

# RP-HPLC 法测定不同采收期贼小豆中 9 种有机酸含量

高向阳<sup>1,2</sup>, 韩 帅<sup>2</sup>, 王莹莹<sup>1</sup>

(1. 郑州科技学院食品科学系, 河南 郑州 450064; 2. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:**为充分利用野生贼小豆资源,建立利用反相高效液相色谱同时测定贼小豆中 9 种有机酸含量的方法,了解不同采收期贼小豆中有机酸的动态变化,以郑州市区同一位置的野生贼小豆为样品,采用 SunfireTM-C18 色谱柱, pH=2.7 的磷酸盐缓冲液为流动相,在紫外光 210 nm 处检测。结果表明:25 min 内可完成 9 种有机酸的基线分离,检测限为 0.12~6.00 mg/L。各有机酸标准曲线的相关系数为 0.9965~0.9998,加标回收率均值为 96.01%~101.10%,相对标准偏差为 0.56%~1.9%(n=6)。贼小豆样品含有所测定 9 种有机酸中的 7 种,其中,酒石酸、柠檬酸、琥珀酸和顺丁烯二酸含量较高。8 月下旬和 9 月下旬采集样品中所测有机酸的总含量相对较高,9 月下旬采集样品中柠檬酸和琥珀酸含量较高。该方法分析速度快、灵敏度高、分离效果和重现性好,可用于贼小豆中有机酸含量的测定。

**关键词:**反相高效液相色谱; 贼小豆; 有机酸含量; 变化规律

中图分类号: S529.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-874X(2013)11-0021-04

## Content of nine organic acids in *Vigna minima*(Roxb.) in different harvest periods by reversed phase high performance liquid chromatography

GAO Xiang-yang<sup>1,2</sup>, HAN Shuai<sup>2</sup>, WANG Ying-ying<sup>1</sup>

(1. Department of Food Science, Zhengzhou Institute of Science and Technology, Zhengzhou 450064, China;

2. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to develop and utilize *Vigna minima*(Roxb.) Ohwi et Ohashi resources, and to understand the dynamic changes of organic acids in different harvest period, a method of simultaneous determination of 9 organic acids content by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was established with wild *Vigna minima* (Roxb.) at the same location of Zhengzhou as samples, which used SunfireTM-C18 column, pH=2.7 phosphate buffer solution as mobile phase, the 210 nm ultraviolet detection. The results showed that the baseline separation of 9 kind of organic acids could be finished within 25 min; the detection limit was 0.12~6.00 mg/L, the correlation coefficient was 0.9965~0.9998 on standard curves of organic acids, average recovery rate was 96.01%~101.10%, the relative standard deviation (RSD) was 0.56%~1.9%(n=6). The samples contained 7 kinds of organic acids, in which tartaric acid, citric acid, succinic acid and maleic acid content were higher. The total content of organic acid in the late August and late September collected samples were higher relatively, the content citric acid and succinic acid were higher in late September samples. This method was validated to be fast, high sensitivity, good separation and reproducibility for the determination of organic acid content in *Vigna minima*(Roxb.) samples with satisfactory results.

**Key words:** reversed phase high performance liquid chromatography; *Vigna minima*(Roxb.); organic acids content; change regulation

贼小豆 *Vigna minima*(Roxb.)为被子植物门(Angiospermae) 木兰纲 (Magnoliopsida) 豆目 (Fabales) 豆科 (Fabaceae) 菜豆族 (trib. Phaseoleae) 豇豆属 (*Vigna*) 一年生缠绕草本,产于我国北部、东南部至南部,生于林中或草丛中,国外亦有分布<sup>[1]</sup>。贼小豆是我国宝贵的野生豆类植物资源,有机酸含量是籽粒成熟度、耐储藏性以及加工特性的重要依据<sup>[2-4]</sup>,对贼小豆新陈代谢、酸碱平衡有重要作用。

