

反相高效液相色谱法测定新疆不同品种葡萄干中的有机酸

袁辉, 远辉, 王建玲 (新疆产品质量监督检验研究院, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要 [目的] 测定新疆产不同品种葡萄干中有机酸的含量。[方法] 采用 Symmetry Shield™ RP18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以磷酸盐缓冲溶液 (pH 3.0) 为流动相, 流速 1.0 ml/min, 柱温 30 °C, 紫外检测波长 210 nm, 建立了葡萄干中酒石酸、苹果酸等 4 种有机酸的高效液相色谱定量分析方法, 测定了新疆 8 种不同品种葡萄干中的酒石酸、苹果酸、柠檬酸和丁二酸的含量。[结果] 该方法相对标准偏差 (RSD) 0.57% ~ 1.78%, 回收率 97.6% ~ 101.2%, 各种酸的线性相关系数 $r > 0.9997$ 。[结论] 所建立的方法快速、灵敏度高、重复性好, 可用于葡萄干中有机酸的测定。

关键词 反相高效液相色谱; 葡萄干; 有机酸

中图分类号 S663.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)02-00817-02

Determination of Organic Acids Content in Different Varieties of Raisin in Xinjiang by HPLC

YUAN Hui et al (National Quality Supervision Test Center of Agricultural Byproducts, Urumqi, Xinjiang 830011)

Abstract [Objective] To determine organic acid content in different varieties of raisin in Xinjiang. [Method] By using Symmetry Shield™ RP18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, with phosphate buffer solution (pH 3.0) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min, column temperature 30 °C, UV detection wavelength 210 nm, a quantitative reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) method was established for the determination of tartaric acid and malic acid in raisin. The contents of tartaric acid, malic acid, citric acid, succinic acid in 8 varieties of raisin in Xinjiang were determined. [Result] RSD is 0.57% - 1.78%, recovery rate 97.6% - 101.2%, linear correlation coefficient of each acid is $r > 0.9997$. [Conclusion] The method could be applied in determination of organic acids in grape with characteristics of rapid, good sensitive and repeatability.

Key words HPLC; Raisin; Organic acids

新疆吐鲁番是我国葡萄的重要生产基地, 拥有葡萄品种 100 余种, 葡萄干产量更是占据了全国的 40% 还多。葡萄干中富含丰富的营养物质, 有碳水化合物、膳食纤维、蛋白质, 以及丰富的钙、磷、铜、铁等多种微量元素以及多种有机酸。报告认为, 有机酸除了具有抗生素作用外, 还具有其他包括降低消化物 pH 和增加胰腺分泌的作用。

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]、离子色谱法^[4]及高效液相色谱法^[5-9]等。酸碱滴定法仅适用于常量分析, 且只能测定总酸含量, 操作繁琐; 薄层色谱法定量精度和灵敏度较低; 气相色谱法需进行复杂的衍生步骤, 误差较大; 离子色谱法对样品的处理要求较高, 前处理非常复杂, 耗时长。高效液相色谱法操作简便、准确度高、重现性好, 可同时定量多种有机酸, 因此已获得广泛的应用。笔者利用反相高效液相色谱法对新疆地区 8 个品种葡萄干中的 4 种水溶性有机酸含量进行了分析, 结果稳定、可靠, 取得了较好的结果。

1 材料与方法

1.1 材料 8 种葡萄干均购自乌鲁木齐市北园春批发市场。主要仪器: 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司 2695 系列, 由四元低压泵、柱温箱、可变波长紫外检测器及自动进样器组成; PHS-3E 型酸度计, 上海精密科学仪器有限公司。主要试剂: 酒石酸、苹果酸、柠檬酸及丁二酸, Sigma 公司; 磷酸二氢钾及磷酸为优级纯; 水为高纯水, 流动相经 0.45 μm 滤膜过滤。

1.2 对照品及供试品溶液的制备 准确称取各有机酸对照

品 100 mg (精确至 0.1 mg), 溶解并定容至 50 ml 容量瓶中, 为有机酸的混合标准液, 临用时稀释为 5 个浓度梯度溶液; 将各种葡萄干放入组织捣碎机中研磨, 准确称取 5 g 于小烧杯中, 加入适量水, 超声提取 0.5 h, 过滤后定容于 50 ml 容量瓶中, 取适量过 0.45 μm 滤膜过滤, 制成供试品溶液。

