

食品中有机酸的高效液相色谱分析法*

丁明玉 陈培榕 罗国安*

(清华大学化学系 北京 100084)

提 要 对离子交换色谱法、离子排斥色谱法和反相高效液相色谱法分析食品中有机酸的特色和近几年的研究与应用状况作一综述。

关键词 高效液相色谱法, 离子色谱法, 有机酸, 食品分析

分类号 O658/T S2

1 前言

本文所指有机酸是在水溶液中能部分水解且广泛存在于食品中的低分子羧酸。食品中的主要有机酸有乙酸、乳酸、丁二酸、柠檬酸、酒石酸、苹果酸等,少量存在的有机酸还有甲酸、顺丁烯二酸、马来酸、草酸等。这些有机酸是食品酸味的主要来源。食品中有机酸的种类、含量与构成对食品的味道有很大影响。酿造食品发酵过程中有机酸含量的变化是评价发酵工艺的重要指标。因此,有机酸的定性与定量分析不仅对食品营养学研究意义重大,而且在食品生产过程的质量管理中也不可少。

目前,用于有机酸分析的方法很多。滴定法一般只用于食品中总酸度的测定^[1]。比色法^[2]、荧光法^[3]、薄层色谱法^[4]、气相色谱法^[5,6]、分光法^[7]、酶法^[8,9]等方法虽说仍用于有机酸的分析,但这些方法一般要进行预分离、衍生化等繁琐的前处理,而且能达到同时分离的有机酸种类较少。因此,这些方法往往只适用于某些特殊样品或不常见有机酸的分析。毛细管电泳(CE)和高效液相色谱法(HPLC)是近年来发展较快并有前途的分析方法。不过,食品中的有机酸的CE分析法研究还较少^[10-12],远不如HPLC成熟。HPLC分析有机酸不仅简便快速,而且选择性好、准确度高。HPLC的分离模式与检测方法多种多样,可以根据样品的构成与性质来选择合适的色谱条件(色谱柱、淋洗液、检测器等)。根据分离机理,有机酸的HPLC可以分成离子色谱(IC)、反相高效液相色谱(RP-HPLC)和凝胶渗透色谱(GPC)三大类。由于GPC分离模式局限性较大,研究与应用开发很少,本文将不作评述。离子色谱又可以按分离机理进一步分为离子交换色谱(IEC)和离子排斥色谱(ICE)两种基本分离模式。尽管IC作为一门相对独立的分析学科从液相色谱中分离出来已有近

20年的历史,但从本质上讲仍可以归类于液相色谱。本文将就有机酸的IEC、ICE和RP-HPLC的特征和近几年的研究与应用状况作一简要评述。

2 有机酸的离子交换色谱法

有机酸的IEC利用了有机酸在水溶液中的可离解性。有机酸在水溶液中部分水解成羧酸根阴离子和氢离子。羧酸根阴离子在阴离子交换柱中与固定相的阴离子交换基团相交换而被保留。各种有机酸因离解度、荷电性、亲水性等的差异而得到分离。一般来说,容易离解的有机酸在阴离子交换柱中的保留值(容量因子)大。

用于无机阴离子分离的阴离子交换柱一般都可以用来分离有机酸。近年开发出的几种高性能的低交换容量阴离子交换柱不仅改善了无机阴离子的分离,同时也使多种有机酸的相互分离得以实现。日本横河电机(Yokogawa systems)的化学结合型阴离子交换柱SAM3-075^[13]、日本的TSKgel IC Anion-PW^[14]和Shim-pack IC-A1阴离子交换柱^[15]都可用于食品中主要有机酸的同时分离。分析无机阴离子时经常使用的碳酸盐或氢氧化钠淋洗液有时仍被用作有机酸分离的淋洗液^[16-18],但这类淋洗液用于多种有机酸的同时分离时效果不理想,而且这类强电解质淋洗液本身电导很高。为了降低本底电导以提高检测灵敏度,就必须采用抑制型电导检测。近年来,低电导淋洗液的非抑制型离子交换色谱法的使用逐渐增多,这类淋洗液多为有机羧酸及其盐,如邻苯二甲酸钾^[13-15]就是较好的实例。它们本身电导很低,虽说接上抑制器会将背景电导降得更低,但抑制器的使用将使有机酸的离子化程度降低,结果是检测灵敏度往往反而降低。我们曾研究了温度对低电导有机羧酸盐作淋洗液时有机酸阴离子和无机阴

* 本工作得到“留学回国人员科研资助费”和“博士后科学基金”的资助

** 通讯联系人

本文收稿日期:1996-01-10, 修回日期:1996-02-25

离子在阴离子交换柱中的保留行为和规律的影响^[19], 并就有机羧酸及其盐作淋洗液的 IEC 体系比较了使用与不使用抑制器时电导检测的灵敏度和峰的正负变化规律^[20]。

