

基于新型立体结构的色谱固定相的高效液相色谱法检测分离7种有机酸

张 传, 金小青, 赵岳星*

(浙江师范大学生化学院, 金华 321004)

摘 要: **目的** 制备新型立体结构色谱固定相并开发新的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分离7种有机酸的方法。**方法** 采用新型立体结构固定相对7种有机酸进行分离,以5%甲醇-95% 10 mmol/L 甲酸铵(pH=3.0)水溶液作为流动相进行等度洗脱;流速为1.0 mL/min;柱温:40 ℃;紫外检测波长:220 nm;进样体积:10 μL,采用HPLC进行检测。**结果** 制备了新型立体结构固定相,具有与常规C₁₈固定相相似的疏水作用,8 min内完全分离7种有机酸,且分离效果较好。**结论** 本方法具有保留增强、快速及分离效果好等优势,可用于多种有机酸的分离测定。

关键词: 有机酸; 高效液相色谱法; 立体结构色谱固定相

Separation and development of 7 organic acids by high performance liquid chromatography with a new solid structure stationary phase

ZHANG Chuan, JIN Xiao-Qing, ZHAO Yue-Xing*

(Institute of Physical Chemistry, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

ABSTRACT: Objective To prepare a new solid structure stationary phase and establish a new method for separation of 7 organic acids by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Totally 7 organic acids were separated by new solid structure stationary phase with the 5% methanol-95% 10 mmol/L ammonium formate (pH=3.0) solution as a mobile phase for isocratic elution. Flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 40 ℃, detection wavelength was 220 nm and injection volume was 10 μL. Then the samples were detected by HPLC. **Results** A new solid structure stationary phase was prepared, which had hydrophobic effect similar to that of C₁₈ stationary phase by new solid structure stationary phase. Totally 7 organic acids were completely separated within 8 min, and the separation effect was better. **Conclusions** The established method has the advantages of strong retention, rapid determination and good separation efficiency, which is suitable for detection of many organic acids.

KEY WORDS: organic acid; high performance liquid chromatography; solid structure chromatographic stationary phase

*通讯作者: 赵岳星, 教授级高级工程师, 主要研究方向为药物分析与食品安全检测。E-mail: eugenezhao@zjnu.cn

*Corresponding author: ZHAO Yue-Xing, Professorate Senior Engineer, Institute of Physical Chemistry, Zhejiang Normal University, No.688, Yingbin Road, Jinhua 321004, China. E-mail: eugenezhao@zjnu.cn

1 引言

有机酸是决定果汁及其酒类饮品口感酸味的主要成分,有机酸的含量和种类直接影响到果汁及其酒类饮品的品质。而且不同种类天然果汁中,有机酸的种类和含量差别很大。在一定条件下,可以通过测定各种有机酸的含量来鉴别果汁饮料是否掺假。因此,多种有机酸的分析测定具有实际重要的意义^[1-6]。

有机酸的测定过去多用化学法,以酸度形式表示,所需费用较低,但影响因素很多,准确度差^[7];还有气相色谱法^[8-10],但常因酸的沸点较高,不易气化而需要先对其衍生酯化后再进行测定,方法繁琐;近年来,已有用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定有机酸的报道^[11-14],高效液相色谱法灵敏简便,样品不需过多繁琐的前处理,因此更快捷和准确。高效液相色谱法测定多种有机酸多采用常规 C₁₈ 固定相,有机酸属于极性较强的化合物,而 C₁₈ 固定相适用于分离非极性和极性较弱的化合物,所以在用常规 C₁₈ 固定相分离多种有机酸时,容易出现流动相复杂,保留时间长等问题,因此对于更优的多种有机酸的分离方法的构建一直是众多色谱工作者的研究方向。

本文制备了新型立体结构色谱固定相,一种硅胶表面键合金刚烷^[15,16]基团的新型固定相,并通过条件优化,基于该立体结构的色谱固定相开发了新的高效液相色谱分离 7 种有机酸的方法,此方法具有快速、有效的特点。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); SB-120DT 超声波清洗机(功率 250 W, 频率 50 kHz, 宁波新芝生物科技股份有限公司); XW-80 A 涡旋混合仪振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 雷磁 PHS-3E pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); DZF-6020 真空干燥箱(上海龙跃仪器设备有限公司); 90 MPA 液相色谱装柱机(深圳市正大流体机电设备有限公司); YB-W400 移动式空压机(上海勇霸机电技术有限公司); Nicolet NEXUS670 红外光谱仪(美国 Thermo 公司)。

