

高效液相色谱法测定北五味子有机酸含量

唐苗苗¹,刘翼翔¹,毛婷¹,李蒙蒙¹,吴薇^{2,*},籍保平^{1,*}

(1.中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京100083;

2.中国农业大学工学院,北京100083)

摘要:采用高效液相色谱法确定北五味子中主要有机酸,通过反相色谱法和离子排斥色谱法分离效果比较,选择阳离子交换色谱柱作为北五味子有机酸分析柱,确定北五味子中主要有机酸为苹果酸、柠檬酸、莽草酸,其中莽草酸在北五味子中首次发现。通过条件优化,确定离子排斥色谱分离有机酸的最佳条件为,色谱柱:阳离子交换色谱柱 Shim-pack SCR.102H(8.0mm i.d.×300mm);流动相:0.1%磷酸水溶液;流速0.8mL/min,柱温45℃;进样量:10μL;检测波长:210nm。检测结果:北五味子鲜果中,柠檬酸含量为3.26%±0.06%,苹果酸为1.13%±0.04%,莽草酸为0.53%±0.01%。

关键词:北五味子,高效液相色谱,有机酸,莽草酸

Determination of organic acids in *Schisandra chinensis* by HPLC

TANG Miao-miao¹, LIU Yi-xiang¹, MAO Ting¹, LI Meng-meng¹, WU Wei^{2,*}, JI Bao-ping^{1,*}

(1.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China;

(2.College of Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China)

Abstract: The main organic acids of *Schisandra chinensis* were determined by high performance liquid chromatography, choosing cation exchange column Shim-pack SCR.102H (8.0mm i.d. × 300mm) as analytical column of *Schisandra chinensis* organic acids compared with Agilent ZOBAX × SB-C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm) column. Mobile phase was 0.1% H₃PO₄ with flow rate of 0.8mL/min at 45℃. Detection wavelength was 210nm. The injection volume was 10μL. The main organic acids of *Schisandra* fresh fruit are malic acid, citric acid and shikimic acid which was first found in *Schisandra chinensis*, and the citric was (3.26 ± 0.06) g/100g, malic acid was (1.13 ± 0.04) g/100g, shikimic acid was (0.53 ± 0.01) g/100g.

Key words: *Schisandra chinensis*; high-performance liquid chromatography; organic acids; shikimic acid

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)15-0328-03

北五味子(*Schisandra chinensis*), 木兰科五味子属植物, 落叶木质藤本, 为常用中药, 产于黑龙江, 吉林, 辽宁, 内蒙古, 河北, 山西, 宁夏, 甘肃, 山东^[1]。北五味子是作为药食两用植物, 其性温, 归肺、心、肾经, 具有收敛固涩, 益气生津, 补肾宁心的作用, 该品既能补益心肾, 又能宁心安神。在实际应用中, 北五味子常用于中药配伍中, 在食品开发中也有人做过研究^[2-3], 但市场上的相关产品较少, 这主要是因为北五味子的含酸量较高, 根据可滴定酸实验检测结果, 北五味子总酸含量为4.93g/100g(以柠檬酸计), 导致其酸味过重, 口感风味不佳, 在产品研发中存在较大困难。脱酸等工艺是开发北五味子保健食品的重要手段之一, 对北五味子中有机酸的组成及含量分析是研究五味子脱酸的基础, 而且, 根据各有机酸的功效特性, 对有机酸进行选择性的脱除有利于功能成分的最大保留。但是, 在现有文献报道中, 关于北五味子的有机酸分析较少, 已有的报道多为五味子

可滴定酸的检测^[4], 而对于其具体有机酸成分及其组成情况尚不清楚。因此, 本文对北五味子有机酸种类以及含量进行了分析, 弥补了对北五味子有机酸研究的一个空白, 而且对于北五味子功能食品的研发具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

北五味子 吉林长白山制药有限责任公司; 草酸、苹果酸、柠檬酸、丙酮酸、乙酸 日本和光纯药工业株式会社, 超纯级; 乳酸 Sigma-Aldrich 公司, 色谱纯; 莽草酸 上海源叶生物科技有限公司, 色谱纯; 甲醇 美国 J.T.Baker 公司, 色谱纯; 磷酸 北京化工厂, 分析纯。

