

# 基质固相分散-高效液相色谱法测定山楂中的有机酸

石香玉<sup>1</sup>, 马银海<sup>2,\*</sup>

(1. 焦作大学化工研究所, 河南 焦作 454002 2. 昆明学院化学系, 云南 昆明 6500031)

**摘要:** 研究采用基质固相分散处理、高效液相色谱法测定山楂中的有机酸。以 ZORBAX Stable Bound (4.6 × 50 mm, 1.8 μm) 快速分离柱为固定相, 0.01 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.98) 和乙腈 (体积比为 98:2) 为流动相, 流速为 2.0 ml/min, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm。方法回收率为 94%~98%; 相对标准偏差为 2.1%~3.0%; 检出限为 100~200 μg/L。色谱分离时间不超过 3.0 min。并用于实际样品中有机酸分析, 结果令人满意。

**关键词:** 高效液相色谱法; 有机酸; 山楂

## Determination of Six Organic Acids in *C. pinnatifida* Bunge by High Performance Liquid Chromatography Based on Matrix Solid Phase Dispersion

SHI Xiang-yu<sup>1</sup>, MA Yin-hai<sup>2,\*</sup>

(1. Institute of Chemical Industry, Jiaozuo University, Jiaozuo 454002, China;  
2. Department of Chemistry, Kunming College, Kunming 650031, China)

**Abstract:** A new method for the determination of organic acids in *C. pinnatifida* Bunge based on matrix solid phase dispersion was established. Organic acids were analyzed by high performance liquid chromatography with 0.01 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 2.98) as mobile phase at a flow rate of 2.0 ml/min and detected at wavelength of 210 nm. The organic acids were separated on a ZORBAX Stable Bound (4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm) column within 3 min. Limits of detections (S/N=3) were below 200 μg/L. Mean recoveries ranged from 94% to 98%, and the relative standard deviations were below 3.0%. This method has been successfully applied to the determination of organic acids in *C. pinnatifida* Bunge with satisfactory results.

**Key words:** high performance liquid chromatography; organic acids; *C. pinnatifida* Bunge

中图分类号: 0657.71

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0297-03

山楂为蔷薇科植物山里红 (*Crataegus pinnatifida* Bunge var. Major N. E. Br) 或山楂 (*C. pinnatifida* Bunge) 的干燥成熟果实, 是一种药食两用植物, 富含多种营养成分, 具有消食健胃、行气散瘀的功能, 主治肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭、产后瘀阻、心腹刺痛、疝气瘀痛、高血脂症。植物化学研究表明山楂中含大量有机酸<sup>[1-2]</sup>, 其含量测定对山楂的质量控制和综合利用具有一定意义。

基质固相分散是一种新样品处理技术, 其基本操作是将样品 (固态或液态) 直接与固相萃取材料一起混合研磨, 使样品均匀分散于固定相颗粒的表面, 形成一个独特的色谱固定相装柱, 然后依靠所选定的溶剂洗脱样品, 它浓缩了传统样品均化, 组织细胞裂解, 提取, 过滤, 净化等过程, 使样品的预处理变得简便, 同时

也避免了目标物的损失。由于该方法的简便、样品和溶剂用量少等优点, 已被广泛应用于蔬菜、水果和植物中农药、杀虫剂等残留的分析<sup>[3-5]</sup>, 但用于山楂中有机酸的测定仍未见报道。本研究将采用基质固相分散法提取净化, 高效液相色谱法测定山楂中有机酸。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

1100 高效液相色谱仪 (包括 1100 四元泵和 1100 紫外二极管阵列检测器) 美国安捷伦公司。Chemical Station 色谱工作站; CAL204 电子天平 (感量 0.0001g) 梅特勒-托利多仪器公司; UV-160A 紫外可见分光光度计 日本岛津公司; Beckman Φ-200 酸度计 美国 Beckman 公司。

收稿日期: 2007-11-30

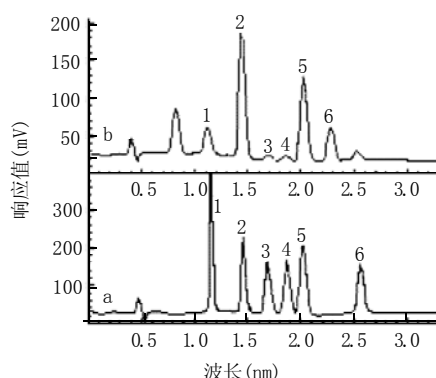
作者简介: 石香玉 (1964-), 女, 副教授, 主要从事化学化工研究。E-mail: shixy915@sina.com