目前,测定食品中有机酸的方法有毛细管电泳<sup>[5]</sup>、离子色谱<sup>[6-7]</sup>、气相色谱<sup>[8-9]</sup>和液相色谱法<sup>[10-17]</sup>等,而野生贼小豆中有机酸的含量水平和变化规律还鲜见报道。本研究以郑州市郊同一位置的野生贼小豆为材料,采用反相高效液相色谱法 (Reversed Phase High Performance Liquid

Chromatography, RP-HPLC)同时测定样品中 9 种有机酸,分析不同采收期贼小豆中有机酸的种类及含量变化,为贼小豆采收质量的营养评价、口感风味以及该食品野生新资源的进一步合理开发和加工利用提供理论依据和科学参考,具有一定的现实意义和应用价值。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 试验材料

贼小豆于 2012 年秋季采集于郑州龙子湖高校园区 (113°42'E, 34°44'N), 经河南农业大学朱长山鉴定为贼小豆果实,8~11 月,每月 25 日采集同一地方的野生果实为样品;测定时取完整、饱满籽粒,依次用蒸馏水、超纯水快速淋洗 3 遍后于 60℃烘箱中烘干。郑州绿豆购于郑州市丹尼斯超市,籽粒饱满,产地新郑;南阳绿豆籽粒饱满,采于南阳市唐河县桐寨铺镇。所用样品经植物微型粉碎机粉碎并过 0.25 mm 筛后,分别置于广口瓶中,于干燥器中保

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 河南省重点学科建设项目(10466-X-082301)

作者简介: 高向阳(1949-),男,教授, E-mail: ndgaoxy@163.com

存,备用。

酒石酸、苹果酸、柠檬酸、DL-苹果酸(分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司;α-酮戊二酸(生化试剂)、L-乳酸(分析纯)购于北京拜尔迪生物有限公司;乙酸、琥珀酸(分析纯)购于天津市科密欧试剂有限公司;顺丁烯二酸(分析纯)购于上海杉浦化工有限公司;磷酸、磷酸二氢铵(分析纯)购于天津市大茂化学试剂厂。实验用水为超纯水。

仪器设备:Waters 515 高效液相色谱仪(717Plus 自动进样器,2487 紫外检测器,Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司)、pH211 型酸度计(意大利 HANNA 公司)、SB-5200DT 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司医疗器械厂)、101-2-S- II 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)、FZ102 微型植物粉碎机(浙江上虞盛科仪器制造有限公司)、Cary 3000 紫外可见分光光度计(美国瓦里安公司)。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 流动相的配制** 10 mmol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液:准确称取 5.44 g 固体磷酸二氢铵,用水溶解并定容至 1 L,以磷酸调 pH 值为 2.7 后,用 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜过滤,超声波脱气。

**1.2.2 色谱条件** 色谱柱:Sunfire™-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),以 10 mmol/L 磷酸二氢铵缓冲溶液(pH=2.7)为流动相,流速 1.0 mL/min,紫外检测波长 210 nm,柱温 30℃,进样体积 10  $\mu\text{L}$

**1.2.3 标准曲线的绘制** 精确称取顺丁烯二酸 5 mg,抗坏血酸、α-酮戊二酸各 25 mg,酒石酸 50 mg,苹果酸、柠檬酸各 100 mg,乳酸、乙酸、琥珀酸各 200 mg,用流动相溶解并定容至 25 mL 棕色容量瓶中作为标准储备液,经逐级稀释配制为标准工作液和混合标准工作液,于 4℃ 冰箱保存,使用前经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,分别取 10  $\mu\text{L}$  进样,在 1.2.2 色谱条件下,平行进样 3 次,以 3 次峰面积均值为纵坐标,以浓度为横坐标,由色谱工作站自动绘制工作曲线,进行回归分析。

**1.2.4 样品处理及测定** 称取贼小豆样品 1.0000 g,置于 250 mL 锥形瓶中,加入少量 10 mmol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - $\text{H}_3\text{PO}_4$  缓冲溶液(pH=2.7)后浸泡 30 min,再加适量流动相于 30℃ 超声萃取 30 min,抽滤,滤液用流动相定容为 25.00 mL。9 000 r/min 离心 10 min。取上清液经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,滤液供上机分析。每个样品 3 次重复,用外标法测定,取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品的前处理

