

反相高效液相色谱法同时测定枇杷中的某些有机酸

郭根和¹, 潘 葳¹, 苏德森¹, 饶秋华¹, 何志刚², 陈涵贞¹

(1. 福建省农业科学院中心实验室, 福建 福州 350003;

2. 福建省农业科学院果树研究所, 福建 福州 350013)

摘 要: 采用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 测定枇杷果实中的有机酸成分和含量, 结果表明, 在以 Waters μ BondapakTM C₁₈ 为色谱柱, 使用紫外检测器 (波长 214 nm), 0.04 mol · L⁻¹ KH₂PO₄ - H₃PO₄ 缓冲液作流动相 (pH 2.4), 流速为 0.8 ml · min⁻¹, 柱温为 30℃ 的色谱条件下, 枇杷有机酸能得到良好分离, 其中 9 种有机酸标准曲线相关系数达 0.999 3 以上, 平均回收率为 85%~102%, 变异系数 RSD < 5.05%。

关键词: 反相高效液相色谱法; 枇杷; 有机酸

中图分类号: Q 94-331

文献标识码: A

Determination of some organic acids in the fruits of loquat by RP-HPLC

GUO Gen-he¹, PAN Wei¹, SU De-sen¹, LAO Qiu-hua¹, HE Zhi-gang², CHEN Han-zhen¹

(1. Central Laboratory, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China;

2. Institute of Pomology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: A RP-HPLC method with UV detector was established to determine the organic acids in the fruits of loquat. The chromatographic conditions were Waters μ BondapakTM C₁₈ (3.9 mm i.d × 300 mm, 10 μ m) used for column (at 30℃) with 0.04 mol · L⁻¹ KH₂PO₄ - H₃PO₄ buffer (pH 2.4) as mobile phase, and flow rate 0.8 ml · min⁻¹, detector UV-214 nm. The correlation coefficients of the calibration graphs were 0.9993-0.9999. The averaged recoveries were 85%-102%, RSD < 5.05%.

Key words: Reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC); Loquat; Organic acid

枇杷果肉中含有机酸、果胶、糖类、脂类、蛋白质等营养成分, 其中有机酸能刺激消化腺的分泌活动, 有增进食欲、帮助消化吸收及止渴解暑的功能。目前, 关于食品中有机酸研究的报道有很多^[1~11], 但关于枇杷有机酸测定研究的报道较罕见, 仅见福建农林大学采用离子交换色谱法测定枇杷中有机酸的报道^[12]。本试验采用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 测定枇杷果实中的有机酸, 分析了枇杷果实中有机酸的成分和含量。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试枇杷为早钟 6 号和解放钟两个品种 (由福建省农科院果树所提供), 每个品种均按果实不同成熟度的颜色分为青、黄、红 3 组。

1.2 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, Waters 2996

二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站, PHILIPS 搅拌机 (珠海经济特区飞利浦家庭电器有限公司), 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 离心机 (美国贝克曼库尔特有限公司), XW-80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂), pH 计 (上海埃依琪实业有限公司), 恒温水浴锅 (江苏省金坛市中大仪器厂), 微量可调移液器 (eppendorf)。

1.3 试剂及其配制

0.04 mol · L⁻¹ KH₂PO₄ - H₃PO₄ 缓冲溶液: 称取磷酸二氢钾 5.44 g, 用水溶解并定容至 1 000 ml, 用磷酸调 pH 至 2.4, 然后用 0.45 μ m 孔径的水相滤膜过滤, 再经超声波脱气, 即为流动相。

9 种有机酸标准溶液的配制: 分别准确称取草酸 250 mg、酒石酸 150 mg、丙酮酸 20 mg、苹果酸 5 g、柠檬酸 103 mg、琥珀酸 50 mg、富马酸 10 mg, 吸取乳酸 0.5 ml、乙酸 0.5 ml 置于 100 ml 棕色容量瓶中, 用流动相溶液溶解并定容至刻度。上机绘制

标准曲线前,先用0.45 μm 样品过滤器过滤。

上述试剂配制时所用的水均为二次蒸馏水,磷酸、磷酸二氢钾、有机酸标准品均为分析纯。

1.4 样品前处理

枇杷去皮、去核、搅碎、匀浆。称取25 g于50 ml容量瓶中,加一定的流动相溶液,于75℃水浴加热浸提45 min,冷却至室温,定容。旋涡振荡2 min,超声提取15 min,过滤。取一定量的滤液,以10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心10 min,分离沉淀蛋白质、果胶等干扰物质,取上清液用0.45 μm 孔径的滤膜过滤,滤液上机分析(分析时进样10 μl),外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 检测器的选择 由于这9种有机酸均有紫外吸收,紫外检测器能得到很高的灵敏度,因此本法选用紫外检测器。