\* 通讯作者: 马银海 (1964-), 男, 副教授, 主要从事天然产物研究。E-mail: myh5929251@163.com

甲醇(色谱纯) 美国Fisher公司; 磷酸、磷酸二氢钠(优级纯) 天津化学试剂厂; 乳酸、草酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸标准品(纯度 $\geq 99\%$ ) 瑞士Fluka公司; 其它试剂均为分析纯; 水为二次蒸馏水。

## 1.2 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX Stable Bound ( $4.6 \times 50\text{mm}$ ,  $1.8\mu\text{m}$ ) 快速分离柱; 流动相为  $0.01\text{mol/L}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{pH} 2.98$ ) 和乙腈(体积比为  $98:2$ ); 流速  $2.0\text{ml/min}$ ; 柱温:  $25^\circ\text{C}$ ; 进样量  $5\mu\text{l}$ 。此条件下, 6 种有机酸能得到有效的分离, 标样和样品的色谱图见图 1 所示。



1. 草酸; 2. 苹果酸; 3. 乳酸; 4. 乙酸; 5. 柠檬酸; 6. 琥珀酸。

图1 标样(a)及实际样品(b)色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of standards (a) and sample (b)

## 1.3 样品处理

山楂样品粉碎, 过 100 目筛, 称取  $0.1\text{g}$  样品,  $0.4\text{g}$  石墨化碳黑球置于玻璃研钵中。用玻璃杵研磨  $5\text{min}$ , 使样品与填料均匀混合; 装入  $8 \times 15\text{mm}$  的固相萃取小柱(见图 2, 在装填管的一端装上筛板, 装入样品并压实, 然后在另一端装上筛板, 拧紧柱帽就装好)。装好后以  $5\text{ml/min}$  的流速用  $4\text{ml}$   $0.1\text{mol/L}$  的磷酸( $>80^\circ\text{C}$ )洗脱, 再用稍少于  $6\text{ml}$  的热水( $>80^\circ\text{C}$ )洗脱。洗脱液冷却、准确调制体积为  $10\text{ml}$ , 取  $1\text{ml}$  后经  $0.45\mu\text{m}$  针头过滤器过滤, 供分析用。

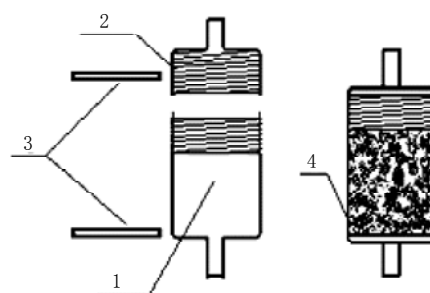
## 2 结果与分析

### 2.1 检测波长的选择

为了考察检测波长对有机酸检测灵敏度的影响, 用  $200\sim 400\text{nm}$  紫外光对柠檬酸、苹果酸、草酸、乙酸、乳酸和琥珀酸分别进行了扫描, 光谱图见图 3。结果表明, 这 6 种酸在  $210\text{nm}$  左右都有较强的吸收, 故确定检测波长为  $210\text{nm}$ 。

### 2.2 流动相的选择

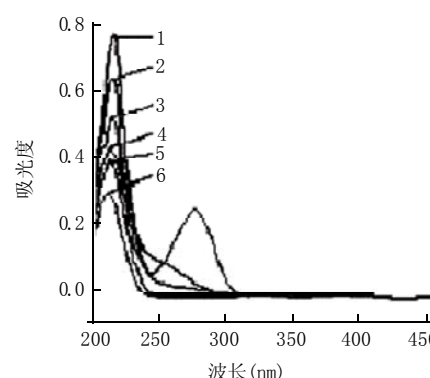
有机酸在水相中大部分以离子态存在, 而离子在反相色谱柱上几乎无保留, 故采用抑制电离的方法, 使其变为分子态的酸在柱子上保留而得到分离。 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液作为一种弱酸电离抑制剂在紫外区几乎无吸



