

反相高效液相色谱法测定枸杞中有机酸的含量

董秀丽, 陈向明* (滨州医学院, 山东烟台 264003)

摘要 [目的] 建立反相高效液相色谱法测定有机酸含量的方法。[方法] 采用 ultimate-C₁₈ 色谱柱, 以磷酸盐缓冲溶液 (pH=2.0) 为流动相, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 210 nm, 建立草酸、酒石酸等 7 种有机酸的高效液相色谱分析方法, 并对枸杞中几种有机酸进行了分析。[结果] 在 22 min 内实现了 7 种有机酸的基线分离, 检测限为 0.001~0.039 mg/L。[结论] 该方法具有分析速度快, 线性范围宽, 重现性好, 灵敏度高的优点, 适用于枸杞中有机酸含量的测定分析。

关键词 高效液相色谱; 有机酸; 枸杞

中图分类号 S567.17 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2010)19-09959-02

Analysis of Organic Acids in Medlar by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

DONG Xiu-li et al (Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003)

Abstract [Objective] The aim was to establish a method of organic acids determination by reversed-phase high performance liquid chromatography. [Method] An ultimate-C₁₈ column was used with phosphate buffer solution (pH=2.0) as the mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min and detection wavelength of 210 nm to establish a method for the determination of seven organic acids and organic acids in medlar were analyzed. [Result] The seven organic acids was determined in 22 min and the detection limits were between 0.001-0.039 mg/L. [Conclusion] The method is fast, sensitive, reproducible and practical for the routine analysis of organic acids in medlar.

Key words High performance liquid chromatography; Organic acids; Medlar

有机酸广泛存在于各种植物果实中, 一些有机酸还是生物体重要的代谢中间产物, 对有机酸的准确定量测定具有重要意义。有机酸的分析方法主要有酸碱滴定法^[1]、薄层色谱法^[2]、气相色谱法^[3]和高效液相色谱法^[4-6]等。酸碱滴定法仅适用于常量分析, 且只能测定总酸量; 薄层色谱法能测定微量有机酸, 但定量精度差且灵敏度低; 气相色谱法需对有机酸进行皂化衍生, 操作繁琐且误差比较大; 高效液相色谱法可同时测定样品中多种有机酸, 而且具有操作简单、准确度高、重现性好的优点, 是目前应用较广泛的方法。笔者建立了反相高效液相色谱测定有机酸的方法, 并对枸杞中几种有机酸进行了分析, 分析速度快, 灵敏度高, 结果准确。

1 材料与方

1.1 供试材料 枸杞, 购自烟台市生生堂药房。

1.2 仪器与试剂 仪器: Waters 600-2489 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 配备四元梯度泵, 在线真空脱气机, 紫外-可见检测器, 手动进样器; ultimate-C₁₈ 柱 (300 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国月旭公司); 数显酸度计 (梅特勒-托利多仪器有限公司)。试剂: 草酸、酒石酸、苹果酸、抗坏血酸、乳酸、乙酸、柠檬酸 (天津市瑞金特化学品有限公司) 均为分析纯; 色谱纯甲醇 (天津福晨化学试剂厂); 其他试剂均为分析纯; 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件。色谱柱为 ultimate-C₁₈ 柱 (300 × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 3% 甲醇 - 0.01 mol/L K₂HPO₄ 溶液 (3:97), 用磷酸调节至 pH 值为 2.0 流速为 0.5 mL/min, 进样体积 20 μL, 检测波长: 210 nm; 柱温: 20 °C; 使用前经 0.45 μm 滤膜过滤。

1.3.2 线性关系考察。准确称取草酸、抗坏血酸各 5 mg, 酒石酸 25 mg, 苹果酸、柠檬酸各 50 mg, 乳酸、乙酸各 100 mg 用流动相溶解并定容至 5 mL 容量瓶中作为对照品储备液。低