4 种不同类型的色谱柱分别为: 色谱柱 1, 自制立体结构色谱柱(键合相为金刚烷, 它是由 10 个碳原子和 16 个氢原子构成的对称结构的笼状烃, 4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 色谱柱 2, 月旭 Ultimate XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 色谱柱 3, 月旭 Ultimate AQ-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 色谱柱 4, 月旭 Ultimate LP-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)(色谱柱 2、3 和 4 为上海月旭科技股份有限公司提供)。

金刚烷基乙基三氯硅烷(adamantyl ethyl trichlorosilane, 98%, 上海倍卓生物科技有限公司); 甲酸铵、甲苯、丙酮、三乙胺(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 草酸、柠檬酸、富马酸、马来酸、酒石酸、抗坏血酸(Vc)、苹果酸、甲酸(分析纯, 中国 Aladdin 公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 超纯水(德国 Millipore Direct-Q 3 纯水系统)。

2.2 实验方法

2.2.1 立体结构固定相的制备

(1)在 250 mL 三口烧瓶中加入 10 g 未活化的硅胶和 60 mL 的浓盐酸, 磁力搅拌 4 h, 放置 24 h。抽滤, 然后用超纯水洗涤多次, 收集最后 1 次洗涤后的滤液, 用 pH 试纸检测其酸碱性, 直到滤液呈中性。120 °C 真空干燥 15 h。

(2)称取(1)预处理过的球形多孔硅胶 5 g 于 250 mL 三口烧瓶中, 加入 50 mL 干燥的甲苯, 机械搅拌使硅胶悬浮于溶液中, 然后加入 7 g 金刚烷基乙基三氯硅烷以及 1 mL 干燥过的三乙胺, 通入干燥的氮气, 105 °C 回流反应 24 h。

(3)停止反应, 将产物过滤, 并依次用 20 mL 干燥甲苯、甲苯、甲醇、无水乙醇以及丙酮洗涤 3 次, 80 °C 真空干燥 12 h 即得立体结构色谱填料。

(4)用匀浆法填充于 4.6 mm×250 mm 柱长的不锈钢色谱柱中。立体结构固定相制备原理图见图 1。

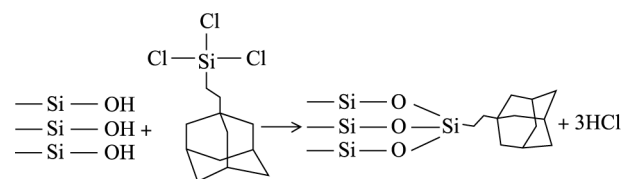


图 1 立体结构固定相制备原理图

Fig. 1 Principle diagram of preparation of solid structure stationary phase

2.2.2 红外光谱的测试条件

在红外光谱仪上对样品进行红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)的分析。测试样品的过程: 采用溴化钾(KBr)为稀释剂混合压片而成, 然后在红外灯下烘烤, 最后置于红外光谱仪中进行扫描。该测试的实验参数为: 分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描范围为 4000~400 cm⁻¹, 累计扫描 100 次。

2.2.3 有机酸标准溶液单标及混标的制备

有机酸标准溶液的配制: 准确称取苹果酸、柠檬酸各 25 mg, 酒石酸 15 mg, 抗坏血酸、草酸各 10 mg, 富马酸、马来酸各 2.5 mg, 用超纯水溶解并分别定容至 50 mL 容量瓶中。

7 种有机酸混合溶液的配制: 准确称取苹果酸、柠檬酸各 25 mg, 酒石酸 15 mg, 抗坏血酸、草酸各 10 mg, 富

马酸、马来酸各 2.5 mg, 用超纯水混合溶解并定容至 50 mL 容量瓶中。

2.2.4 流动相的配制

准确称取甲酸铵 0.63 g 并用超纯水溶解定容至 1 L 的容量瓶中, 随后超声 30 min, 最后用 0.45 μm 膜过滤, 即可使用。

2.2.5 色谱条件

4 种不同类型的色谱柱均采用 10 mmol/L 甲酸铵溶液 (pH=3.0) 作为流动相 A; 甲醇作为流动相 B, A:B=95:5(V/V) 等度洗脱; 检测波长: 220 nm; 柱温: 40 ℃; 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 10 μL。