1. 聚四氟乙烯装填管(带螺纹); 2. 聚四氟乙烯柱帽(带螺纹); 3. 筛板; 4. 样品。

图2 固相萃取柱

Fig.2 Extraction column of solid phase



1. 草酸; 2. 乙酸; 3. 柠檬酸; 4. 乳酸; 5. 苹果酸; 6. 琥珀酸。

图3 各有机酸紫外光谱图

Fig.3 UV spectrum of all organic acids

收, 因此, 用其作为测定有机酸的流动相有利于有机酸的分离而不影响检测。由于较高浓度的盐缓冲溶液对泵和柱子都有影响, 而较低浓度的盐缓冲溶液又对分离有影响, 故选择  $0.01\text{mol/L}$  的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液作流动相的主要成分。

用磷酸调节  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液的  $\text{pH}$  值至  $3.8$ 、 $3.6$ 、 $3.4$ 、 $3.2$ 、 $3.0$ 、 $2.8$ 、 $2.6$ 、 $2.4$  和  $2.2$ , 分别用来测定柠檬酸、苹果酸、草酸、乙酸、乳酸和琥珀酸及其混合样。结果发现, 当  $\text{pH}$  值  $\geq 3.0$  时, 一些有机酸有明显的前沿峰, 草酸分离度不高, 且混合标样中的乙酸和柠檬酸不能完全分开; 但  $\text{pH}$  值太低, 大部分有机酸保留时间延长, 达不到快速分离的效果, 而且低  $\text{pH}$  值的流动相对柱子寿命有影响。 $\text{pH}$  值在  $2.4\sim 3.0$  之间效果最好, 因此实验选用  $\text{pH} 2.98$  的流动相。

同时, 为了达到快速分离的效果, 选择另外一种洗脱能力较强的流动相甲醇进行实验。结果发现, 当甲醇浓度大于  $3\%$  (体积分数, 下同) 时, 混合酸中乙酸与柠檬酸不能分开; 当甲醇浓度为  $1.5\%$  时, 分离时间较长, 且山楂中柠檬酸没有被分离出来。甲醇浓度为  $2.0\%$  时, 这六种有机酸的分离都比较合适, 因此实验选择流动相中甲醇浓度为  $2.0\%$ 。

### 2.3 色谱柱和柱温的选择

用普通色谱柱分离有机酸分析时间长, 要  $10\text{min}$  以

上,为了能显著的缩短分离时间,我们研究了用 ZORBAX Stable Bound(4.6mm×50mm, 1.8μm)快速分离柱分离有机酸的方法,结果表明,用该色谱柱六种有机酸在 3.0min 内可达到完全分离,是目前液相色谱测定有机酸分离时间最短的方法之一。ZORBAX Stable Bound 色谱柱还适合在酸性条件下使用,在 pH1~8 范围内有很好的稳定性,因此本实验选用该色谱柱。结果表明,柱温对有机酸的分离没有显著影响,因此实验选用室温条件。

#### 2.4 样品处理条件

在基质固相分散中,固相分散剂同时起着支持剂、吸附剂和净化剂的作用,它的选择非常重要。石墨化碳黑球属于反相材料,对小极性物质有较强的吸附,而大极性物质吸附弱,研磨时样品中的各种组分根据极性的不同吸附在石墨化碳黑球上。根据相似相容原理,在提取山楂中的有机酸时,山楂中还含有其它成分,如蛋白质,脂肪、萜类物质、多酚等干扰成分。当山楂样品和反相石墨化碳黑球研磨后,蛋白质,脂肪、萜类物质、多酚等非极性的干扰组分吸附在非极性的石墨球上,用热水洗脱时,有机酸极性很大,在反相柱上不保留,被洗脱剂洗下,而与反相石墨球结合强的蛋白质,脂肪、萜类物质、多酚等干扰成分保留在石墨球上,因此反相石墨球能好的起到提取净化效果,本实验选择其为分散剂。