SHIMADZU IC-IOA 型高效液相色谱仪 配有二个泵(LC-10Avp), 柱温箱(CTO-10Avp)和二极阵列检测器(PDA-10Avp)、Shim-pack SCR-102H(8.0mm i.d.×300mm)色谱柱, 保护柱为 SCR-102HG, 日本岛津公司; Agilent ZOBAX × SB-C₁₈(250mm × 4.6mm, 5μm)色谱柱 安捷伦公司。

1.2 实验方法

收稿日期: 2011-12-14 * 通讯联系人

作者简介: 唐苗苗(1987-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学。

1.2.1 样品处理方法 随机取 50g 左右 -20℃ 冷冻的北五味子鲜果, 破碎碾磨后从中准确称取约 5g 置于 50mL 的容量瓶中, 加入蒸馏水 40mL, 超声波提取 120min 后定容至 50mL。提取液经 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤后, 稀释 5 倍待测。

1.2.2 色谱柱的选择

1.2.2.1 阳离子交换色谱柱色谱分离条件 色谱柱: 阳离子交换色谱柱 Shim-pack SCR.102H (8.0mm i.d. \times 300mm); 流动相: 0.1% 磷酸水溶液, 流速 0.8mL/min, 柱温 45℃; 进样量: 10 μ L; 检测波长: 210nm; 采用色谱峰保留时间定性, 外标法峰高定量。

1.2.2.2 Agilent ZOBAX \times SB-C₁₈ 柱色谱分离条件^[5]

色谱柱: Agilent ZOBAX \times SB-C₁₈ (250mm \times 4.6mm, 5 μ m); 流动相: 5% 甲醇 - 95% pH2.5 磷酸水溶液 (v/v), 流速 0.8mL/min, 柱温 35℃; 进样量: 10 μ L; 检测波长: 210nm; 采用色谱峰保留时间定性。

1.2.3 阳离子交换色谱柱色谱分离条件的优化

1.2.3.1 检测波长的选择 通过二极管阵列检测器, 对有机酸做全波长扫描 (190~600nm), 选择各有机酸响应值最高的波长作为检测波长。

1.2.3.2 检测温度的选择 根据阳离子交换色谱柱 Shim-pack SCR.102H 的特性及使用说明, 使用温度不宜低于 40℃, 以避免使用过程中柱压过高, 不利于色谱柱的保护和长期使用, 因此设定检测温度为 40、45、50℃ 三个温度, 观察有机酸的分离效果。

1.2.3.3 检测流速的选择 设置流动相的流速为 0.4、0.6、0.8、1.0mL/min, 比较不同流速下的液相图谱, 确定最佳流速。

1.2.4 北五味子有机酸的检测

1.2.4.1 北五味子有机酸种类的确定 通过离子排斥色谱保留时间对北五味子处理样品进行有机酸性, 确定其含有有机酸种类。

1.2.4.2 标准曲线的制作以及北五味子有机酸含量的确定 用去离子水配制 2000mg/L 有机酸的储备液, 用去离子水稀释至 50、100、200、250、500、1000、1500、2000mg/L, 作为检测用有机酸标准溶液。

北五味子全果提取液, 采用流动相稀释 5 倍, 0.45 μ m 滤膜过滤, 进样量为 10 μ L, 采用外标法定量。每份样品进行 5 次平行测定。

2 结果与讨论

2.1 C₁₈反相色谱法与离子排斥色谱法分析有机酸效果比较

反相色谱法与离子排斥色谱法的分离原理不同, 分离效果不同, 通过对 7 种有机酸的分离比较, 阳离子交换色谱柱的分离效果比 C₁₈柱的效果好。如图 1 所示, 阳离子交换色谱柱分离色谱图中 7 种有机酸分离程度较好, C₁₈柱中 7 种有机酸不能完全分离, 且出峰时间太短, 与色谱柱的死时间接近。因此, 通过分析比较, 选择阳离子交换色谱柱 Shim-pack SCR.102H 作为北五味子的分析色谱柱。

