子捕获检测器(ECD)), Agilent 公司;Integral 5 超纯水系统, Millipore 公司,水的电阻为 18.2 M $\Omega$ ;Centrifuge 5804R 离心机, Eppendorf

第一作者:学士,工程师(本文通讯作者, E-mail:2250977463@qq.com)。

收稿日期:2018-06-21, 改回日期:2018-08-30

公司;DK-8D 水浴锅,常州诺基仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱:DB-23 石英毛细管柱(60 m×0.25 mm, 0.25 μm);进样口温度:270 ℃;检测器温度:280 ℃;分流比:150:1;进样量:1 μL;载气:氮气;载气流速:1 mL/min;升温程序:初始温度 50 ℃,保持 10 min,然后以 20 ℃/min 速率升温至 170 ℃,以 6 ℃/min 速率升温至 230 ℃,保持 9 min。

#### 1.3.2 预处理

##### 1.3.2.1 样品预处理

取 10 mL 发酵乳于 15 mL 离心管中,10 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液 4 mL( $V_2$ )于另一 15 mL 离心管中,加 1~2 滴酚酞,用 KOH 水溶液调上清液至微变淡粉色,此时样品溶液呈弱碱性(强碱弱酸盐电离呈弱碱性),SCFAs 以酸根形式存在。用超纯水定容至 5 mL( $V_1$ )刻度,混匀后 10 000 r/min 离心 10 min,准备衍生化。如果样品中待测物质浓度过高,可以将样品在衍生化之前稀释  $f$  倍后再进行衍生化处理。

##### 1.3.2.2 标准系列预处理

分别称取甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸各 0.25 g 到同一 100 mL 容量瓶中,用水定容到刻度,混合均匀。取 4 mL 配制好的标准溶液于 15 mL 带 5 mL 刻度的离心管中,加 1~2 滴酚酞,用 KOH 溶液调至淡粉色,然后用水定容到 5 mL 刻度。此溶液为级别 1 混合标准溶液,将级别 1 混合标准溶液逐级稀释,配制 7 个不同级别混合标准溶液。各级别混合标准溶液的质量浓度如表 1 所示。

表 1 各级别标准溶液中 7 种 SCFAs 的质量浓度

Table 1 The concentration of 7 SCFAs in each level

级别	7 种 SCFAs 的质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )						
	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	异丁酸	戊酸	异戊酸
1	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000
2	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
3	500	500	500	500	500	500	500
4	200	200	200	200	200	200	200
5	100	100	100	100	100	100	100
6	50	50	50	50	50	50	50
7	20	20	20	20	20	20	20

#### 1.3.3 衍生化

取 0.5 mL 样品上清液(或取 0.5 mL 表 1 中不同级别的混合标准溶液)于 10 mL 顶空进样瓶中,加入

2 mL 磷酸盐缓冲溶液,2 mL 衍生化试剂和 1 mL 丙酮,加盖密封,100 ℃ 水浴反应 40 min,冷却至室温后,取 0.7 mL 衍生后的样品于 2 mL 离心管中,加 0.7 mL 等体积的正己烷涡旋萃取,取正己烷层,进气相色谱分析。衍生化反应式如图 1 所示。