3 结果与讨论

3.1 红外光谱图

图 2 显示为立体结构填料和裸硅胶填料的红外光谱对比图, 该立体结构色谱填料的红外谱图在 2852 cm⁻¹ 处显示-CH-的不对称伸缩振动峰, 在 2908 cm⁻¹ 处显示-CH-的对称伸缩振动峰, 可以表明金刚烷成功键合到硅胶填料上。

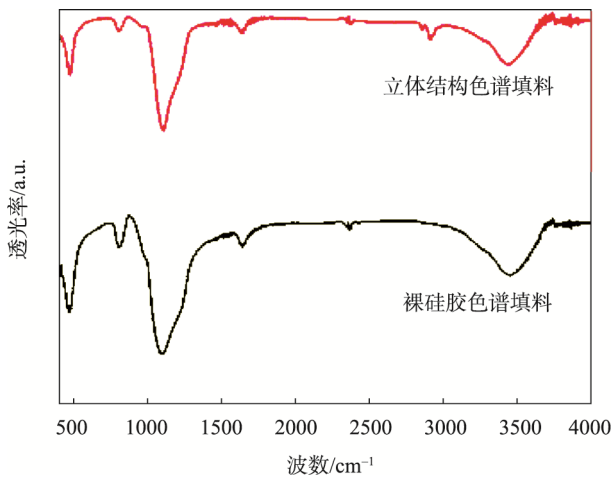


图 2 红外光谱对比图
Fig. 2 Infrared spectrum contrast map

3.2 流动相的选择

有机酸为弱酸, 7 种有机酸的 pKa₁ 如表 1 所示, 在水系流动相中易解离, 故采用离子抑制方法, 选择缓冲盐作为流动相。7 种有机酸的 pKa₁ 值均小于 5, 所以需调节流动相为酸性条件。使用紫外检测器时, 可选择的缓冲液有磷酸盐、乙酸盐和甲酸盐, 其 pKa 和缓冲范围(如表 2^[17]所示)。本文选择了与大多数待测有机酸 pKa₁ 值接近的甲酸盐作为流动相缓冲盐, 同时进行了 pH 变化对分离有机酸影响的考察。7 种有机酸中富马酸对 pH 变化反应较为灵敏, 本文选择了不同 pH 的流动相对其进行试验, 实验结果如下: 当调节流动相 pH 为 2.0 时, 富马酸单标无响应, 没有洗脱下来; 当调节流动相的 pH 为 3.0 时, 富马酸单标的保留时间为 7.40 min; 当调节流动相的 pH 分别为 4.0 和 5.0 时, 富马酸单标的保留时间分别为 5.18 和 4.99 min, 拖尾因子分别为 1.3 和 1.5。富马酸的相对保留时间随着 pH 值的增大而减小, 说明该固定相对富马酸的保留随着 pH 增大而减弱, 因为富马酸是一个二元羧酸极性很强, 而反相色谱对极性样品保留较弱, 一般采用高水相的流动相增强保留, 富马酸在流动相中保持电离平衡, 方程式: $H_2A \rightleftharpoons H^+ + HA^-$, $HA^- \rightleftharpoons H^+ + A^{2-}$, 而固定相对离子状态溶质比分子状态溶质保留弱(比如 R-COO⁻ 对比 R-COOH), 随着 pH 增大来, 富马酸的解离增大, 所以保留也随之减弱。同时, 硅羟基与富马酸离子发生相互作用, 从而造成不同程度的峰拖尾, 所以实验中调节流动相 pH 为 4.0 和 5.0 时已有明显峰拖尾。根据 7 种有机酸的 pKa₁ 以及保留能力的考量, 本文选用 pH 为 3.0 的流动相条件。由于高浓度的盐会对泵和色谱柱的寿命产生影响, 最后选用 10 mmol/L 的甲酸铵溶液(用甲酸调 pH=3.0)作为流动相。

3.3 立体结构固定相与 3 款 C₁₈ 固定相的疏水性比较研究

立体结构固定相是在硅胶表面键合了金刚烷基团, 金刚烷是由 10 个碳原子和 16 个氢原子构成的笼状烃, 比较了其直链碳链的表面极性。据文献报道, HPLC 分离有

