

反相高效液相色谱法测定果汁中 11 种有机酸条件的优化

高海燕¹ 廖小军¹ 王善广² 胡小松^{* 1}

¹ (中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083) ² (国家农产品保鲜工程技术研究中心, 天津 300112)

摘 要 提出了一种利用高效液相色谱同时分析果汁中 11 种有机酸的优化的方法。在 Prontosil 120-10- C_{18} H (10 μ m, 4.6 mm i.d. \times 250 mm) 色谱柱上, 3% CH_3OH -0.01 mol/L K_2HPO_4 (pH 2.55) 溶液做流动相, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}C$, 紫外检测波长为 210 nm 时, 可以较好地分离和测定果汁中常见的 11 种有机酸。该方法相对标准偏差 0.31% ~ 1.59%, 回收率 96.8% ~ 102.0%, 各种酸的线性相关系数 $r > 0.9996$, 具有较高的准确度和精确度, 方法简便, 可应用于果汁中有机酸的检测。

关键词 反相高效液相色谱, 有机酸, 果汁

1 引 言

有机酸是果汁酸味的主要成分, 其种类和含量高低与果汁的品质和风味有极密切的关系^[1,2]。原果汁营养丰富, 但由于生产成本较高, 果汁的掺假行为经常发生, 对天然果汁的真伪鉴定是当今国内外检验的一个热点^[3]。不同种类天然果汁中, 有机酸的种类和含量差别很大。在一定条件下, 可以通过测定各种有机酸的含量来鉴别果汁饮料掺假与否^[4]。因此, 果汁中多种有机酸的分析测定具有重要的意义。

反相高效液相色谱法是近几年来发展较快的方法, 然而现有的报道仅限于 6 ~ 7 种有机酸的分离^[2,5-7]。本研究通过优化反相 C_{18} 柱的色谱条件, 可同时分离测定果汁中的 11 种有机酸, 便捷、快速、准确。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统: K-1001 型输液泵、K-1500 溶剂混合器、K-2501 型可变波长紫外检测器 (德国 Knauer 公司); AT-150 型柱温箱 (奥德赛斯公司); 酸度计 (奥立龙 868)。色谱纯草酸、酒石酸、奎宁酸、苹果酸、莽草酸、抗坏血酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、富马酸、琥珀酸 (Sigma 公司); 色谱纯甲醇 (天津康科德科技公司); 分析纯磷酸、磷酸氢二钾 (北京新工化学试剂厂)。

2.2 色谱条件

色谱柱: Prontosil 120-10- C_{18} H (10 μ m, 4.6 mm i.d. \times 250 mm); 流速: 0.5 mL/min; 进样体积: 20 μ L; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 $^{\circ}C$; 流动相: 用二次蒸馏水配制不同浓度及 pH 值的 K_2HPO_4 溶液。

2.3 有机酸标准溶液

准确称取酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、抗坏血酸、奎宁酸和莽草酸各 125 mg, 富马酸 25 mg, 草酸 50 mg, 琥珀酸 375 mg, 柠檬酸 250 mg, 用流动相溶解并定容至 50 mL 容量瓶中。上述溶液配制成不同浓度的混标, 用 0.45 μ m 的滤膜过滤后, 上机绘制各种有机酸的标准曲线。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的确定

用 200 ~ 350 nm (紫外) 光对 11 种有机酸的标准溶液进行扫描, 结果表明 11 种有机酸均在 210 nm 附近有较强的吸收, 重复性好, 不受流动相中其他物质的干扰, 故以下实验均采用 210 nm 波长进行检测。

3.2 流动相浓度的选择

2003-10-08 收稿; 2004-03-29 接受

本文系国家“十五”科技攻关课题基金资助项目 (No. 2001BA501A07)

将流动相分别配成 0.03 0.06 0.09 0.12 0.15 0.18 和 0.21 mol/L 的 K_2HPO_4 溶液 (用 H_3PO_4 调 pH 值为 2.65) 对标准溶液中的各有机酸进行分离。结果表明:当流动相中不含有磷酸盐时,各有机酸分离效果不好,逐步增加流动相中磷酸盐的浓度,有机酸均能得到分离,且不影响分离效果。由于高浓度的盐会对泵和柱子的寿命产生影响,所以本实验选用 0.01 mol/L 的 K_2HPO_4 作为流动相。