1.3 色谱条件 Symmetry Shield™ RP18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为 0.01 mol/L 磷酸二氢钾 - 磷酸缓冲液 (pH = 3.0), 流速 1.0 ml/min, 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μl。

2 结果与分析

2.1 试验条件优化 采用纯水超声提取法提取水溶性有机酸, 不仅提取效率高, 而且方法简便, 与室温浸泡法相比, 缩短了提取时间。通过对流动相的比较, 最终采用 0.01 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄ 缓冲液 (pH = 3.0) 为流动相得到 4 种有机酸的混合标准品色谱图 (图 1)。

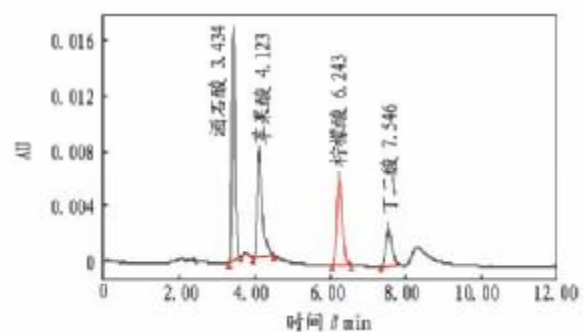


图 1 4 种有机酸混合标准品色谱

2.2 线性关系及检出限 一系列 (5 个) 不同浓度的有机酸混合标样, 按 “1.3” 条件下进样试验, 采集数据, 以对照品浓度对峰面积进行线性回归, 各有机酸的回归方程、线性范围、

作者简介 袁辉 (1980 -), 女, 陕西凤翔人, 工程师, 硕士, 从事食品质量检测研究, E-mail: yuanhui8553@163.com。

收稿日期 2012-11-12

相关系数及检出限见表1。

2.3 不同加标量的加标回收率 准确称取已知含量的葡萄样品9份,分为3组,第1组分别准确加入4 mg 酒石酸和0.2 mg 柠檬酸(加入量近似为葡萄样品中酒石酸和柠檬酸含量的50%),酒石酸和柠檬酸的平均回收率分别为98.6%和97.8%,*RSD*分别为0.46%和0.42%;第2组分别准确加入8.0 mg 酒石酸和0.4 mg 柠檬酸(加入量近似为葡萄样品中

酒石酸和柠檬酸含量的100%),酒石酸和柠檬酸的平均回收率分别为99.1%和98.6%,*RSD*分别为1.25%和0.69%;第3组分别准确加入12.0 mg 酒石酸和0.6 mg 柠檬酸(加入量近似为葡萄样品中酒石酸和柠檬酸含量的150%),酒石酸和柠檬酸的平均回收率分别为101.2%和97.6%,*RSD*分别为1.17%和0.39%。

表1 各有机酸的回归方程、线性范围、相关系数及检出限

有机酸	回归方程	线性范围/ μg	相关系数(<i>R</i>)	检出限(<i>S/N</i> = 3)/ μg
酒石酸	$Y = 1.12e + 005X - 1.33e + 004$	0.01 ~ 0.50	0.999 8	0.01
苹果酸	$Y = 5.53e + 004 X + 1.57e + 004$	0.01 ~ 0.50	0.999 7	0.02
柠檬酸	$Y = 6.72e + 004 X - 6.53e + 003$	0.01 ~ 0.50	0.999 9	0.03
丁二酸	$Y = 3.62e + 004 X - 6.15e + 003$	0.01 ~ 0.50	0.999 8	0.06

2.4 方法的精密度和稳定性试验 取混合对照品溶液重复进样6次,峰面积积分值*RSD*分别为:酒石酸1.78%,苹果酸1.39%,柠檬酸0.57%,丁二酸1.13%。同一品种葡萄干样品称取6份,分别按“1.2”项下方法制备成供试品溶液,测定含量,酒石酸*RSD*为2.14%,苹果酸*RSD*为1.75%,柠檬酸*RSD*为2.03%。

酒石酸稳定性在12 h以上,*RSD* = 1.05% ($n = 16$);苹果酸稳定性在12 h以上,*RSD* = 0.98% ($n = 16$);柠檬酸稳定性在12 h以上,*RSD* = 0.75% ($n = 16$);丁二酸稳定性在12 h以上,*RSD* = 0.89% ($n = 16$)。由表2可见,4种有机酸保留时间的相对标准偏差在0.071% ~ 1.130%,表明在确定的色谱条件下,保留时间基本恒定,该方法具有较好的重复性。