浓度对照品溶液由储备液稀释而得, 进样分析, 测定峰面积, 以有机酸浓度为纵坐标, 峰面积为横坐标, 建立线性回归方程。

1.3.3 精密度试验。吸取同一浓度有机酸对照品溶液, 重复进样 6 次 (进样量 20 μL), 测定有机酸的峰面积和保留时间, 计算 RSD 值。

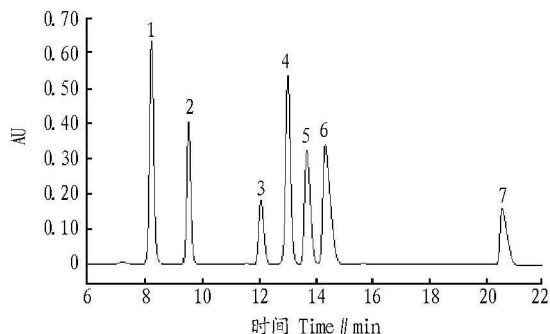
1.3.4 样品测定。准确称取枸杞样品粉末 1 g 于小烧杯中, 加入 20 mL 水, 超声提取 40 min, 过滤后定容至 25 mL, 取 20 μL 进样, 进样前经 0.45 μm 滤膜过滤, 计算各有机酸的含量。

1.3.5 重复性试验。取 6 份枸杞样品, 按照“1.3.1”条件测定样品溶液的峰面积, 计算 RSD。

1.3.6 回收率试验。精密称取已知含量的样品 1.0 g 共 6 份, 精密加入各有机酸对照品, 按照“1.3.4”方法制备样品溶液, 测定回收率。

2 结果与分析

2.1 对照品色谱分离 按照上述条件对含 7 种有机酸的对照品溶液进样分析, 在 22 min 内实现了 7 种有机酸的基线分离, 结果如图 1 所示。



注: 1. 草酸; 2. 酒石酸; 3. 苹果酸; 4. 抗坏血酸; 5. 乳酸; 6. 乙酸; 7. 柠檬酸。下图同。

Note: 1. Oxalic acid; 2. Tartaric acid; 3. Malic acid; 4. Vitamin C; 5. Lactic acid; 6. Acetic acid; 7. Citric acid. The same as below.

图 1 有机酸对照品色谱图

Fig 1 Chromatogram of organic acid standard

基金项目 滨州医学院科技计划 (BY2007KJ17)。

作者简介 董秀丽 (1979-), 女, 山东乳山人, 博士, 讲师, 研究方向: 色谱分析。* 通讯作者, E-mail: xmcl913@163.com。

收稿日期 2010-03-31

2.2 线性关系 各有机酸回归方程和相关系数如表 1 所示。线性相关系数为 0.998 9~0.999 8。

表 1 标准曲线、线性范围和相关系数

有机酸 Organic acids	$y = Ax + B$	线性范围	相关系数
		Linear range	Correlation coefficient
草酸 Oxalic acid	$y = 4 \times 10^{-8}x - 0.0066$	0.001~20	0.9996
酒石酸 Tartaric acid	$y = 3 \times 10^{-7}x + 0.0095$	0.005~100	0.9992
苹果酸 Malic acid	$y = 1 \times 10^{-6}x + 0.0155$	0.010~200	0.9995
抗坏血酸 Ascorbic acid	$y = 4 \times 10^{-8}x + 0.0008$	0.001~20	0.9998
乳酸 Lactic acid	$y = 1 \times 10^{-6}x + 0.0419$	0.020~400	0.9994
乙酸 Acetic acid	$y = 8 \times 10^{-7}x + 0.0585$	0.020~400	0.9989
柠檬酸 Citric acid	$y = 9 \times 10^{-7}x + 0.0304$	0.010~200	0.9990