2.1.2 检测波长的确定 用二极管阵列检测器采集9种有机酸的紫外吸收光谱图,结果显示,在210~220 nm处,9种有机酸都有较大的吸收值,虽然在210 nm处响应值最大,但为了使紫外吸收更稳定,故选定紫外检测波长为214 nm。

2.1.3 柱温的确定 随着柱温的升高,色谱峰的保留时间减小,即测定一个样品所需的时间越短,同时柱温越高,色谱峰形越理想,但柱温太高会影响色谱柱的使用寿命。选择柱温30℃时,一个样品的测定可以在12 min内完成,测定时间和峰形都较理

想,因此本法柱温选择30℃。

2.1.4 流速的确定 随着流速增大,色谱峰的保留时间减小,即测定一个样品所需的时间越短,同时色谱峰的峰面积增加,即灵敏度升高,但流速增大会增加系统的压力。流速为0.8 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,测定时间为12 min,此时系统压力适中,灵敏度也足够高,因此本法采用流速为0.8 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.1.5 流动相的选择及其pH值的确定 甲醇—水系统和磷酸盐缓冲液系统是在十八烷基柱中应用最广的流动相,经试验发现,后者适于分析有机酸。在本方法中,如果仅用磷酸作为流动相,则草酸的色谱峰形不理想,因此本法采用磷酸二氢钾缓冲溶液作为流动相。此外,由于流动相的pH值对有机酸保留时间有很大的影响^[11],因此,通过调节流动相的pH值(pH2.3、2.4、2.5、2.6、2.8)对9种有机酸进行检测,结果发现,在不同pH值下有机酸的保留时间都不同,pH值为2.3、2.4时9种有机酸得到有效分离,pH值为2.5、2.6、2.7时有机酸的分离不够理想,且9种有机酸出峰的先后顺序会发生颠倒。鉴于pH值太低会影响色谱柱的使用寿命,本法采用流动相的pH值为2.4。

综上所述,本法采用的色谱条件为:色谱柱: $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}\text{C}_{18}$ 3.9 mm (i. d.) \times 300 mm、10 μm ;流动相:0.04 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--H}_3\text{PO}_4$ 缓冲溶液,pH2.4;流速:0.8 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温:30℃;检测器:紫外检测器;检测波长:214 nm。在此色谱条件下,9种有机酸得到有效分离(图1)。

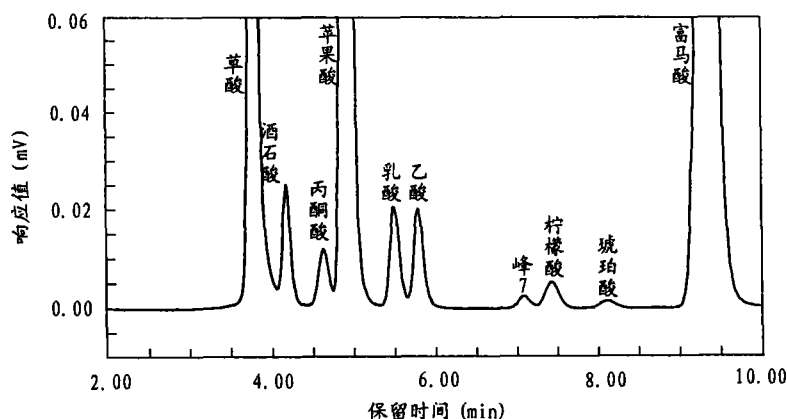


图1 9种有机酸混合标准品的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of themixed solution of organic acid

2.2 线性分析

以标准有机酸的一系列浓度,按上述色谱条件每种浓度进样10 μl 。分别以各成分的峰面积 y 对标准工作溶液的质量浓度 x ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)进行线性回归分析,结果和检出限(信噪比 $S/N > 2$)列于表1。从表1可看出,线性范围内线性良好。