3.3 流动相 pH 值的选择

以不同 pH 值 (用 H_3PO_4 调节) 的 0.01 mol/L 的 K_2HPO_4 溶液作流动相,测定各有机酸的保留时间,结果显示流动相 pH 值对有机酸的分离影响很大 (见图 1)。当 pH 值为 2.0 时,琥珀酸和富马酸完全不能分开;逐步提高 pH 值,11 种有机酸逐渐得到分离,但柠檬酸和富马酸、酒石酸和奎宁酸的分离度却逐渐减小;当 pH 值为 3.0 时,柠檬酸和富马酸、酒石酸和奎宁酸不能有效分离;当 pH 值为 3.2 时,部分有机酸的出峰顺序发生变化。由于 pH 值小于 2.5 的溶液会影响色谱柱的寿命,经综合考虑,最后选择 pH 值为 2.6 磷酸盐缓冲溶液。

3.4 流动相中甲醇含量的选择

在流动相中加入少量甲醇,能有效的改善峰形。以 0.01 mol/L 的 K_2HPO_4 (pH 2.6) 溶液作流动相,对不同的甲醇含量 (0.1%、2%、3%、4%、5%) 对色谱分离的影响进行了比较,结果表明,随着流动相中甲醇含量的增加,有机酸的疏水端基与固定相的相互作用减弱,保留时间下降,3% 的甲醇-缓冲溶液 (V/V) 分离度和峰形较好。

3.5 其它条件选择

以 3% $CH_3OH-K_2HPO_4$ (pH 2.6) 溶液作流动相比较了柱温、流速对保留时间的影响。结果发现:流速 1.0 mL/min 时,分离度降低,柱压升高,不利于色谱柱的保护和长期使用,而柱温增高则会加快传质过程,缩小分离度。因此,选择在室温 (30 °C) 及 0.5 mL/min 流速下进行测定。

3.6 分离条件的优化

以 4 因素 3 水平的正交试验 (流动相 pH 值、甲醇含量、流速和柱温) 对分离条件进行优化,以卢佩章等^[8] 提出的 HCRF 为优化指标,最终得到优化的条件:(1)流速 0.5 mL/min;(2)流动相 3% $CH_3OH-0.01 mol/L K_2HPO_4$ (pH 2.55);(3)柱温 30 °C。图 2a 为该条件下测定的有机酸的标准色谱图,11 种有机酸均得到有效分离。

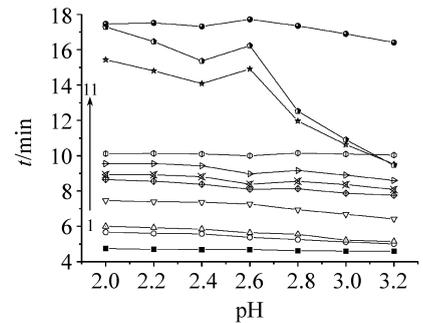


图 1 流动相 pH 对保留时间的影响

Fig.1 Effect on retention time of organic acid by pH value of mobile phase

1. 草酸 (oxalic acid); 2. 酒石酸 (tartaric acid); 3. 奎宁酸 (quinic acid); 4. 苹果酸 (malic acid); 5. 莽草酸 (shikimic acid); 6. 抗坏血酸 (ascorbic acid); 7. 乳酸 (lactic acid); 8. 乙酸 (acetic acid); 9. 柠檬酸 (citric acid); 10. 富马酸 (fumaric acid); 11. 琥珀酸 (succinic acid)。

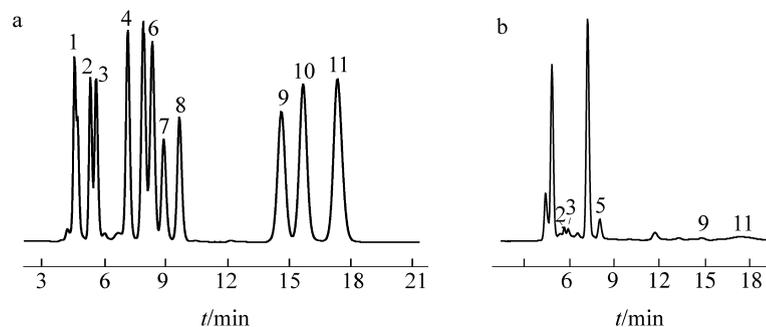


图 2 有机酸标样 (a) 和苹果汁 (b) 的色谱图

Fig.2 Chromatogram of organic acid standards mixtures (a) and apple juice (b)