**2.1.1 样品提取方式的选择** 精确称取 1.0000 g 同一贼小豆样品 3 份,放入洁净 50 mL 比色管中,加入适量蒸馏水,静置 20 min 后,分别选择用 75℃ 水浴、超声波、摇床振荡各提取 30 min,定容至 50 mL,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后,进行 HPLC 分析。结果表明:用超声波浸提样品 30 min,有机酸的分离效果较理想。

**2.1.2 提取溶剂的选用** 考察 35%、50%、70% 乙醇水溶液和水为溶剂的提取效果,发现不同浓度乙醇和水的提取效果无明显差异,为降低成本,选用水为溶剂。

**2.1.3 提取时间的确定** 选用同一样品,以水为溶剂,按 1.2.4 进行处理,考察超声波提取时间为 15、20、25、30、35、40 min 的浸提效果,结果表明室温下用水提取 30 min 效果较好。

### 2.2 色谱条件的选择

**2.2.1 检测波长的选择** 有机酸标准溶液用紫外可见分光光度计进行光谱扫描表明:9 种有机酸在 210 nm 处附近均有较强吸收,经色谱柱分离后,各峰间的分离度和峰的重复性较好,且不受流动相中其他物质的干扰。故选择紫外检测器的检测波长为 210 nm。

**2.2.2 柱温的确定** 考察 25、30、35℃ 溶液对测定结果的影响,结果表明:25℃ 时酒石酸的色谱峰有部分重叠,35℃ 时出峰时间会略微提前,但琥珀酸分离效果差,30℃ 时各酸分离效果较好。因此,本方法确定柱温为 30℃。

**2.2.3 流动相及 pH 值的确定** 磷酸盐缓冲溶液是一种弱酸电离抑制剂,在紫外区几乎无吸收。分别用 10、15、20 mmol/L 磷酸二氢铵、磷酸氢二铵为流动相进行试验,结果表明:条件相同时,酒石酸、苹果酸在磷酸二氢铵中的分离效果较好。故选用 10 mmol/L 磷酸二氢铵缓冲液为流动相。

分别考察流动相 pH 值为 2.4、2.5、2.6、2.7、2.9、3.0 时的分离效果,结果表明:pH>2.7 时,峰形较差,分离度变小;pH<2.7,各组分保留时间有所增加,色谱峰变窄,对称性变好,但 pH 值过低会影响色谱柱的使用寿命。因此,确定 pH 2.7 的磷酸盐缓冲溶液为流动相。

**2.2.4 流动相流速的确定** 考察了流动相流速为 0.80、1.00、1.20 mL/min 时的分离效果,结果表明:流速 1.00 mL/min 时系统压力适中,灵敏度较高,分离效果较好,本试验确定流动相流速为 1.00 mL/min。

**2.2.5 色谱峰分离效果** 在 2.2.1~2.2.4 色谱条件下,按分析方法对有机酸标准混合液和贼小豆试液进行测定,得到的色谱图如图 1 所示。由图 1 可知,有机酸标样色谱图(A)和贼小豆样品色谱图(B)在 2.2 色谱条件下分离效果理想。

### 2.3 方法学分析

**2.3.1 线性回归方程和检出限** 准确配制 5 个不同浓度的 9 种有机酸混标,按照上述色谱条件进样,以各有机酸的峰面积(Y)为纵坐标,进样质量浓度(X)为横坐标,通过色谱工作站进行回归分析,按照 3 倍信噪比(3S/N)计算检出限,结果如表 1 所示。