为了能让有机酸充分洗下而干扰物尽可能多的保留在石墨化碳黑球上,达到制备样品并有效分离干扰物的目的,实验选用水为洗脱剂,而山楂中的有机酸有的以结合态存在,需用酸洗脱使结合态的有机酸置换出,因此实验选择先用 0.1mol/L 的磷酸洗脱再用水洗脱的方法,实验表明洗脱效率随温度的增加而增加,以 5ml/min 的流速,常温下需要 20ml 0.1mol/L 的磷酸,30ml 以上的水才能让有机酸完全洗下,但是在 80℃ 以上,约 4ml 0.1mol/L 的磷酸和 5ml 左右的水就能把样品中的有机酸完全洗下(合并残渣回流提取后没有有机酸检出),因此实验选择装好柱后以 5ml/min 的流速用 4ml 0.1mol/L 的磷酸(大于 80℃)洗脱,再用稍少于 6ml 的热水(大于 80℃)洗脱的方法。

#### 2.5 回收率实验及精密度

精密度实验样品平行测定五次,并按五次测定的结果计算相对标准偏差。回收率实验取相同样品两份,其中一份加入已知量有机酸标样,另一份不加,通过加入有机酸的测出量计算回收率,结果见表 1。表 1 数据表明,该方法具有较高的回收率和较好的精密度。

#### 2.6 回归方程、相关系数及检测限

分别配制浓度约为 500、100、20、4、0.8μg/ml 的有机酸混合标准溶液,进样后计算出不同浓度的峰面积,计算出回归方程,结果见表 2。

#### 2.7 样品分析及结果

表 1 方法精密性及回收率

Table 1 Precision and recovery of the method

组分	加入量(μg)	测出量(μg)	回收率(%)	RSD%(n=5)
柠檬酸	20	19.0	96	2.1
苹果酸	50	48.8	98	2.2
草酸	20	18.8	95	2.8
乙酸	5	4.71	94	3.0
乳酸	5	4.75	95	2.5
琥珀酸	10	9.6	96	2.6

表 2 工作曲线及检测限

Table 2 Working curve and detection limit

组分	回归方程	相关系数	检测限(μg/L)
柠檬酸	$A = 5.118 \times 10^3 C (\mu\text{g/ml}) + 82$	0.9992	120
苹果酸	$A = 4.97 \times 10^3 C (\mu\text{g/ml}) + 68$	0.9994	150
草酸	$A = 6.84 \times 10^3 C (\mu\text{g/ml}) - 102$	0.9995	80
乙酸	$A = 3.05 \times 10^3 C (\mu\text{g/ml}) + 136$	0.9986	200
乳酸	$A = 2.84 \times 10^3 C (\mu\text{g/ml}) - 88$	0.9992	150
琥珀酸	$A = 4.62 \times 10^3 C (\mu\text{g/ml}) + 105$	0.9993	100

样品按 2.3 实验方法处理,并按选定色谱条件测定,结果见表 3。

表 3 山楂样品分析结果

Table 3 Contents of each organic acids in *C.pinnatifida* Bunge

样品	测定值(μg/g)					
	柠檬酸	苹果酸	草酸	乙酸	乳酸	琥珀酸
山楂(大理)	4.58	6.48	1.36	0.184	0.245	0.464
山楂(昆明)	4.22	6.02	1.17	0.163	0.231	0.456
山楂(丽江)	3.54	5.56	1.06	0.252	0.218	0.438
山楂(玉溪)	4.76	6.87	1.46	0.216	0.263	0.387

### 3 结论

本方法以 ZORBAX Stable Bound(4.6mm×50mm, 1.8μm)快速分离柱为固定相,0.01mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH2.98)和甲醇为流分离山楂中的有机酸,六种有机酸在 3.0min 内可达到完全分离,是目前液相色谱测定山楂中有机酸分离时间最短的方法之一。且在样品前处理中采用了基质固相分散技术,样品前处理步骤非常简单,不需要特殊的仪器设备,成本低。总之,该方法准确可靠,重现性好,回收率满意,检出限较低,可用于山楂中有机酸含量的质量分析与控制,具有实用价值。

#### 参考文献:

- 陈佳, 宋少江. 山楂的研究进展[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(7): 20-23.
- 方阔, 花小虎. 山楂的药理与临床应用研究进展[J]. 海峡药学, 1998, 10(3): 1-3.
- 段幼生, 王梅, 孙明娜, 等. 基质固相分散在农药残留分析中的应用研究进展[J]. 农药, 2006, 45(8): 508-510.
- 乌日娜, 李建科. 基质固相分散在食品安全分析中的应用[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 266-268.
- BARKER S A. Matrix solid-phase dispersion[J]. J Chromatography A, 2000, 885(1): 115-127.