表2 有机酸保留时间的重现性

有机酸	平均保留时间/ min	相对标准偏差 <i>RSD</i> /%
酒石酸	3.426	1.130
苹果酸	4.120	0.246
柠檬酸	6.247	0.071
丁二酸	7.539	0.124

2.5 8种葡萄干样品中有机酸的定量分析结果 分别取8个品种的葡萄干样品,按“1.2”操作后,进样10 μl ,完成HPLC测定,结果见图2、表3。从表3中可以看出,各种葡萄干中均含有酒石酸、苹果酸及柠檬酸,丁二酸可能含量偏低,

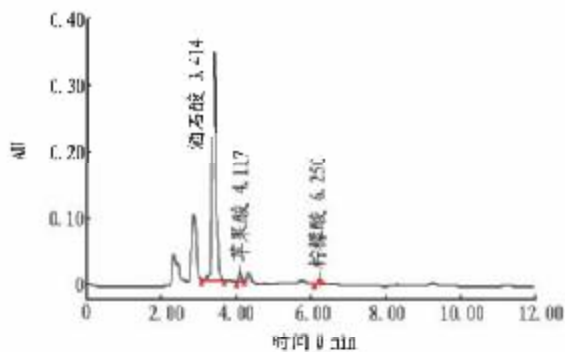


图2 葡萄干中有机酸含量测定色谱

未检测到。其中,酒石酸的含量较多,最高多达2.29%,而苹果酸和柠檬酸含量相对较低。在8种葡萄干中,4种有机酸的含量差异不大,相比较而言,黑加仑中4种有机酸的含量总和最高,哈密王中4种有机酸含量总和最低。

表3 葡萄干样品中有机酸含量测定结果($n = 2$) %

葡萄干样品	酒石酸	苹果酸	柠檬酸	丁二酸
无核白	2.17	0.18	0.13	-
黑加仑	2.29	0.19	0.12	-
和田红	2.04	0.18	0.11	-
香妃红	2.06	0.17	0.12	-
哈密王	1.97	0.18	0.11	-
红马奶	2.00	0.19	0.13	-
绿马奶	2.09	0.20	0.12	-

注: - 表示未检出。

3 结论

试验证明,采用 Symmetry ShieldTM RP18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以磷酸盐缓冲溶液 (pH 3.0) 为流动相,在流速 1.0 ml/min,波长 210 nm 下可很好地检测葡萄干中的有机酸含量。经对新疆 8 种有代表性的葡萄干进行测试,结果表明,葡萄干中富含丰富的有机酸,尤其是酒石酸,高达 22.9 mg/g。研究发现,酒石酸能够改善直肠的健康,柠檬酸具有显著的保健效果。因此,深度开发葡萄干及其产品将带来良好的社会效益。

参考文献

- [1] 刘珍. 化学分析(上册)[M]. 4版. 北京:化学工业出版社,2004:193-205.
- [2] 冯雅斌,杜靛,温静. 薄层色谱法在药物分析中的应用及研究进展[J]. 疾病监测与控制,2011(1):45-48.
- [3] 于世林. 图解气相色谱技术与应用[M]. 北京:科学出版社,2010:13-18.
- [4] 王海蓝,李雪萍,陈维信. 离子色谱法测定贮藏期间菠萝果实的有机酸变化[J]. 疾病监测与控制,2010(10):14-17.
- [5] 易姣,尹笃林,廉世勋,等. 反相 HPLC 法同时测定烟草中的 6 种有机酸[J]. 烟草科技,2006(7):36-39.
- [6] 崔婧,段长青,潘秋红. 反相高效液相色谱法测定葡萄中的有机酸[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2010(5):25-30.
- [7] GRZTZFELD-HSGEN A, SCHUSTER R. HPLC for Food Analysis[M]. Palo Alto, CA: Hewlett Packard, 1996:39-41.
- [8] 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]. 分析化学研究简报,2006(7):987-990.
- [9] 罗阳,贺晓光,杨军,等. HPLC 法测定贺兰山东麓酿酒葡萄中苹果酸含量[J]. 安徽农业科学,2011,39(33):20541-20542,20545.