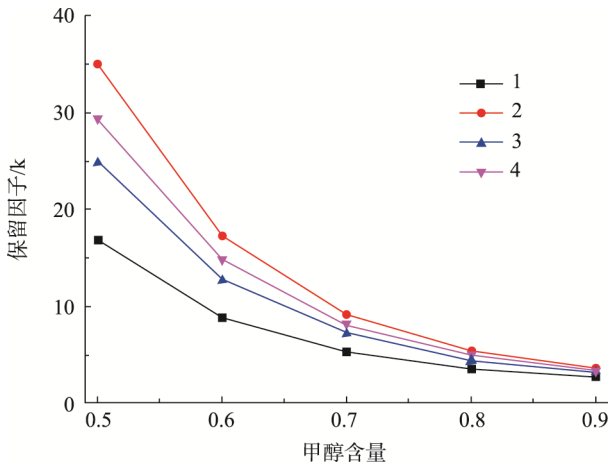
表 1 7 种有机酸的 pKa₁ 值
Table 1 pKa₁ values of seven organic acids

名称	草酸	马来酸	富马酸	酒石酸	柠檬酸	苹果酸	抗坏血酸 Vc
pKa ₁	1.23	1.92	3.02	3.04	3.15	3.46	4.17

表 2 4 种常见缓冲液的 pKa 和近似缓冲范围(25 ℃)
Table 2 pKa and similar buffer range of four common buffers at 25 ℃

缓冲液	一磷酸盐	二磷酸盐	乙酸盐	甲酸盐
pKa(25 ℃)	7.2	12.3	4.8	3.8
近似缓冲范围	6.0~8.5	11.0~13.5	3.5~6.0	2.5~5.0

机酸多采用C₁₈固定相的色谱柱,所以选用市场上常见的3款XB-C₁₈、AQ-C₁₈和LP-C₁₈固定相,它们是市场上不同的载C量十八烷基硅烷固定相。根据甲醇含量变化对非极性化合物甲苯的测试,甲苯的保留因子越大,则疏水作用越强。如图3所示,随着甲醇含量的增加,4款固定相对非极性化合物甲苯的保留因子呈现相同降低趋势,而这正是非极性固定相的特征,说明立体结构固定相和C₁₈固定相在分离非极性样品时主要表现为疏水作用。由图中还可以看出立体结构固定相分析的甲苯的保留因子小于其他3款C₁₈固定相,一方面随着载碳量的增加,疏水作用会增强;另一方面立体结构固定相为10个碳原子的金刚烷,而其他3种C₁₈固定相的官能团都为18个碳原子的碳链,随碳链长的增加,疏水作用增强。



注: 1: 立体结构固定相; 2: XB-C₁₈固定相; 3: AQ-C₁₈固定相; 4: LP-C₁₈固定相)

图3 针对4款固定相甲醇含量对非极性化合物甲苯的测试图

Fig. 3 Test diagram of methanol content of four stationary phases to non-polar compound toluene

3.4 立体结构固定相与3款C₁₈固定相测定七种有机酸的结果比较

文献^[5,6,11-13]中分离有机酸的方法中大多采用C₁₈固定相的色谱柱,使用磷酸盐作为缓冲盐,流速采用小于1.0 mL/min的低流速可以提高分离效率,而在结果与讨论2中已经说明甲酸铵盐缓冲能力、范围较其磷酸盐更适合分离有机酸,流速本方法采用1.0 mL/min,在保证分离度的前提下,大大缩短了分离时间。4种不同类型色谱柱测定7种有机酸单标相对保留时间的对比如表3所示。由表3可以确定本方法下7种有机酸的出峰位置。