2.2 离子排斥色谱法条件优化结果

2.2.1 检测波长的确定 通过二极管阵列检测器, 对有机酸做全波长扫描 (190~600nm), 结果显示在

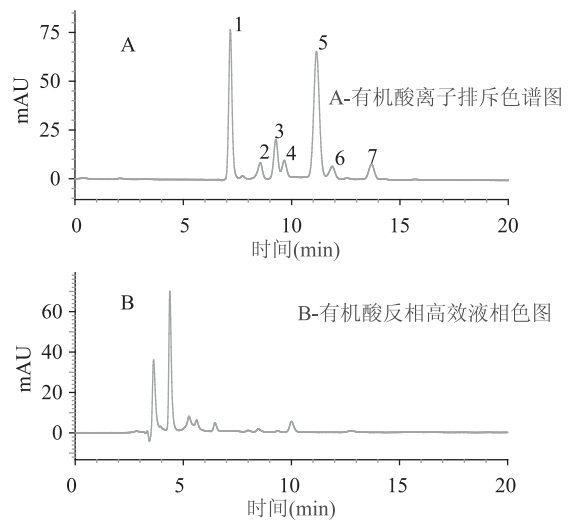


图 1 有机酸分离色谱图

Fig.1 Chromatograms of organic acid

注: 1-草酸; 2-苹果酸; 3-丙酮酸; 4-柠檬酸; 5-莽草酸; 6-乳酸; 7-醋酸。

210nm 时有机酸的响应值最大, 故选择 210nm 为检测波长。

2.2.2 检测温度的选择 通过不同温度下有机酸分离效果比较, 45℃ 时分离效果最佳, 柱温过度升高会缩小有机酸的分离度。

2.2.3 检测流速的选择 在分离检测流速的选择中, 流速过大会使色谱柱压力过大, 阳离子交换色谱柱 Shim-pack SCR.102H 的最大承受压力为 50kg/cm², 相比较于 C₁₈柱, 需要在较低压力下使用。设置流速过小, 会增加分离中目标物的扩散作用, 使得分离效果不佳, 通过实验比较, 流速为 0.8mL/min 时分离效果好且有利于色谱柱的保护。

2.3 北五味子中有机酸的定性定量分析

2.3.1 北五味子有机酸定性分析 通过离子排斥色谱保留时间对有机酸进行定性, 北五味子检测出的有机酸的出峰时间分别与标品中的苹果酸 (8.557min), 柠檬酸 (9.656min) 以及莽草酸 (11.151min) 出峰时间一致, 确定五味子鲜果中主要有有机酸种类为苹果酸, 柠檬酸和莽草酸, 结果如图 2 所示。

2.3.2 有机酸标准曲线 取有机酸标准液, 以峰高 H (mV) 和质量浓度 C (mg/L) 求线性回归方程。取北五味子提取液, 检测其中的有机酸含量, 取同一批北五味子提取液添加一定量的各种有机酸标品溶液后测定各成分含量, 每份样品进行 5 次平行测定, 考察方法的回收率和精密度, 回收率及精密度均符合要求, 检测结果见表 1。

2.3.3 北五味子有机酸含量分析 由表 1 可以看出, 离子排斥色谱法检测有机酸的回收率与精密度良好, 适用于北五味子中有机酸的检测。从表 2 可以看出, 北五味子中主要有有机酸为柠檬酸, 苹果酸以及莽草酸, 其中柠檬酸和苹果酸占北五味子总酸的 90% 左右, 柠檬酸含量占总酸的 60% 以上, 北五味子汁的 pH 为 2.91, 柠檬酸的 pK₁ 为 2.87^[6], 苹果酸的

表1 有机酸检测回归分析及检出限,相关系数

Table 1 Linear ranges, coefficient of determination(R^2), limit of quantification(LOQ) and limit of detection(LOD)of the organic acids

有机酸	回归方程	相关系数	检测范围(mg/L)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
柠檬酸	$H = 0.0466C + 1.5091$	0.9970	50~2000	109.7	0.59
苹果酸	$H = 0.0343C + 0.492$	0.9981	50~2000	103.5	1.25
莽草酸	$H = 1.8596C + 14.505$	0.9981	50~500	106.2	0.68

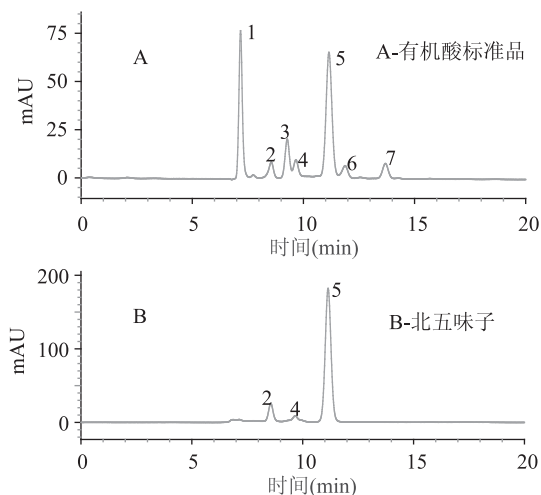


图2 有机酸分析离子排斥色谱图

Fig.2 Chromatograms of organic acid by HPICE (High-performance ion-exclusion chromatography)