2.3 回收率检测分析

在已知有机酸含量的枇杷样品中添加一定浓度的有机酸标准溶液,涡动混合5 min后,静置10 min(这时添加的各有机酸的浓度分别为:草酸 250

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酒石酸 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、丙酮酸 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、苹果酸 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、乳酸 603 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、乙酸 525 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柠檬酸 103 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琥珀酸 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、富马酸 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。以1.4方法处理后,按上述色谱条件进行检测,共测定5次,计算9种有机酸的加标回收率和精密度。结果表明(表2),除乙酸外,其它有机酸回收率都在90%以上。说明回收率良好,精密度亦较理想。乙酸的回收率稍低是因为乙酸具有挥发性,在样品前处理中易受损失。

表1 回归分析和检出限

Table 1 Regression analysis and detection limit

有机酸	回归方程	相关系数	线性范围 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	检出限 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
草酸	$y = 1.94 \times 10^6 x + 5.64 \times 10^5$	0.9995	125~2500	2.0
酒石酸	$y = 4.37 \times 10^5 x + 9.94 \times 10^4$	0.9995	76~1530	1.5
丙酮酸	$y = 3.06 \times 10^5 x + 7.35 \times 10^4$	0.9994	10~200	0.2
苹果酸	$y = 2.21 \times 10^5 x + 1.15 \times 10^6$	0.9999	2500~50000	5.0
乳酸	$y = 1.27 \times 10^5 x + 7.84 \times 10^4$	0.9996	300~6000	6.0
乙酸	$y = 1.46 \times 10^5 x + 7.20 \times 10^4$	0.9997	260~5250	5.2
柠檬酸	$y = 8.47 \times 10^4 x + 8.23 \times 10^3$	0.9994	50~1000	10.0
琥珀酸	$y = 5.47 \times 10^5 x + 2.84 \times 10^4$	0.9993	25~500	5.0
富马酸	$y = 1.35 \times 10^8 x + 1.46 \times 10^6$	0.9998	5~110	0.001

表2 回收率检测结果($n=5$)

Table 2 The result of recoveries($n=5$)

有机酸	平均回收率 (%)	RSD (%)	有机酸	平均回收率 (%)	RSD (%)
草酸	102.5	2.63	乙酸	85.1	4.01
酒石酸	99.8	2.51	柠檬酸	92.6	2.84
丙酮酸	96.4	3.14	琥珀酸	93.1	5.05
苹果酸	100.2	0.23	富马酸	95.8	4.12
乳酸	93.4	1.92			

注:回收率是在青、黄、红3种不同成熟度的枇杷添加标样后的测定结果,其结果具有一致性。

2.4 枇杷果实中有机酸含量的分析

将供试材料以1.4方法处理后,按上述色谱条件对枇杷果实中有机酸含量进行检测分析。试验采用以标准物保留时间为对照,以及添加标准物视峰面积增加的方法定性、外标法定量,结果见表3。其中成熟早钟6号枇杷果实有机酸的色谱图见图2。

由图2可见,早钟6号枇杷果实有机酸的色谱图

中共出现10个峰,各色谱峰分离良好,即在此色谱条件下枇杷中的有机酸能得到良好分离。同时定性分析表明,成熟的枇杷果实中含有草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、富马酸。图2中,3号峰的保留时间($t_R=4.557$)与丙酮酸的保留时间($t_R=4.764$)虽然接近,但经标准添加试验证明该峰不是丙酮酸。此外,图2中1号、2号、4号色谱峰没有定性,这3个可能是奎尼酸和顺乌头酸等枇杷特有的有机酸。

从表3可见,成熟的枇杷果实中含有草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、富马酸,未成熟的果实中不含柠檬酸,而且有机酸以苹果酸为主(这与陈发兴等^[12]采用离子交换色谱法的检测结果一致),其次是含有乳酸、草酸、酒石酸、柠檬酸、富马酸(含量很低),另外,还可能含有奎尼酸和顺乌头酸,这与陈发兴等^[12]检测的结果略有差别,有待在将来的研究中进一步考证。