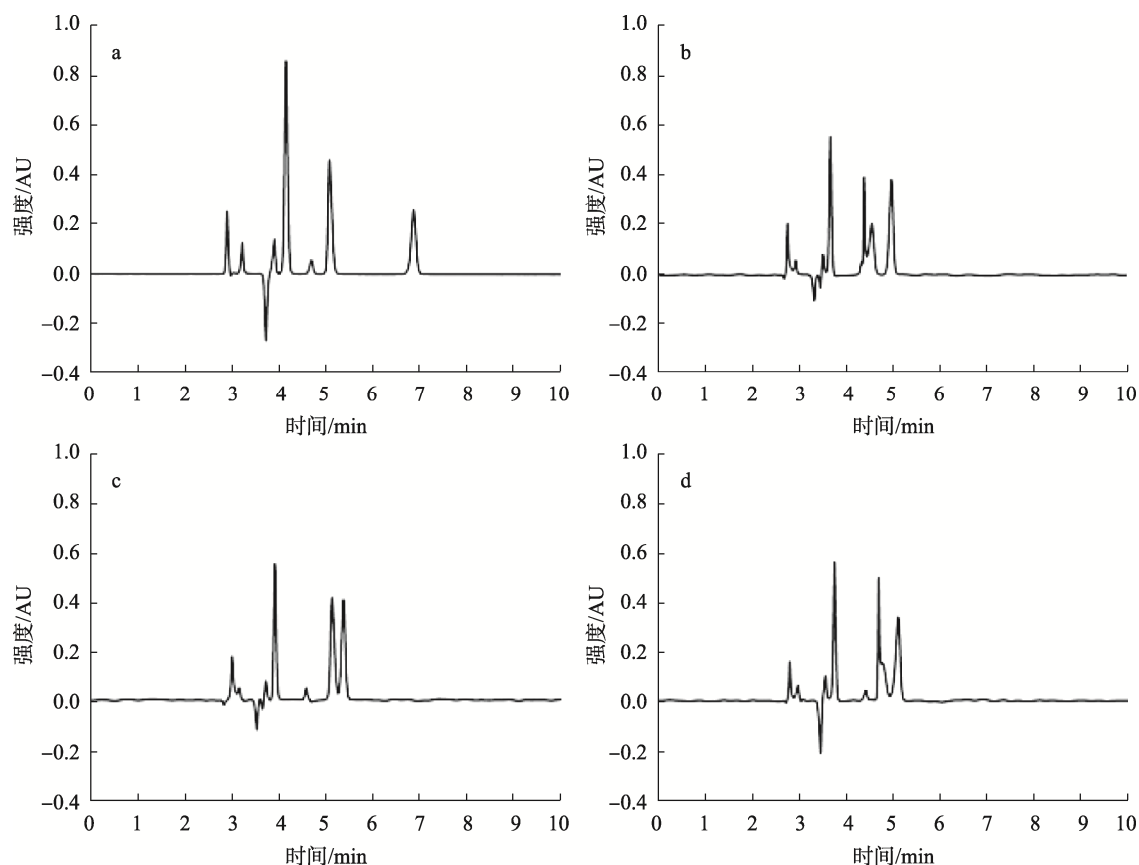
4种不同类型固定相分离7种有机酸的色谱图如图4所示,图4a、b、c、d中7种有机酸出峰顺序一致,表明新型立体结构固定相的选择性与C₁₈固定相一致,其中图4a中7个峰在8 min中达到对基线分离,分离度分别为3.3, 6.1, 2.0, 4.0, 2.6和10.1,这种新型立体结构固定相实现了7种有机酸的有效分离;而同等条件下图4b、c、d中7个峰没有实现基线分离,这3种C₁₈固定相没有实现对7种有机酸有效分离。表明相较于文献中常用的C₁₈固定相分离有机酸的方法,新型立体结构固定相分离7种有机酸有柱效高、分离度高和快速等优点,更适合于构建7种有机酸的快速分离方法。

马来酸和富马酸分别是顺丁烯二酸和反丁烯二酸,互为顺反异构体,同分异构体的分离由于结构的相似是色谱分离的难点,图5中XB-C₁₈固定相分离富马酸和马来酸的分离度为1.3,没有达到基线分离,其余2款C₁₈固定相也没有达到基线分离,而图5中立体结构固定相分离马来酸和富马酸的分离度为8.7,对马来酸和富马酸的分辨能力高于常规C₁₈,这是由于立体结构固定相的官能团为金刚烷,它特有的笼状结构所带来的立体选择性,赋予了立体结构固定相分离结构类似化合物的能力。

表3 4种不同类型固定相测定7种有机酸单标相对保留时间的对比(min)

Table 3 Comparison of relative retention time of seven organic acids determined by four different stationary phases (min)

