

反相高效液相色谱法测定食品中的植酸

陈家华

(上海进出口商品检验局, 200002)

植酸(phytic Acid)存在于多种谷物食品中, 其是谷物食品中磷的主要贮存方式。人类对植酸利用率极低, 植酸的强螯合能力影响人体对必需元素 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 的吸收和它们的生物学活性(1), 植酸还抑制胃蛋白酶、 α -淀粉酶和胰蛋白酶的活性(2-4), 因此几十年来一直是研究的重要课题。植酸测定方法有沉淀法(5), 上清液差值法(6)和AOAC阴离子交换法(7)。本文介绍一种改进的阴离子交换-HPLC法, 它具有操作简便, 直接定量准确和灵敏度高的特点。

实验部分

(一) 仪器 HPLC为 Water's 产品, 配备510型泵, U6K进样器, 490E紫外检测器, R401示差检测器, Z型径向加压柱(备 Micro-Bondpak C_{18} , 10cm×8mm I.D., 10 μ m) C_{18} 预柱和 485 型积分仪。

(二) 试剂 1. 阴离子交换树脂AG1-X8(Cl⁻型, 200—400目) (Bio-Rad Laboratories 产品)。2. 流动相溶液, 5mmol/L 醋酸钠(A, B) 3. 植酸(Sigma 试剂)。4. 植酸标准工作溶液: 用流动相溶液精确配制浓度为2mg/ml。

(三) 植酸的测定 1. 离子交换色谱柱的制

备: 称取0.5gAG1-X8树脂, 在0.7×15cm玻璃柱内湿法装柱。2. 样品测定: 1g磨碎试样加入20ml 0.5mol/L HCl溶液(含脂量高的样品用乙醚先脱脂3次)置振荡器上振摇30min, 10000rpm离心20min, 吸取上清液5ml, 用纯水定容25ml, 混匀后全部移入离子交换柱。用0.1mol/L HCl溶液10.5ml分二次洗柱, 弃洗出液用10ml 2mol/L HCl溶液洗脱植酸(流速0.2ml/min)收集10ml洗脱液, 取其中0.4ml在80℃水浴上用N₂气吹至近干, 置真空干燥器中过夜, 加入0.1ml流动相, 混匀后取5 μ l注入HPLC仪进行测定, 注入5 μ l标准工作溶液, 用外标法计算样品中植酸含量。3. 比色法对照试验, 取0.5mol/L HCl溶液抽提液, 用FeCl₃沉淀植酸, 按照Graf & Dintzis(8)叙述的方法测定样品中植酸含量。

结果与讨论

(一) 植酸色谱条件及其准确试验 植酸能与多种化合物螯合生成沉淀, 这给 HPLC 测定植酸时流动相选择带来了困难, 试验了数种pH的磷酸缓冲液和不同离子强度的醋酸钠溶液表明 5mmol/L 醋酸钠溶液为流动相较为理想, 色谱图见图 1。为提高色谱分离度, 增加tr, 试验了几种离子对试

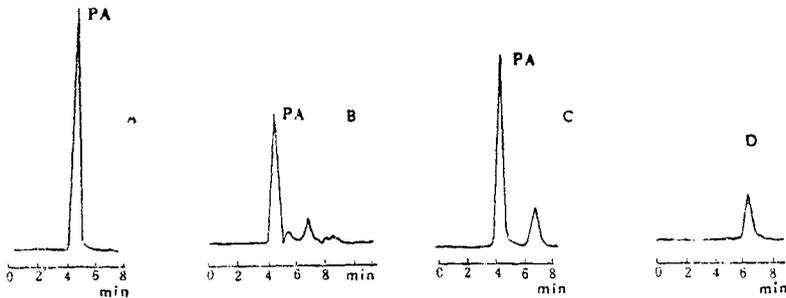


图1 植酸色谱图

A. 植酸标准(2 μ g), B. 咖啡样品, C. 大麦样品, D. 大麦+FeCl₃样品, 色谱条件: 流动相5mmol/L NaAc, 流速0.5ml/min, UV 254nm。

剂,但由于植酸与四丁基胺等配对离子螯合形成不溶物未取得成功。植酸定量可采用紫外和示差二种检测器。试验表明示差检测器灵敏度约为紫外的二倍,但其温度稳定性差,多种离子化合物示差检测器均有响应,其干扰植酸测定,为此本文采用UV 254nm测定植酸,谷物中植酸含量通常在1—3%,而本文规定条件下植酸最小检知量为100ng,灵敏度是令人满意的,植酸测定的准确试验,除用保留时间和峰面积增加方法定性外,还用FeCl₃结合植酸沉淀的特性做了进一步验证,样品中加入FeCl₃后用同样条件抽提和测定植酸峰便消失,进一步证明4.6min峰系植酸峰,见图1。