1. 草酸 (oxalic acid); 2. 酒石酸 (tartaric acid); 3. 奎宁酸 (quinic acid); 4. 苹果酸 (malic acid); 5. 莽草酸 (shikimic acid); 6. 抗坏血酸 (ascorbic acid); 7. 乳酸 (lactic acid); 8. 乙酸 (acetic acid); 9. 柠檬酸 (citric acid); 10. 富马酸 (fumaric acid); 11. 琥珀酸 (succinic acid)。

3.7 标准曲线、检出限、精密度及回收率

取同一苹果汁样品 2 份,其中一份作本底(苹果汁样品色谱图见图 2b),另一份添加一定量的 11 种有机酸标品溶液后测定各成分含量,每份样品进行 5 次平行测定,考察方法的回收率和精密度,以峰高 A (mV)对质量浓度 C (mg/L)求得线性回归方程,以 3 倍信噪比 (S/N)计算最小检出限量,结果见表 1。可见该方法定量准确灵敏、重现性好、回收率高。

表 1 回归分析和检出限

Table 1 Regression analysis and detection limit

有机酸 Organic acid	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Detection limit (mg/L)	RSD (%)	回收率 Recovery (%)
草酸 Oxilic acid	$C = -0.0891 + 1.846 \times 10^{-5} A$	0.9999	0.04	0.97	102.0
酒石酸 Tartaric acid	$C = -0.0879 + 1.14 \times 10^{-4} A$	0.9996	0.09	1.43	98.8
奎宁酸 Quinic acid	$C = 0.0568 + 4.07 \times 10^{-4} A$	1.0000	0.30	0.87	99.4
苹果酸 Malic acid	$C = -0.2998 + 2.983 \times 10^{-4} A$	0.9999	0.50	0.31	100.1
莽草酸 Shikimic acid	$C = -0.0036 + 5.469 \times 10^{-6} A$	1.0000	0.01	0.89	100.1
抗坏血酸 Ascorbic acid	$C = -0.0019 + 2.464 \times 10^{-5} A$	0.9998	0.03	1.59	96.8
乳酸 Lactic acid	$C = 0.3574 + 6.898 \times 10^{-4} A$	1.0000	0.54	1.16	98.2
醋酸 Acetic acid	$C = -0.0345 + 4.915 \times 10^{-4} A$	1.0000	0.73	1.10	97.9
柠檬酸 Citric acid	$C = 0.0158 + 4.936 \times 10^{-4} A$	0.9999	0.50	0.96	99.5
富马酸 Fumaric acid	$C = -0.0007 + 4.164 \times 10^{-6} A$	0.9999	0.02	0.79	99.2
琥珀酸 Succinic acid	$C = 0.225 + 1.05 \times 10^{-3} A$	1.0000	2.00	1.53	99.6

3.8 果汁样品中有机酸的定量分析结果

实验选用了苹果、梨、脐橙进行了有机酸的测定,原料经一定的制汁工序处理后,用流动相进行适当的稀释定容,经 0.45 μm 膜过滤后测定。结果表明:天然水果原汁中各种有机酸的含量和种类差别很大,在一定条件下,可以用此方法来鉴别果汁饮料的质量(表 2)。

表 2 果汁中有机酸含量 (mg/L)

Table 2 Contents of organic acid in fruit juices (mg/L)

果汁样品 Sample	草酸 Oxilic acid	酒石酸 Tartaric acid	奎宁酸 Quinic	苹果酸 Malic acid	莽草酸 Shikimic acid	抗坏血酸 Ascorbic acid
鲜榨脐橙汁 Orange juice	34.25	-	728.75	865.00	-	552.25
鸭梨清汁 Ya pear juice	-	44.18	226.90	1020.75	76.88	-
黄元帅苹果清汁 Golden delicious apple juice	-	57.55	200.38	4085.00	7.53	-
果汁样品 Sample	乳酸 Lactic acid	乙酸 Acetic acid	柠檬酸 Citric acid	富马酸 Fumaric acid	琥珀酸 Succinic acid	
鲜榨脐橙汁 Orange juice	-	-	5657.5	4.27	83.7	
鸭梨清汁 Ya pear juice	11.39	-	1048	8.00	11.38	
黄元帅苹果清汁 Golden delicious apple juice	53.25	3.59	105.3	0.27	10.75	

- 表示未检出 (undetected)