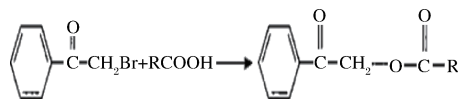


图 1 SCFAs 衍生化反应方程式

Fig. 1 The derivative reaction equation of SCFAs

## 2 结果与分析

### 2.1 SCFAs 的定性分析

在上述色谱条件下进行检测,得到 SCFAs 各酸单标标准溶液的色谱图和混合酸标准溶液的色谱图,如图 2 所示。

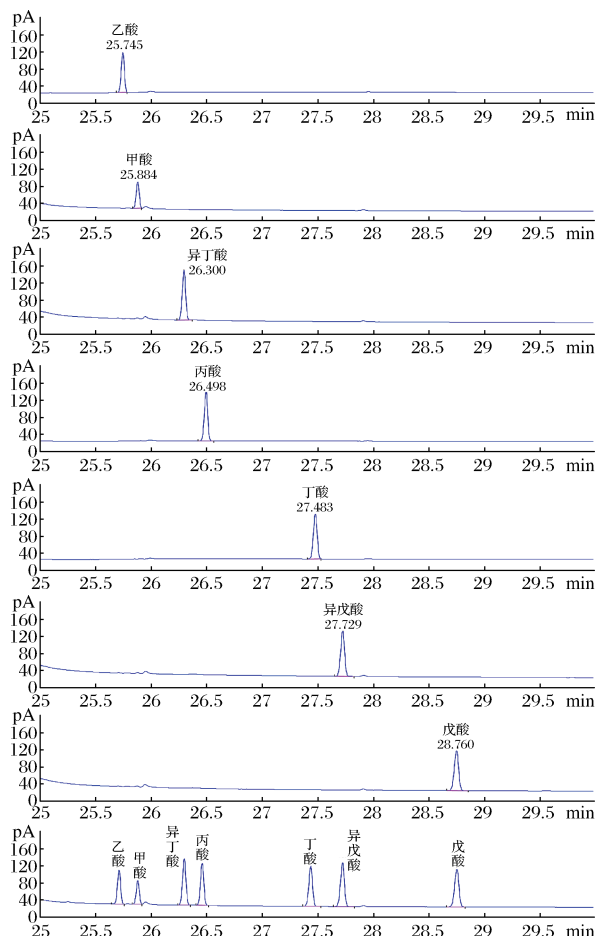


图 2 七种 SCFAs 各酸单标标准溶液的色谱图和混合酸标准溶液的色谱图

Fig. 2 The gas chromatogram of each single acid standard and 7 SCFAs mixed standard

由图 2 可以看出,发酵乳中可能含有的 7 种 SCFAs 得到了很好的分离,保留时间分别为:乙酸 25.745 min,甲酸 25.884 min,异丁酸 26.300 min,丙酸 26.498 min,丁酸 27.483 min,异戊酸 27.729 min,戊酸 28.760 min。

2.2 SCFAs 的定量分析

一系列的混合标准溶液,按照上述的色谱条件进行测定,以各酸的质量浓度  $x$  为横坐标,各浓度对应的峰面积  $y$  为纵坐标,制作标准曲线,根据式 (1) 计算样品中的 SCFAs 的含量。

试样中各个 SCFAs 的含量计算公式:

X = (C x V1 / V2) x f (1)

式中: $X$ :试样中各个 SCFAs 的含量,mg/L; $C$ :从标准曲线上查得的试样中各个 SCFAs 的质量浓度,mg/L; $V_1$ :样品预处理时的定容体积,mL; $V_2$ :样品预处理时的取样体积,mL; $f$ :样品的稀释倍数。

2.3 SCFAs 的线性范围、方法定量限和检出限

将各个 SCFAs 配制成不同级别的混合标准溶液,各个级别的混合标准溶液分别调节 pH 值和衍生化处理,然后进气相色谱检测,各级别混合标准溶液中各酸质量浓度均为 20 ~ 7 200 mg/L,根据 SCFAs 的定量分析方法 (2.2) 绘制各酸质量浓度和对应峰面积的关系图,即各酸的衍生化效率图,如图 3 所示。

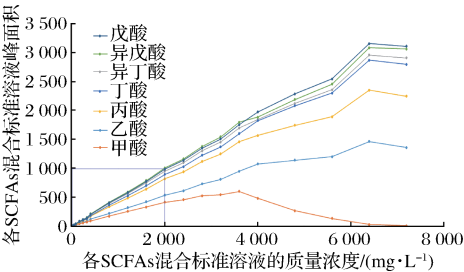


图 3 七种 SCFAs 的衍生化效率图

Fig. 3 The derivatization efficiency graph of 7 SCFAs

各酸质量浓度在 20 ~ 2 000 mg/L 之间时,曲线均呈线性关系,随着质量浓度继续增大,从甲酸开始,衍生化效率逐渐下降,所以设定各个 SCFAs 的标准曲线线性范围为质量浓度 20 ~ 2 000 mg/L。