由表 1 可知:各有机酸标准溶液浓度和检测响应值的相关系数在 0.9965~0.9998 之间,最低检测限为 0.12~6.00 mg/L。

**2.3.2 精密度和加标回收率** 按照 1.2.4 方法处理贼小豆样品,并定量添加混合标准溶液,按 1.2.3 色谱条件各进行 6 次平行测定检验无可疑值后取平均值报告。根据

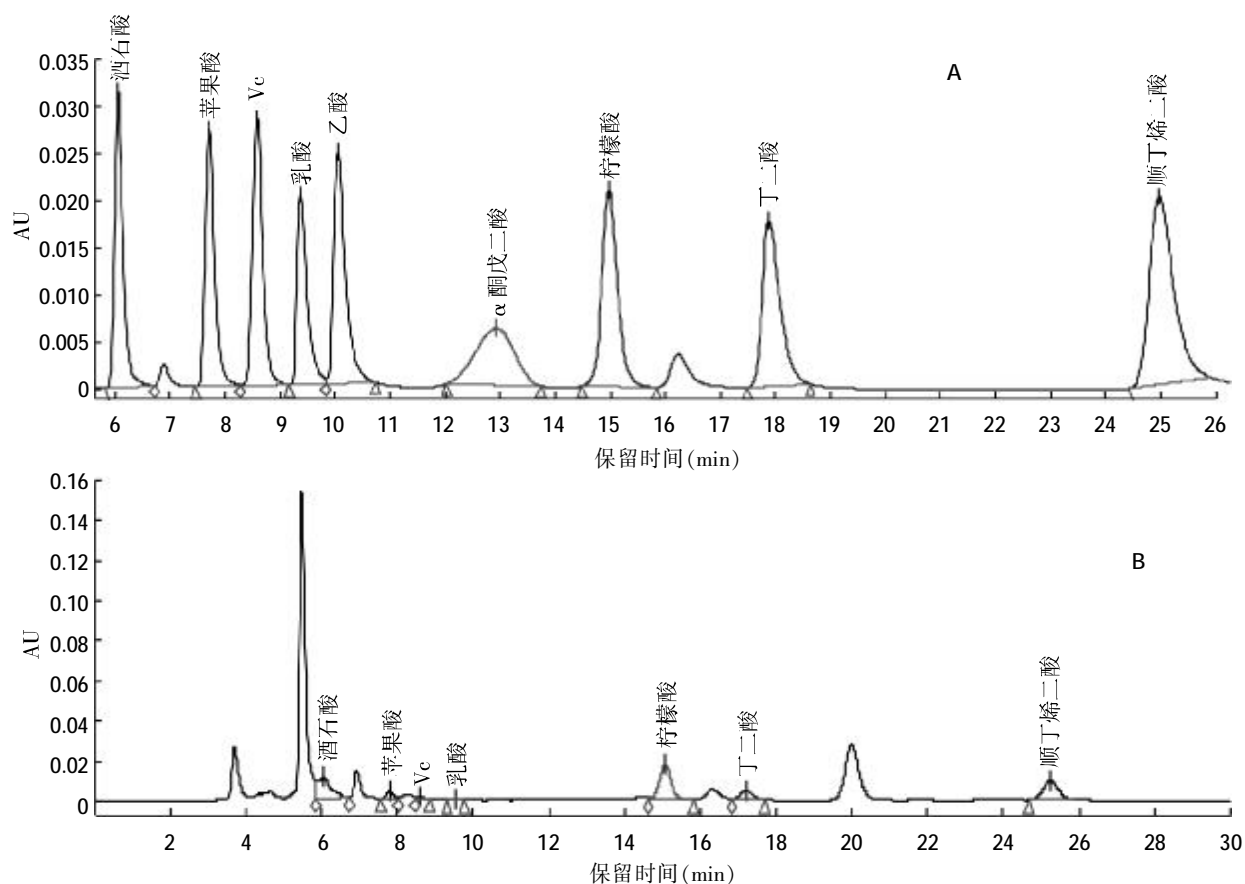


图 1 有机酸标样(A)和贼小豆样品(B)的色谱图

表 1 9种有机酸的保留时间、回归方程及检测限

有机酸	保留时间(min)	线性方程	相关系数 r	检出限(mg/L)	线性范围(mg/L)
酒石酸(Tartaric acid)	6.06	$Y=5812.1X+600.2$	0.9998	1.50	2-50
苹果酸(L-Malic acid)	7.71	$Y=102.37X+717.29$	0.9994	0.20	2-800
抗坏血酸(L-Ascorbic acid)	8.58	$Y=9402.8X+1647.2$	0.9996	6.00	2-80
乳酸(Lactic acid)	9.37	$Y=923.27X+3062.7$	0.9993	5.00	2-800
乙酸(Acetic acid)	10.05	$Y=531.09X-255.29$	0.9987	0.12	2-1600
α-酮戊二酸(α-Ketoglutaric acid)	12.92	$Y=81699X+137.43$	0.9998	0.20	2-10
柠檬酸(Citric acid)	14.97	$Y=135.85X+336.84$	0.9992	5.00	2-800
琥珀酸(Succinic acid)	17.87	$Y=899.55X-159386$	0.9965	2.00	2-1600
顺丁烯二酸(Maleic acid)	24.97	$Y=119219X+5013.1$	0.9994	3.00	2-50

测定数值分别计算相应的精密度和加标回收率,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,贼小豆样品中有机酸的平均回收率为 96.01%~101.10%,相对标准差 RSD 为 0.56%~1.9%。

表 2 贼小豆样品有机酸的精密度和加标回收率

有机酸	测定值(mg/L)	添加量(mg/L)	测定结果(mg/L)	回收率(%)	RSD(%)
酒石酸	127.534	100	228.562	101.10	0.56
苹果酸	61.153	100	160.895	99.74	1.20
抗坏血酸	2.048	20	22.019	99.85	1.90
乳酸	1.135	20	20.244	95.54	0.87
乙酸	0.000	100	96.157	96.15	1.50