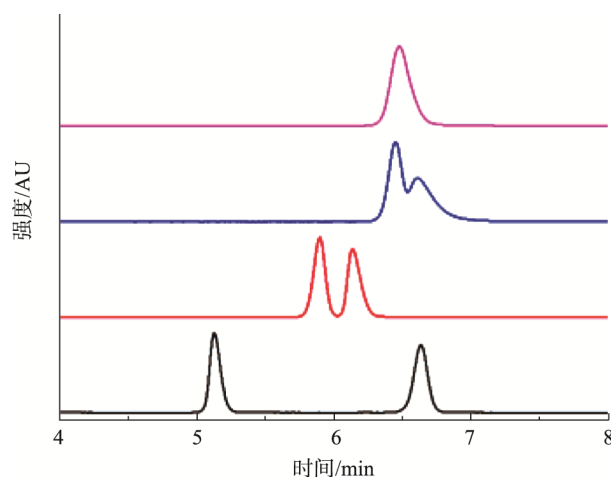
	立体结构色谱柱	XB-C ₁₈	AQ-C ₁₈	LP-C ₁₈
草酸	2.90	2.76	3.01	2.81
酒石酸	3.26	2.94	3.18	2.99
苹果酸	3.89	3.51	3.73	3.60
抗坏血酸 Vc	4.30	3.67	3.91	3.75
柠檬酸	5.00	4.38	4.65	4.43
马来酸	5.37	4.61	5.26	4.90
富马酸	7.40	5.00	5.42	5.13



注: 图中的 1、2、3、4、5、6、7 分别对应草酸、酒石酸、苹果酸、抗坏血酸(Vc)、柠檬酸、马来酸、富马酸, 负峰为溶剂峰;
a: 立体结构固定相; b: XB-C₁₈ 固定相; c: AQ-C₁₈ 固定相; d: LP-C₁₈ 固定相

图 4 4 种不同类型固定相分离 7 种有机酸色谱图

Fig. 4 Chromatograms of seven organic acids separated by four different stationary phases



注: 图中曲线从上往下依次对应 LP-C₁₈、AQ-C₁₈、XB-C₁₈ 和立体结构固定相

图 5 4 种不同类型固定相分离富马酸和马来酸色谱图

Fig. 5 Chromatograms of fumaric acid and maleic acid separated by four different stationary phases

4 结 论

本研究制备了新型立体结构固定相, 一种硅胶表面键合金刚烷基的新型固定相, 具有与常规 C₁₈ 固定相相似的疏水作用, 对于分离马来酸和富马酸等同分异构体具有特殊立体选择性。通过条件优化, 选用更适合分离有机酸的缓冲盐和提高流速, 基于新型立体结构的色谱固定相开发了新的高效液相色谱分离 7 种有机酸的方法, 实现了 7 种有机酸快速、有效的分离, 为多种有机酸的分析分离提供了新的选择。

参考文献

- [1] 杜鹏. 果蔬汁饮料工艺学[M]. 北京: 农业出版社, 1992.
Du P. Technology of fruit and vegetable juices [M]. Beijing: Agriculture Press, 1992.
- [2] 孔祥红, 李建华. 反相高效液相色谱法测定果汁中的有机酸[J]. 理化检验-化学分册, 2004, 40(6): 331-333.
Kong XH, Li JH. Determination of organic acids in fruit juice by RP-HPLC [J]. PTCA (Part B: Chem Anal), 2004, 40(6): 331-333.