各酸质量浓度在 20 ~ 2 000 mg/L 线性范围内的标准曲线方程,如表 2 所示,标准曲线线性关系良好,相关系数 ( $R^2$ ) 均大于 0.999。当质量浓度为 20 mg/L 时,各酸的信噪比均 > 25,符合信噪比大于 10 作为定量限的要求,所以设置方法定量限为 20 mg/L。

表 2 七种 SCFAs 的线性回归方程和定量限

Table 2 The linear regression equations and quantitative limits of 7 SCFAs

物质名称	标准曲线方程	线性范围/(mg · L <sup>-1</sup> )	相关系数(R <sup>2</sup> )	定量限/(mg · L <sup>-1</sup> )
甲酸	y = 0.205 9x + 6.072 8	20 ~ 2 000	0.999 8	20
乙酸	y = 0.265 2x + 4.243 3	20 ~ 2 000	0.999 3	20
丙酸	y = 0.407 8x + 0.174 8	20 ~ 2 000	0.999 4	20
丁酸	y = 0.446 1x - 1.590 3	20 ~ 2 000	0.999 4	20
异丁酸	y = 0.472 3x + 3.089 8	20 ~ 2 000	0.999 4	20
戊酸	y = 0.489 7x + 0.385 7	20 ~ 2 000	0.999 4	20
异戊酸	y = 0.500 4x - 0.439 6	20 ~ 2 000	0.999 4	20

注: $x$  为质量浓度,mg/L; $y$  为峰面积。

各酸质量浓度在 5 mg/L 时,如图 4 所示,各个 SCFAs 均有检出,信噪比在 8.4 ~ 15.4,符合信噪比大于 3 作为检出限的要求,所以设置方法检出限为 5 mg/L。

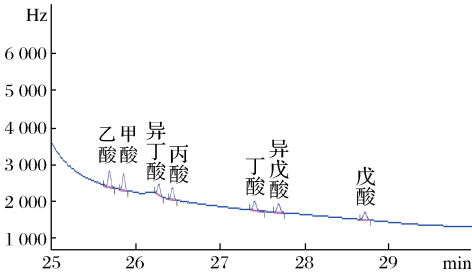


图 4 七种 SCFAs 的检出限色谱图

Fig. 4 The detection limit gas chromatogram of 7 SCFAs

2.4 SCFAs 的加标回收率和精密度

取脱脂乳粉,配制成质量浓度为 100 g/L 的脱脂乳,做 3 个加标浓度,每个加标浓度做 6 个平行,测定回收率和精密度,结果见表 3,结果表明该方法回收率高,重现性好。最低加标浓度设置在定量限上,

表 3 七种 SCFAs 的加标回收率和精密度

Table 3 The recovery and precision of 7 SCFAs mixed standard

物质名称	加标量/(mg · L <sup>-1</sup> )	本底值/(mg · L <sup>-1</sup> )	结果均值/(mg · L <sup>-1</sup> )	回收率/%	RSD/%
甲酸	57.25		178.37	93.57	9.56
	114.50	124.80	248.69	108.20	6.38
	343.50		493.97	107.47	3.97
乙酸	52.10		81.99	102.36	5.09
	104.20	33.96	139.45	100.06	4.39
	312.60		355.80	99.92	3.15
丙酸	21.00		21.49	102.34	3.05
	105.00	0.00	108.25	103.09	3.81
	315.00		331.37	105.20	2.84
丁酸	20.50		22.48	101.58	2.62
	103.00	1.55	104.29	99.74	4.60
	309.00		310.12	99.86	4.01

续表 3

物质 名称	加标量/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	本底值/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	结果均值/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回收率/ %	RSD/ %
异丁酸	20.28	0.00	19.99	98.58	3.78
	101.40		104.30	102.86	3.71
	304.20		321.43	105.67	2.76
戊酸	21.46	0.00	22.63	105.44	2.40
	107.30		111.49	103.90	3.74
	321.90		341.82	106.19	2.88
异戊酸	21.74	0.00	21.58	99.28	3.32
	108.70		111.57	102.64	3.71
	326.10		345.46	105.94	2.78

