

高效液相色谱法测定发酵液中有机酸

辛 梅 华

(应用化学系)

摘要 建立反相 HPLC 测定酒石酸、苹果酸、乳酸、醋酸、柠檬酸的色谱条件,在 ODS 柱上以 0.3mol/L KH_2PO_4 (pH2.5) 缓冲溶液作流动相,10min 内完成以上五种有机酸的同时测定。检测限低于 10ng/ml,线性范围 0—800 $\mu\text{g/ml}$ 。

关键词 有机酸,高效液相色谱法

0 前言

目前,测定有机酸的主要方法有气相色谱法^[1]、离子色谱法^[2,3]、离子排斥色谱法^[4,5]和反相 HPLC 法^[6],各有特点和不足之处。本文以最常用的 ODS 柱(C_{18} 烷基键合柱)为固定相,研究了洗脱液中 KH_2PO_4 浓度及 pH 对色谱分离的影响,建立了分离检测以上五种有机酸的色谱条件,并用于发酵液中有机酸含量的测定。方法简便、快速、灵敏,可用于食品等多种样品中有机酸含量的测定。

1 实验部分

1.1 仪器

(1)日本岛津高效液相色谱仪包括 LC-6A 泵, SIL-6A 自动进样器, SPD-6AV 紫外—可见分光光度检测器, C-R3A 数据处理装置。(2)色谱柱: Shim-pack CLC-ODS, 15cm \times 6.0mm \varnothing , 5 μm 。(3)pHS-2 型酸度计, 上海产。

1.2 试剂

(1)标准溶液:酒石酸、柠檬酸、DL-苹果酸、乳酸、冰醋酸配成浓度为 1mg/ml 的水溶液,存于冰箱中,用时稀释至所需浓度。(2)流动相:配制 0.3mol/L KH_2PO_4 缓冲溶液,用 H_3PO_4 调节 pH 至 2.5, 5 μm 玻璃砂芯漏斗过滤,除气。(3)样品溶液:发酵液经 5 μm 砂芯漏斗过滤,稀释 1000 倍后进行分析。(4)试剂均在分析纯以上,水为二次重蒸水。

• 本文 1992-10-04 收到。

1.3 分析方法

流动相流速为1ml/min, 室温($24 \pm 2^\circ\text{C}$), 检测波长215nm. 进样量20 μl , 衰减1, 外标法峰高定量, 分析结果直接由C-R3A打印出。

2 结果与讨论

2.1 流动相离子强度对色谱分离的影响

在反相色谱中, 流动相加入中性盐能增加流动相的表面张力, 从而改变溶质的 k' 值和选择性^[7]。由实验发现, 流动相中不添加电解质, 直接用水作流动相, 在流速为1.5ml/min时, 各有机酸的保留时间分别为酒石酸16min、乳酸9min、DL苹果酸8和15min、柠檬酸18min、醋酸4min, 除醋酸外, 其它有机酸保留时间长且峰形差, 峰拖尾严重, 不利于分离和检测。加入适量 KH_2PO_4 后保留时间大大缩短, 峰形见好。图1是在流动相的pH为2.5时, 各有机酸的容量因子 k' 随 KH_2PO_4 浓度变化关系图, 由图可见, 随着 KH_2PO_4 浓度的增大, 各组分的 k' 略有增加, 但 KH_2PO_4 浓度超过0.3mol/L后, 又开始下降, 本文选择 KH_2PO_4 浓度为0.3mol/L进行实验。

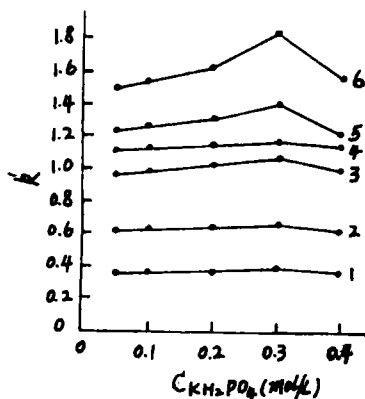


图1 KH_2PO_4 浓度对 k' 的影响
流动相: KH_2PO_4 0.05-0.4mol/L, pH2.5; 其它条件同图3; 图中
1. 酒石酸, 2. D-苹果酸, 3. 乳酸, 4. 醋酸, 5. 柠檬酸, 6. L-苹果酸

2.2 流动相 pH 对色谱分离的影响

以0.3mol/L KH_2PO_4 水溶液作流动相, 用 H_3PO_4 调节pH, 试验了各种pH的 KH_2PO_4 缓冲溶液对 k' 的影响如图2所示。由图可见, 随着pH增大, 各有机酸的 k' 值下降, 柠檬酸和L-苹果酸的下降幅度最大, 当 $\text{pH} > 3.0$ 时, 洗脱顺序发生了变化。这是因为随着流动相pH的增大, 有机酸的离子化程度增大, 亲水性增强, 结果 k' 值减小。pH在2.0-2.8之间分离度较好, 但酸度太低对键合固定相不利, 本文选择pH2.5进行实验。

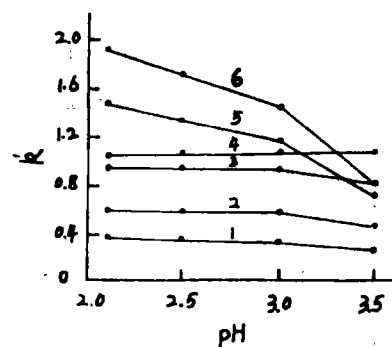


图2 流动相 pH 对 k' 的影响
流动相: KH_2PO_4 0.3mol/L, pH2.2-3.5; 其它条件同图3; 图中, 1. 酒石酸, 2. D-苹果酸, 3. 乳酸, 4. 醋酸, 5. 柠檬酸, 6. L-苹果酸