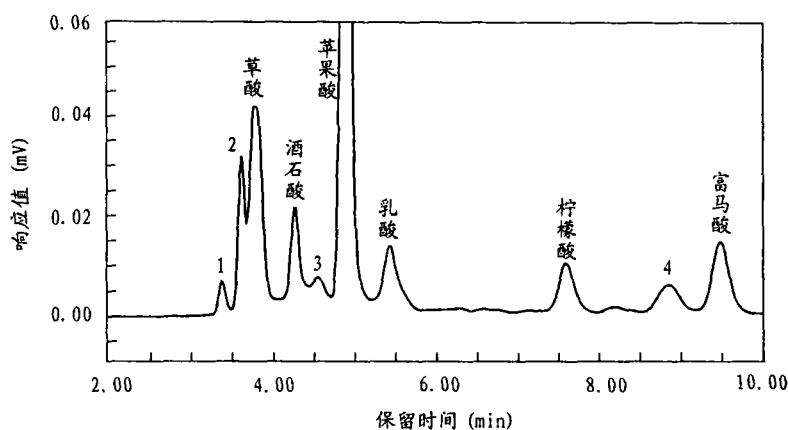


图2 成熟早钟6号枇杷果实中有机酸的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of organic acid in the matured fruits of loquat Zaozhong 6

表3 枇杷中有机酸含量

Table 3 Contents of organic acid in fruits and juices

有机酸	早钟6号($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			解放钟($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	青	黄	红	青	黄	红
草酸	0.39	0.40	0.54	0.19	0.20	0.26
酒石酸	0.31	0.30	0.30	0.25	0.24	0.25
丙酮酸						
苹果酸	12.40	11.59	3.49	9.38	9.25	5.44
乳酸	1.18	1.27	0.54	1.16	1.10	0.58
乙酸						
柠檬酸			0.17			0.19
琥珀酸						
富马酸	0.006	0.006	0.009	0.00067	0.00069	0.00069

3 小 结

3.1 本方法检测结果显示, 9种有机酸的回收率在85.1%~102.5%之间, RSD 值在0.23%~5.05%之间, 回收率和重现性均可满足定量分析要求, 因此, 本方法可用于枇杷中有机酸分析。

3.2 采用反相高效液相色谱测定枇杷中的有机酸, 在使用磷酸二氢钾缓冲液为流动相进行初始柱平衡时, 一般要求时间在1.5 h以上, 因为如果平衡时间不够, 保留值较大的色谱峰特别是富马酸的保留值重现性会很差。因此, 测试时应证实保留值能够重现后再进行测定, 以保证色谱柱平衡和数据重现性。

3.3 在前处理过程中, 从枇杷中提取的滤液一定要以 $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上速度进行离心, 这样才能有效沉淀蛋白质、果胶等干扰物质, 防止干扰物质损

坏色谱柱和污染检测器的检测池。

参考文献:

- [1] 郭德华, 夏琳. 离子排斥法同时测定果汁中11种有机酸[J]. 色谱, 2001, 19 (3): 276-278.
- [2] 丁明玉, 陈培榕, 罗国安. 食品中有机酸的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 1997, 15 (3): 212-215.
- [3] 毕丽君, 张骊, 张鸿发. 固相萃取高效液相色谱法分析酱油中的有机酸[J]. 分析化学, 2000, 28 (11): 1391-1394.
- [4] 赵景婵, 郭治安, 常建华, 等. 有机酸类化合物的反相高效液相色谱法的分离条件研究[J]. 色谱, 2001, 19 (3): 260-263.
- [5] SHAUL P. Monselise and david galily, organic acids in grapefruit tissues [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1979, 104 (6): 895-897.
- [6] 高诚伟, 康勇, 雷泽模, 等. 皱皮木瓜中有机酸的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21 (4): 319-321.
- [7] 罗安才, 杨晓红, 邓英毅, 等. 柑橘果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化[J]. 中国农业科学, 2003, 36 (8): 941-944.
- [8] 谢文逸. 酒类酸度及有机酸分析进展[J]. 酿酒科技, 2002, 110 (2): 81-82.
- [9] 田鹏, 徐烨, 李莹, 等. 离子排斥色谱法测定十二种有机酸的研究[J]. 分析科学学报, 2001, 17 (6): 483-485.
- [10] Ding C K, Chachin K, Ueda Y, et al. Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Loquat Fruit [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46 (10): 4144-4149.
- [11] 宋永康, 郭嘉, 潘薇. 影响测定反相高效液相色谱流动相pH值的因素[J]. 现代科学仪器, 2005 (1): 95-97.
- [12] 陈发兴, 刘星辉, 林华彰, 等. 离子交换色谱法测定枇杷果实和叶片中的有机酸[J]. 福建农林大学学报, 2004, 33 (2): 195-199.

(责任编辑: 林树文)