即质量浓度为20 mg/L;由于甲酸和乙酸本底含量较高,所以甲酸和乙酸的最低加标浓度提高到质量浓度为50 mg/L。加标回收率和结果的相对标准偏差(RSD)均满足实际样品检测的定量要求。

### 3 讨论

本方法中对标准系列进行预处理时,有两种操作可以选择,第一种先调 pH 值再逐级稀释,就是本方法使用的操作;第二种就是先逐级稀释再分别调 pH 值,分别称取甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸各 0.25 g 到同一 100 mL 容量瓶中,用水定容到刻度,混合均匀。之后将此混合标准溶液进行逐级稀释,分别吸取每个级别的混合标准溶液各 4 mL,分别滴加 1~2 滴酚酞,用 KOH 调节至淡粉色,之后分别定容至 5 mL 刻度。经过结果比对区别很小,所以选择先调 pH 值再逐级稀释的方式,简化操作。

本方法预处理过程中用 KOH 调节样品和标准品溶液呈弱碱性,如果不慎 KOH 过量可以用 0.5% 的  $\text{H}_3\text{PO}_4$  水溶液回调,不影响检测结果。

本方法还可以用于其他水系样品或可溶于水的样品的 SCFAs 测定的参考,例如果汁,葡萄酒,粪便等。

### 参 考 文 献

- [1] 农业大词典编辑委员会. 农业大词典[M]. 北京:中国农业出版社,1998:1948.
- [2] 王林云. 养猪词典[M]. 北京:中国农业出版社,2004:208.
- [3] 中国营养学会. 营养科学词典[M]. 北京:中国轻工业出版社,2013:357.
- [4] 贾益群,叶福媛,王双,等. 生物样品中短链脂肪酸的快速提取与分析方法[J]. 实验室研究与探索, 2012,31(7):262-264.
- [5] 陈永福,王记成,云振宇,等. 高效液相色谱法测定传统

- 发酵乳中的有机酸组成[J]. 中国乳品工业,2007,35(1):54-58.
- [6] 李咏如,李徐,陶胜男,等. 反相高效液相色谱法测定 Rancimat 测量池水中的短链脂肪酸[J]. 中国油脂,2017,42(9):126-128.
- [7] 郭宏,刘广福,王凤娇,等. 酸菜发酵有机酸反相高效液相色谱法分析[J]. 中国公共卫生,2015,31(12):1 632-1 634.
- [8] 郭子好,方华,夏志生,等. 反相高效液相色谱法测定发酵豆粕中的乳酸含量[J]. 饲料工业,2014(S1):121-123.
- [9] 郑志,姜绍通,潘丽军,等. 反相高效液相色谱法测定发酵液中乳酸的含量[J]. 食品科学,2003,24(12):89-91.
- [10] 张浩勤,张伟,张翔,等. 气相色谱法测定牛粪厌氧发酵液中挥发性脂肪酸[J]. 郑州大学学报(工学版),2007,28(2):51-53.
- [11] 张树成,张海兰,王维林,等. 功能性便秘儿童粪便短链脂肪酸的气相色谱分析及临床意义[J]. 中华小儿外科杂志,2010,31(4):276-279.
- [12] 赵晓亚,王跃飞,杨帆,等. 气相色谱法快速分析人唾液中 7 种短链脂肪酸[J]. 分析化学,2016,44(7):1 009-1 014.
- [13] 耿梅梅,许丽卫,袁红朝,等. 气相色谱法测定猪结肠内容物中短链脂肪酸含量[J]. 现代生物医学进展,2015,15(6):1 010-1 014.
- [14] 谭力,罗楠,刘放南,等. 非衍生化-气相色谱法测定人血清游离脂肪酸谱[J]. 肠外与肠内营养,2003,10(4):236-238.
- [15] 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.
- [16] FURUHASHI T, SUGITATE K, NAKAI T, et al. Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GC-MS[J]. Analytical Biochemistry,2017, 543:51-54.
- [17] 江振作,王跃飞,陈荣荣,等. 顶空气相色谱-质谱联用法分析粪便中挥发性脂肪酸[J]. 分析化学,2014,42(3):429-435.
- [18] 赵晓亚,江振作,王跃飞. 人的粪便、血浆、唾液、呼出气体中短链脂肪酸的分析[J]. 中国微生物学杂志,2015,27(2):130-134.
- [19] 招云芳,陆舍铭,王海利,等. 顶空气相色谱质谱法快速测定液体食品中的挥发性酸[J]. 分析测试学报,2009,28(12):1 456-1 459.
- [20] 米智慧,陈永福,张和平. 超高效液相色谱质谱联用技术在发酵乳有机酸分析中的应用[J]. 中国乳品工业,2017,45(12):37-39.
- [21] 谭力,鞠焜先,黎介寿. 生物样品中短链脂肪酸的提取与测定[J]. 色谱,2006,24(1):81-87.
- [22] 关家锐,邓丛蕊,王吉顺,等. 衍生化反相高效液相色谱测定葡萄酒中有机酸的研究[J]. 色谱,1993,11(5):282-285.