注:1-草酸;2-苹果酸;3-丙酮酸;4-柠檬酸;
5-莽草酸;6-乳酸;7-醋酸。

pK1 为 3.24,北五味子的 pH 和柠檬酸的 pK1 相近,北五味子中的主要呈酸物质为柠檬酸。根据柠檬酸,苹果酸以及莽草酸的结构性质,在酸脱除过程中,可以利用其极性的不同对其进行选择性脱除。

表2 北五味子中有机酸含量

Table 2 Content of organic acids in Schisandra chinensis

样品	柠檬酸 (g/100g)	苹果酸 (g/100g)	莽草酸 (g/100g)
五味子鲜果	3.26 ± 0.06	1.13 ± 0.04	0.53 ± 0.01

莽草酸为莽草酸途经的中间产物,它在木兰科八角属植物八角中含量较高,为 8%~13%^[7],具有抗肿瘤的效果,对心血管系统也具有作用,在禽流感病毒肆虐期间,莽草酸作为合成抗击禽流感药物“达菲”的主要原料。北五味子为木兰科五味子属植物,与木兰科八角属亲缘接近^[8],通过定性定量检测,首次确定北五味子鲜果中含有莽草酸,莽草酸的含量

为 0.53%。北五味子中功能成分的研究主要集中于木脂素,五味子多糖以及五味子油等,关于莽草酸的报道较少,莽草酸具有抗肿瘤的作用,对心血管系统也具有作用^[6],北五味子中莽草酸的检出及含量的测定对于其相关的功能研究具有重要的指导和参考价值。

3 结论

通过比较,离子排斥色谱法检测北五味子中有机酸分离效果好,回收率好,精密度高,是北五味子有机酸检测分析的较佳选择方法。通过高效液相定性和定量检测,确定北五味子鲜果中的主要有机酸为柠檬酸,苹果酸以及莽草酸,柠檬酸含量为 $3.26\% \pm 0.06\%$,苹果酸为 $1.13\% \pm 0.04\%$,莽草酸为 $0.53\% \pm 0.01\%$ 。首次发现北五味子中莽草酸的存在,莽草酸具有抗肿瘤的效果,对心血管系统也具有作用,它的发现对于北五味子功能作用的研究提供了新思路。

参考文献

- [1] 刘玉壶.中国植物志[M].北京:科学出版社,2004:252.
- [2] 文连奎,张久丽,姜明珠,等.北五味子露酒加工工艺研究[J].食品科学,2005,26(9):278-280.
- [3] 马荣山,董凌旭,教传勇.利用饴糖发酵五味子酒的参数测定与质量评定[J].中国酿造,2009(9):121-123.
- [4] 吴建兵,王誉浩,赵铁,等.电位滴定法测定五味子中总游离有机酸[J].中草药,2007,38(2):281-282.
- [5] 韩雅珊.食品化学实验指导[M].北京:中国农业出版社,1996:13-15.
- [6] Vera E, J Ruales, et al. Comparison of different methods for deacidification of clarified passion fruit juice[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 59(4):361-367.
- [7] 邝米,马锦林,张日清,等.莽草酸的研究综述[J].广西林业科学,2009,38(1):45-47.
- [8] 刘玉壶.中国植物志[M].北京:科学出版社,2004:232.

(上接第 327 页)

[9] Ciri E, Recchia S, Dossi C, et al. Validation of an isotope dilution, ICP-MS method based on internal mass bias correction for the determination of trace concentrations of Hg in sediment cores[J]. Talanta, 2008, 74(4):642-647.

[10] Bednar A J. Determination of vanadium by reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Talanta, 2009, 78(2):453-457.

[11] Longerich H P. Effect of nitric acid, acetic acid and ethanol

on inductively coupled plasma mass spectrometry ion signals as a function of nebuliser gas flow, with implication on matrix suppression and enhancements[J]. J Anal Atom Spectrom, 1989, 4(8):665-667.

[12] Elwaer N, Hintelmann H. Comparing the precision of selenium isotope ratio measurements using collision cell and sector field inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Talanta, 2008, 75(1):205-214.