2.3 其它条件选择

(1) 温度对色谱分离的影响 柱温为 40°C 时, 柠檬酸及L-苹果酸保留时间较短, 分离度差, 且乳酸与醋酸重叠, 本文选择分离度较好的室温($24 \pm 2^\circ\text{C}$)进行实验。

(2) 流动相流速对色谱分离的影响 流动相流速为1.5ml/min时, 洗脱太快, 色谱峰重叠; 流速在0.5ml/min或0.8ml/min时, 保留时间较长, 峰拖尾严重, 不利于分离, 本实验选择流速为1.0ml/min。

(3) 选择有机酸吸收峰最大的UV215nm作为检测波长进行检测。

根据以上实验所选的最佳色谱条件测得酒石酸、苹果酸、乳酸、醋酸、柠檬酸的标准色谱图如图3所示, 五种酸在10min内可同时分离测定。并且由D-及L-苹果酸的色谱可知DL-

苹果酸的色谱图中,第一个峰为 D-苹果酸,第二个峰为 L-苹果酸。

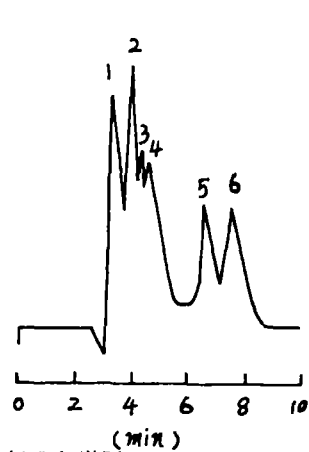


图3 标准色谱图

(色谱柱:Shim-packCLC-ODS;
流动相:KH₂PO₄ 0.3mol/L,pH2.5;
流速:1ml/min;柱温:室温;检测波长:UV215nm;
衰减:1;进样量:20μl;图中,1. 酒石酸,2. D-苹果酸,
3. 乳酸,4.醋酸,5柠檬酸,6. L-苹果酸)

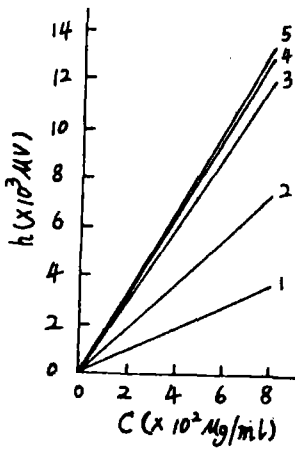


图4 线性关系曲线(图中,1. 乳酸、醋酸,2. 柠檬酸,
3. L-苹果酸,4. 酒石酸,5. D-苹果酸)

2.4 工作曲线的线性范围及检测限

按照图3的实验条件对有机酸的标准溶液进行测定,得出峰高与浓度之间的关系图如图4所示。由图可见,各组分在含量为0—800μg/ml 范围内线性关系良好,且通过原点,其检测限(S/N=2)分别为酒石酸2.1ng/ml、D-苹果酸2.0ng/ml、乳酸7.2ng/ml、醋酸7.2ng/ml、柠檬酸3.1ng/ml、L-苹果酸2.3ng/ml。对各酸含量分别为100μg/ml 的混酸标准溶液进行十次平行测定,其结果相对标准偏差(%)分别为0.5,0.2,0.8,0.3,0.5。

2.5 样品分析

2.5.1 合成样分析 采用标准加入法入对合成样中有机酸的含量进行测定,三次结果的平均值如表1所示。

表1 合成样品测定

有机酸	加入量(μg/ml)	测得量(μg/ml)
酒石酸	200	201.2
D-苹果酸	100	102.0
乳酸	200	204.1
醋酸	200	192.1
柠檬酸	200	195.4
L-苹果酸	100	98.5

2.5.2 发酵液分析 取乳酸发酵液经离子交换柱处理后,用5 μ 砂芯漏斗过滤,稀释1000倍后直接进行分析,峰高定量,结果如表2,样品回收率在90—105%范围内。

表2 发酵液分析*

组分	含量(μ g/ml)	添加量(μ g/ml)	测得量(μ g/ml)	回收率(%)
酒石酸	2.36	5	7.61	105
乳酸	44.83	50	89.33	89
柠檬酸	7.31	10	17.11	98

* 三次测定结果平均值。

3 结论

本文建立的高效液相色谱法测定有机酸,其方法具有简便、快速、灵敏之特点,加上适当的前处理,可用于食品等多种样品中以上几种有机酸含量的测定。

参 考 文 献

- [1] 余兆楼等,分析化学,19,1(1991),11—15.
- [2] CHONG, W. K., et al., J. Chromatog., 487, (1989), 147—153.
- [3] 朱岩,分析测试通报,9,5(1990),74—76.
- [4] 牟世芬等,色谱,10,3(1992)133—136.
- [5] 向丽娟,分析测试通报,11,3(1992)41—44.
- [6] 王玉君等,色谱,9,4(1991),271—272.
- [7] 朱彭龄等,现代液相色谱,兰州大学出版社,(1989),146.

Determination of Organic Acids in Fermentation Liquor by High Performance Liquid Chromatography

Xin Meihua

(Department of Applied Chemistry)

Abstract For determining tartaric acid, malic acid, lactic acid, acetic acid and citric acid in fermentation liquor by reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC), 0.3 mol/L KH_2PO_4 buffer (pH 2.5) is taken as mobile phase and the conditions of chromatography are established. The above five organic acids are determined simultaneously on ODS column in 10 minutes, with a limit of detection below 10 ng/ml and a linear range of 0—800 μ g/ml.

Key words organic acid, high performance liquid chromatography, fermentation liquor