## Determination of 7 short-chain fatty acids in fermented milk by gas chromatography

DING Yan<sup>\*</sup>, WANG Juan, ZHANG Di

(Ofmom nutrition R&D center, Ofmom China Co. Ltd., Beijing 101300, China)

**ABSTRACT** Established a method for detecting the 7 short-chain fatty acids (formic acid, acetic acid, propanoic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, isovaleric acid) in the fermented milk by gas chromatography (GC). The samples were pretreated by derivation, separated by chromatographic column, qualitative analysis by retention time and quantitative analysis by peak area. All the linear ranges of 7 short-chain fatty acids were 20–2 000 mg/L, the limits of quantitation were 20 mg/L, the limits of detection were 5 mg/L, the correlation coefficients ( $R^2$ ) were greater than 0.999, the recovery range was 93.57%–108.20%, the relative standard deviation (RSD) range of the results was 2.40%–9.56%. The method is accurate, sensitive and reproducible and can be used to detect the content of short-chain fatty acids in the fermented milk.

**Key words** short-chain fatty acids (SCFAs); gas chromatography; fermented milk

(上接第 201 页)

## Beer taste evaluation using electronic tongue and the relationship between sensor information and flavor compounds

LIU Jia<sup>1</sup>, HUANG Shuxia<sup>2,3</sup>, YU Junhong<sup>2,3</sup>, HU Shumin<sup>2,3\*</sup>,  
YANG Zhaoxia<sup>2,3</sup>, HUANG Shuli<sup>2,3</sup>, ZHANG Yuxin<sup>2,3</sup>

1 (Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Bioengineering College of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

2 (State Key Laboratory of Biological Fermentation Engineering of Beer, Tsingtao 266000, China)

3 (Tsingtao Brewery Co. Ltd, Tsingtao 266000, China)

**ABSTRACT** To study the application of electronic tongue on distinguishing flavor and quantitative taste evaluation amongst different beers of the same category, 30 samples were collected and analyzed by taste evaluation, electronic tongue and flavor chemical analysis. The data were analyzed by principal component analysis and partial least squares regression. According to taste signals from the electronic tongue combined with principle component analysis, flavor characteristics of 30 samples were differentiated sensitively. The taste evaluation model was constructed by partial least squares regression of data based on the sensory scores and data using electronic tongue detection and the relationship between electronic tongue detected data and 40 flavor compounds was established. Results showed that ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), organic acid (formic acid), polysaccharides (malto-oligosaccharides), oligopeptides, total polyphenol, and alcohols were the main factors influencing the electronic tongue taste information. Additionally, the same flavor compound affected the taste signals from different sensors differently. Based on relevant research, materials that affected the taste signals from different sensors were clarified, as well as the sensory mechanism of the electronic tongue. This study provides the technology and theoretical basis for an objective, accurate and fast method for sensory evaluation and flavor regulation.

**Key words** electronic tongue, taste information, mouthfeel evaluation, influence factors