- [3] 冯德明, 张洋, 赵惠明, 等. 反相高效液相色谱法测定黄酒中的有机酸[J]. 中国酿造, 2009, 3: 157-161.
Feng DM, Zhang Y, Zhao HM, *et al.* Determination of organic acids in rice wine by RP-HPLC [J]. China Brewing, 2009, 3: 157-161.
- [4] 王燕, 王方, 张岱, 等. 葡萄酒有机酸的 HPLC 分析中色谱条件的优化[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2010(9): 34-37.
Wang Y, Wang F, Zhang D, *et al.* Chromatographic optimization in HPLC analysis of wine organic acids [J]. Sino-Overseas Grapevine Wine, 2010(9): 34-37.
- [5] 薛霞, 霍艳敏, 王骏, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定果醋中 7 种有机酸[J]. 食品科学, 2012(14): 247-250.
Xue X, Huo YM, Wang J, *et al.* Determination of seven organic acids in fruit vinegar by solid-phase extraction high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2012(14): 247-250.
- [6] 高海燕, 廖小军, 王善广, 等. 反相高效液相色谱法测定果汁中 11 种有机酸条件的优化[J]. 分析化学, 2004, 12(32): 1645-1648.
Gao HY, Liao XJ, Wang SQ, *et al.* Simultaneous determination of eleven organic acids in fruits juice by RP-HPLC [J]. Chin J Anal Chem, 2004, 12(32): 1645-1648.
- [7] 崔雨林, 戴蕴青, 韩雅珊. 高效液相色谱法测定水果及其果汁中的几种有机酸[J]. 北京农业大学学报, 1995, 1(21): 39-43.
Cui YL, Dai YQ, Han YS. Studies on organic acids in fruits and juices by HPLC [J]. Acta Agric Univ Pekinensis, 1995, 1(21): 39-43.
- [8] 蒋次清, 胡守毅, 李忠, 等. 微波辅助衍生化-气相色谱法测定烟草中非挥发性有机酸[J]. 理化检验(化学分册), 2011, 47(4): 392-394.
Jiang CQ, Hu SY, Li Z, *et al.* GC determination of non-volatile organic acids in tobacco with microwave assisted derivatization [J]. PTCA (Part B: Chem Anal), 2011, 47(4): 392-394.
- [9] 程劲松, 胡国栋. 填充柱气相色谱法直接进样分析白酒中的乳酸和脂肪酸含量[J]. 酿酒科技, 2002(2): 77-78.
Cheng JS, Hu GD. Determination of lactic acid and fatty acid in liquor by direct injection with packed column GC [J]. Liquor-Making Sci Technol, 2002(2): 77-78.
- [10] 邓锦霞, 曾祖训. 白酒中有机酸的简易快速气相色谱分析法[J]. 酿酒科技, 1997(3): 70-73.
Deng JX, Zeng ZX. Determination of organic acids in liquor by simple and rapid GC [J]. Liquor-Making Sci Technol, 1997(3): 70-73.
- [11] 徐玉涛, 李珂珂, 王贺新, 等. 高效液相色谱法对蓝莓果实中 8 种有机酸的含量的测定[J]. 食品科学, 2015, 36(18): 127-131.
Xu YT, Li KK, Wang HX, *et al.* Determination of eight organic acids in blueberries by HPLC [J]. Food Sci, 2015, 36(18): 127-131.
- [12] 田辉, 孙懿琳, 周元良, 等. 高效液相色谱法测定酸奶中四种有机酸[J]. 食品与机械, 2012, 28(5): 87-90.
Tian H, Sun YL, Zhou YL, *et al.* Determination of 4 organic acids in yogurt by HPLC [J]. Food Mach, 2012, 28(5): 87-90.
- [13] 赵艳, 张凤桦, 杨发树, 等. 高效液相色谱法同时测定饲料添加剂中 6 种有机酸含量[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(2): 127-130.
Zhao Y, Zhang FP, Yang FS, *et al.* Simultaneous determination of six kinds of organic acids in feed additives by HPLC [J]. J Chin Cereals Oils Ass, 2015, 30(2): 127-130.
- [14] 李袁飞, 孙美洲, 成艳芬, 等. 高效液相色谱法测定瘤胃甲烷菌共存对厌氧真菌代谢葡萄糖产有机酸特性的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(4): 1-5.
Li YF, Sun MZ, Cheng YF, *et al.* Effects of associated methanogen on organic acid profile of glucose metabolism by anaerobic fungus revealed using HPLC [J]. Chin J Anim Nutr, 2017, 29(4): 1-5.
- [15] 刘卅, 郭建维. 金刚烷的结构、溶解性及热力学性质[J]. 含能材料, 2006, 14(6): 485-489.
Liu S, Guo JW. Structure analysis, solubility and thermodynamics properties of adamantane [J]. Chin J Energ Mater, 2006, 14(6): 485-489.
- [16] 王永杰. 金刚烷-新一代化工原料[J]. 价值工程, 2010, 29(25): 128-129.
Wang YJ. Adamantane: A new generation of chemical raw material [J]. Value Eng, 2010, 29(25): 128-129.
- [17] 陈小明, 唐雅妍. 现代液相色谱技术导论(第 3 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
Chen XM, Tang YJ translation. Introduction to modern liquid chromatography [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介



张 传, 硕士, 主要研究方向为药物分析和食品安全检测。

E-mail: 15033318932@163.com



赵岳星, 教授级高级工程师, 主要研究方向为药物分析和食品安全检测。

E-mail: eugenezhao@zjnu.cn