4 结 论

经多次实验结果证明:采用 Prontosil 120-10- C_{18} -H (10 μm , 4.6 mm i.d. \times 250 mm) 色谱柱,以 3% CH_3OH -0.01 mol/L K_2HPO_4 (pH 2.55) 溶液做流动相,流速为 0.5 mL/min,在 210 nm 波长下,可以较好地分离和定量果汁中常见的 11 种有机酸。该方法具有前处理简单、灵敏度高、测试组分多、速度快等优点,对于鉴别果汁真假、控制果汁质量具有重要的意义。

References

- 1 Wang Yujun (王玉君). Chinese Journal of Chromatography (色谱), 1991, 9(4): 271 ~ 272
- 2 Cui Yulin (崔雨林), Dai Yunqing (戴蕴青), Han Yashan (韩雅珊). Acta China Agriculture University (中国农业大学学报), 1995, 21(1): 39 ~ 43

- 3 Guo Dehua(郭德华), Xu Sujun(徐素君), Wang Sufen(王素芬). Chinese Journal of Chromatography(色谱), 2001, 19(5): 276~278
- 4 Du Peng(杜朋). Technology of Fruit and Vegetable Juices(果蔬汁饮料工艺学). Beijing(北京): Agriculture Press(农业出版社), 1992: 529~535
- 5 Li Jinxi(李金旭), Shi Jing(石晶). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 1993, 21(8): 878~881
- 6 Bi Lijun(毕丽君), Zhang Li(张骊), Zhang Hongfa(张鸿发). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2000, 28(11): 1391~1394
- 7 Li Youyuan(李友元), Chen Changhua(陈长华), Tao Ping(陶萍). Chinese Journal of Chromatography(色谱), 2002, 20(1): 46~48
- 8 Huang Hongxin(黄红心), Zhang Yukui(张玉奎), Lin Congjing(林从敬), Lu Peizhang(卢佩章). Chinese Journal of Chromatography(色谱), 1992, 10(3): 125~128

Simultaneous Determination of Eleven Organic Acids in Fruit Juice by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Gao Haiyan¹, Liao Xiaojun¹, Wang Shanguang², Hu Xiaosong^{*1}

¹ (College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

² (National Engineering and Technology Research Center for Agricultural Products Freshness Protection, Tianjin 300112)

Abstract A method for simultaneous determination of 11 organic acids in fruit juices by reverse phase high performance liquid chromatography was developed. Protosil 120-10-C₁₈H column (10 μm, 4.6 mm i.d. × 250 mm) was used at 30 °C and mobile phase was 3% CH₃OH-0.01 mol/L K₂HPO₄ (pH 2.55) with flow rate of 0.5 mL/min. Detection wavelength was at 210 nm. The relative standard deviations were 0.3% ~ 1.6% and the recoveries were 96.8% ~ 102.0%. The correlation coefficients for the linear equations were 0.9996 ~ 1.0000. The results mentioned above indicated that the method was simple, rapid and accurate. It has been applied to the determination of organic acids in fruit juices.

Keywords Reversed phase high performance liquid chromatography, organic acid, fruit juice

(Received 8 October 2003; accepted 29 March 2004)

《分析实验室》征订启事

国内统一刊号: CN11-2017/TF

国际 CODEN 码: FENSE4

国外代号: BM848

国际标准刊号: ISSN1000-0720

邮发代号: 82-431

广告经营许可证: 京西工商广字第 0038 号

《分析实验室》是中文核心期刊,月刊,国内外公开发行。1982年创刊,目前已成为我国著名的分析化学专业刊物。影响遍及冶金、地质、石油化工、环保、药物、食品、农业、商品检验和海关等社会各行业及各学科领域。《分析实验室》以突出创新性和实用性为办刊宗旨,作者来自全国各行业的生产、科研第一线,被“CA”等国内外多家检索数据库、文摘收录,影响因子连续多年列化学类前列。本刊常设“研究报告”、“研究简报”、“仪器装置与设备”等栏目。“定期评述”栏目系统发布特邀知名专家学者撰写的国内外分析化学领域的综合技术,连续跟踪学术发展前沿。“国际会议”栏目每期介绍影响广泛的分析化学领域国际学术会议。2004年新设“特邀专家评论”,聚焦当前科研重点、难点、热点。

《分析实验室》每期定价 10 元,全年 12 期,120 元。

全国各地邮局征订,邮发代号 82-431。漏订的读者可直接与编辑部联系。

编辑部地址 北京新街口外大街 2 号,邮编 100088

电话: 010-82013328, E-mail: analysislab@263.net