2.3 精密度试验结果 各有机酸保留时间的 RSD 小于 0.094%，峰面积 RSD 小于 2.20%。

2.4 样品测定结果 按上述供试样品溶液制备方法 & 色谱条件进行测定，以外标法计算含量，色谱图如图 2 所示，含量结果如表 2 所示。

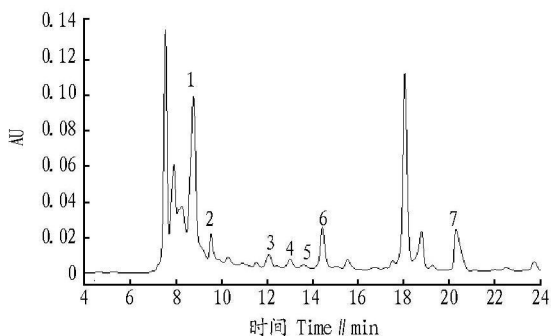


图 2 枸杞中有机酸的色谱图

Fig 2 Chromatogram of organic acids in medlar

2.5 重复性试验 多次测定样品中有机酸峰面积的 RSD 小于 2.78%，说明结果具有可重复性。

2.6 回收率试验 各有机酸回收率结果如表 2 所示。

3 结论与讨论

为抑制有机酸的分解，需加入酸抑制剂调节流动相的 pH 值。由于试验采用 210 nm 的波长作为检测波长，为避免干扰有机酸的检测，选择在紫外区几乎无吸收的磷酸盐缓冲溶液作为调节剂。试验考查了流动相 pH 值为 3.0、2.8、2.6、2.4、2.2、2.0 时的分离结果，发现随着 pH 值的降低，有机酸

表 2 枸杞中有机酸的含量和回收率

Table 2 The content and recovery rate of organic acids in medlar

有机酸 Organic acids	有机酸含量 // mg/g Content	回收率 // % Recovery rate
草酸 Oxalic acid	0.855	104.7
酒石酸 Tartaric acid	2.293	97.3
苹果酸 Malic acid	4.303	96.7
抗坏血酸 Ascorbic acid	0.410	97.4
乳酸 Lactic acid	0.162	101.7
乙酸 Acetic acid	6.755	95.4
柠檬酸 Citric acid	9.998	96.3

的分离度和峰的形状越来越好，但过低的 pH 值对色谱柱有很大损害，因此选择流动相的 pH 值为 2.0。

纯水提取有机酸的方法简单，为提高提取效率，采用超声提取法，分别考查了 20、30、40、50 和 60 min 的提取率，结果发现随着时间的增长有机酸的提取率增加，但超过 40 min 后无明显增加，因此选择 40 min 为提取时间。

该方法具有操作简单、准确度高、重现性好的优点，适用于测定各种样品中有机酸的含量。

参考文献

- [1] 田宏, 黄海欣, 张玉洁. 降脂宁颗粒的质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2003, 14(4): 214-215
- [2] 石尚友, 聂明华, 王小东. 厌食健脾颗粒的薄层色谱鉴别 [J]. 中医药学报, 2005, 11(2): 59-60
- [3] 贾春晓, 毛多斌, 赵玛, 等. 气相色谱-质谱法分析山楂果中的有机酸 [J]. 化学研究与应用, 2004, 16(3): 435-436
- [4] 金高娃, 章飞芳, 薛兴亚, 等. 反相高效液相色谱法测定山楂中的有机酸 [J]. 分析化学, 2006, 34(7): 987-990
- [5] CASELLA I G, GATTA M. Determination of electroactive organic acids by an ion-exchange chromatography using a copper modified electrode [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 912(2): 223-233
- [6] CHEN Q Y, XIAO J B, CHEN X Q. Rapid determination of organic acids in Bayer liquors by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction [J]. Minerals Engineering, 2006, 19(14): 1446-1451
- [7] 李少春, 李培锋. 固相萃取-反相高效液相色谱法测定大鼠血清中的甘氨酸 [J]. 华北农学报, 2009, 24(1): 215-218
- [8] 连翠飞, 蒋继志, 李社增, 等. 利用高效液相色谱筛选产植物激素细菌 [J]. 华北农学报, 2006, 21(2): 66-69
- [9] 宋曙辉, 薛颖. 高效液相色谱法测定蔬菜中的类胡萝卜素 [J]. 华北农学报, 2001, 16(3): 92-97
- [10] 李燕鹏, 杨膺白, 李启琳, 等. 高效液相色谱柱前衍生化法检测牛奶中莫能菌素的残留 [J]. 畜牧与饲料科学, 2008, 29(1): 93-94
- [11] 达林其木格, 李培锋, 孟根达来. 反相离子对高效液相色谱法测定大鼠血浆中的臭豆碱 [J]. 畜牧与饲料科学, 2008, 29(3): 23-25
- [12] 肖洋, 粟周伟, 冯永渝, 等. 原料乳中三聚氰胺的高效液相色谱法测定 [J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(1): 45-46