α-酮戊二酸	0.000	20	19.201	96.01	1.10
柠檬酸	366.261	200	567.412	100.57	1.30
琥珀酸	213.262	400	614.269	100.25	0.64
顺丁烯二酸	160.502	200	359.186	99.34	0.79

**2.3.3 保留时间和峰面积的重现性** 对同一有机酸混合标准溶液进行6次平行测定,对其保留时间、峰面积和9种有机酸含量进行统计分析。结果表明:各有机酸保留时间的相对标准偏差均低于0.45%;峰面积的相对标准偏差均小于2.1%,说明色谱工作条件稳定,重现性良好。

**2.3.4 有机酸试液的稳定性** 取同一样品溶液,按照色谱条件和处理测定方法,取上清液经0.45 μm滤膜过滤

后,分别于0、2、4、8、12 h进样。结果表明:各峰相对保留时间的RSD为0.03%~0.25%,相对峰面积的RSD为0.16%~1.8%,表明有机酸组分在12 h内测定,测定信号较为稳定。

## 2.4 测定结果

按照试验方法对贼小豆进行处理后,用流动相定容,经0.45 μm滤膜过滤后进行有机酸的测定,用外标法定量,由仪器色谱工作站计算结果,如表3所示。

表3 贼小豆中有机酸的测定结果(mg/g)

有机酸	不同采收期有机酸含量				郑州绿豆	南阳绿豆
	2012年8月采收	2012年9月采收	2012年10月采收	2012年11月采收		
酒石酸	18.377±0.006	16.087±0.003	23.948±0.005	20.738±0.006	18.310±0.031	19.399±0.008
苹果酸	3.058±0.023	2.151±0.026	1.804±0.015	1.753±0.005	2.221±0.010	3.268±0.004
抗坏血酸	0.152±0.013	0.102±0.017	0.086±0.011	0.065±0.016	0.151±0.008	0.333±0.013
乳酸	0.090±0.002	0.087±0.001	0.062±0.001	0.059±0.001		
乙酸						
α-酮戊二酸					0.226±0.004	0.065±0.002
柠檬酸	16.313±0.006	18.319±0.002	15.168±0.003	10.963±0.001	13.728±0.009	11.102±0.003
琥珀酸	8.663±0.007	10.655±0.012	5.120±0.006	6.170±0.009	7.444±0.006	1.667±0.002
顺丁烯二酸	8.691±0.002	8.450±0.005	4.954±0.004	3.557±0.006	5.473±0.002	7.629±0.003
累计总含量	55.344	55.851	51.142	43.305	47.553	43.463