(二) 标准曲线 配制0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/ml植酸标准溶液系列,每种浓度重复测定三次,结果用最小二乘法回归分析得标准曲线 $G = 0.1233 + 0.8468A$ 峰面积和植酸量的相关系数 $r = 0.9998$ 。

(三) 离子色谱除去蛋白质干扰和植酸的回收 0.5mol/L盐酸溶液抽提植酸时大量可溶性蛋白被同时提取,干扰植酸测定。本法将提取液用水稀释盐酸浓度为0.1mol/L,蛋白质带正电荷,其在AG1-X8柱上不被吸附,用0.1mol/L盐酸液冲洗柱可洗去干扰植酸测定的蛋白质,实验也表明0.1mol/L盐酸洗柱不影响植酸的回收,植酸平均回收为96.8%,结果见表1。

(四) Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺对植酸测定的影响 食品中含有大量的Ca²⁺、Mg²⁺和一定量的Zn²⁺、Fe³⁺,它们极易与植酸螯合,为考察它们对本法的影响,实验采用加入金属离子的方法测定植酸的回收,试验表明一般食品中Ca、Mg、Zn、Fe对植酸测定无影响,但Fe含量超过500ppm时植酸回收低于86%,Fe含量达2000ppm时回收只有40%。

(五) 食品中植酸含量测定 用本法对部分食品进行了测定,与比色法进行了对照试验,经“Student-Test”显著性差异测定, $t = 0.65 < t_{0.05, 2.45}$ ($p = 0.05$)表明二种方法无显著差异,结果见表2。

参考文献

(一) J. W. Erdman. J. Am. Oil Chem Soc., 56,

表1 AG1-X8柱用0.1mol/L HCl冲洗植酸回收

0.1mol/L HCl(ml数)	植酸回收(%)
10	98.5±2.7
50	96.6±1.8
100	94.7±0.6
150	97.4±0.3

表2 食品植酸测定结果

品 种	本法测得值(%)	比色法测得值(%)
咖 啡	0.79	0.81
大 麦	1.29	1.37
黄 豆	1.47	1.53
含糖豆粉	0.53	0.47
花 生	1.82	1.83
小 麦	1.65	1.67

736(1979).

- (2) M. C. Camus, J. D. Laporte, Ann. Biol. Anim, Biochem, Biophys., 16, 719(1976).
- (3) C. B. Sharma, M. Goel, M. Irshad, Phytochemistry, 17, 21(1978).
- (4) Madhar, Singh. A. D. Krikorian, J. Agric Food. Chem., 30, 799(1982).
- (5) W. Heubner, H. Stadler, Biochem., 64, 422(1914).
- (6) D. Oberleas, Method Biochem. Anal., 20, 87(1971).
- (7) B. Harland, D. J. Oberleas Assoc Off Anal. No4.169(4), 667(1986).
- (8) E. Graf, F. R. Dintzis, Anal. Biochem., 119, 413(1982).

(收稿日期: 1989年3月1日)

Determination of Phytic Acid in Foodstuffs by RPHPLC Chen Jiahua Shanghai Import and Export Commodity Inspection Bureau (20002)

An RPHPLC method for determination of phytic acid is described. After extraction with 0.5mol/LHCl, filtration, dilution with H₂O, and elution on AG1-X8 with 2mol/L HCl, phytic acid was determined on μ Bondapak C₁₈ column. This method is simple, sensitive, specific, accurate and is not interfered with high concentration of protein and cations in food. The method has successfully been applied to determine the phytic acid in different foods. The results were satisfactory, in comparing with those from colorimetry.