注:表中空格表示未检出。

由表3可知,样品中的有机酸以酒石酸和柠檬酸为主,占酸总量的质量百分数为61.60%~76.48%,其次为琥珀酸、顺丁烯二酸,占酸总量的质量百分数为19.70%~34.21%,含量较低的是苹果酸、抗坏血酸和乳酸;贼小豆样品中未检出α-酮戊二酸和乙酸,对照样品绿豆中未检出乳酸和乙酸。

## 2.5 不同采收期贼小豆中有机酸的动态含量变化特性

由表3可知,8月下旬和9月下旬采集样品中所测有机酸的总含量相对较高,10月和11月则逐渐下降,11月下旬采集样品中所测有机酸的总含量与绿豆对照样品相当。其中,苹果酸、抗坏血酸、乳酸和顺丁烯二酸随采样时间的延长,含量逐渐下降;9月下旬采集样品中柠檬酸和琥珀酸含量较高,以后逐渐下降。10月下旬采集样品中酒石酸含量较高,11月下旬有所下降。

## 3 结论

通过对色谱条件的选择和优化,建立了反相高效液相色谱同时测定郑州地区野生贼小豆中9种有机酸的分析方法。结果表明,贼小豆样品中含有所测9种有机酸中的7种,其有机酸配比合理,适宜人体吸收利用。样品中的有机酸以酒石酸和柠檬酸为主,占酸总量的61.60%~76.48%,其次为琥珀酸、顺丁烯二酸,占酸总量的19.70%~34.21%,为充分开发该自然野生资源和评价其营养价值、口感风味提供科学参考。该法简单、快捷、准确度和灵敏

度较高,仪器工作性能稳定,可在25 min内完成待测样品中9种有机酸的分离分析,样品测定的相对标准偏差均小于2.0%,回收率为96.01%~101.10%。8月下旬和9月下旬采集样品中所测有机酸的总含量相对较高,9月下旬采集样品中柠檬酸和琥珀酸含量较高,10月下旬采集样品中酒石酸含量较高,该野生自然资源有一定的食用开发价值。

## 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第41卷)[M].北京:科学出版社,1995.
- [2] 陆敏,张绍岩,张文娜,等.高效液相色谱法测定沙棘汁中7种有机酸[J].食品科学,2012,33(14):235-237.
- [3] 李亚,王殊娜.高效液相色谱法测定莲雾中有机酸的条件优化[J].安徽农业科学,2011,39(8):4765-4767.
- [4] 田林锋,胡继伟,黄先飞,等.反相高效液相色谱法快速测定梨中7种有机酸含量[J].食品研究与开发,2010,31(2):126-128.
- [5] 韩海峰,王庆,刘霞,等.聚合离子液体为添加剂的毛细管电泳法用于快速高效分离饮料中7种有机酸[J].色谱,2012,30(5):538-542.
- [6] 章剑扬,刘新,车金水,等.快速溶剂萃取-离子色谱法测定茶叶中的有机酸[J].化学分析计量,2012,21(1):43-45.
- [7] 娄斌,李阳,吕金凤,等.IC法同时测定碳酸饮料中无机阴离子和有机酸[J].食品研究与开发,2012,33(1):115-117.
- [8] 袁蕊,敖宗华,丁海龙,等.高粱中脂肪酸和低分子有机酸气相色谱测定[J].酿酒,2011,38(4):42-43.
- [9] 刘凤珠,牛小明,王颖颖.苹果醋中有机酸成分的GC-MS分析[J].中国调味品,2010,35(11):107-109,115.