过去, 用阴离子交换色谱柱分离有机酸的最大难题就是共存无机阴离子的干扰, 目前, 这个问题已基本解决。这是离子交换色谱近几年来较有成效的进展。这主要得益于一些高性能的离子交换柱的开发。于泓等^[15]用阴离子交换柱 Shim-pak IC-A1 分离了 6 种常见的无机阴离子和 4 种有机酸(甲酸、乙酸、乳酸和酒石酸)并用于酒的分析。但酒中常见的苹果酸、柠檬酸和丁二酸不能同时分析。Ludwig 等^[21]用包覆型强碱性阴离子交换树脂(BPA-1000)、Walker 等^[22]用低交换容量柱 PRP-X100 同时分离了有机酸和无机阴离子。在对分离柱中保留时间有显著差异的成分进行同时分离时, 往往采用梯度淋洗法。但淋洗液浓度或组成改变时, 背景电导(基线)会改变。绵谷等^[23]运用差色谱法解决了梯度淋洗法分离有机酸和无机阴离子时的基线变化问题, 即把空白试样和实际试样的色谱图储存在数据处理器(电脑)里, 输出的是经过差运算后的色谱图。在阴离子交换柱中, 有机酸和无机阴离子同时被分离的报道不算太少^[13, 15, 16], 但大多没把食品中主要的有机酸和无机阴离子都同时包括进去。我们^[24]曾用低电导淋洗液的非抑制型离子交换色谱法成功地实现了食品中 9 种主要有有机酸和 6 种常见无机阴离子的同时分离, 并用于葡萄酒、果汁等的分析。另外, 我们还将阴、阳离子交换柱以几种不同的方式联接起来^[25, 26]或用阴、阳离子交换树脂的混合床柱^[27]实现了有机酸、部分常见无机阴离子和阳离子的同时分离定量。朱岩等^[16]还用 IEC 柱同时分离了有机酸和糖精。

IEC 法分析有机酸一般采用电导检测, 检测下限可达 10^{-10} mol。也有采用直接紫外吸光(UV)或间接 UV 检测的^[21, 22]。

3 有机酸的离子排斥色谱法

在 ICE 分离模式中, 有机酸的分离受溶液中的唐南(Donnan)平衡的支配。容易离解的有机酸或极性较强的有机酸在柱中的保留值小, 这与离子交换柱中的情形正好相反。所以, 就整体而言, ICE 模式中有有机酸的流出顺序与 IEC 模式相反。

严晋婴等^[28]对 1990 年以前有机酸的 ICE 分析的进展作了综述, 对 ICE 的分离机理、固定相、淋洗液和检测方法等方面的研究状况都作了较系统的介

绍。1990 年以来的 5 年中, 用于有机酸分离的 ICE 在分离机理、淋洗液和检测方法上没有大的进展, 主要是解决了一些实际样品的分析问题。在固定相方面, 仍以大交换容量的阳离子交换树脂为主导。一些性能较好的 ICE 柱得到应用, 如 Shim-pak SCR-102H^[29, 30]和 Aminex HPX-87H^[31-34]。而且还有专门用于有机酸分离的 ICE 柱问世并得到应用, 如日本研制的 TSK gel OApak-A 柱^[14]和美国的 Ion-300 柱^[35, 36], 淋洗液仍多采用稀强酸, 如稀盐酸和稀硫酸。电导检测与 ICE 分离模式配合使用的实例比以前有所减少, UV 检测有所增加。UV 检测下限可达 10^{-10} mol。含共轭双键的有机酸(如马来酸和丁烯二酸), 由于其分子具有相当强的紫外吸收能力, 检测下限可达 10^{-13} mol^[14]。由于 ICE 模式一般使用酸性淋洗液, 有机酸的离解受到限制, 所以当采用电导检测时, 灵敏度一般不如 UV 检测法高。不过, 也有电导检测下限达 10^{-12} mol 的高灵敏度体系^[29]。在分析个别有机酸或进行有机酸与其它类型组分的同时分析时, 为了提高灵敏度或选择性也采用其它检测法。如强离子交换柱 Fast Acid 用于甲酸等有机酸的分离时, 为了弥补 UV 检测器选择性差的缺陷, 在进行分离之后用醋酸铵将有机酸离子化, 然后用质谱法(MS)进行检测^[37]。在用 ICE 柱进行有机酸与糖和醇等有机物的同时分离分析时, 采用折射率检测的例子较多^[32, 34-36, 38]。Backer 等^[39]在用电位法检测有机酸时, 比较了 4 种液膜电极的灵敏度、选择性、响应时间等性能, 并把电位法与电导检测和 UV 检测进行了比较, 结果表明电位检测的灵敏度比电导检测和 UV 检测的要高。

疏水性无机阴离子也比较适合用 ICE 柱进行分离。由于有机酸和疏水性无机阴离子性质相差较远, 目前尚未开发出适于有机酸和无机阴离子同时分离的 ICE 柱。

4 有机酸的反相高效液相色谱法

RP-HPLC 一般使用弱极性 ODS 固定相和极性比 ODS 固定相要强的流动相。RP-HPLC 是目前应用最广泛的液相色谱法, 已用于各种有机化合物的分离, 在食品、医药、生物分析等领域中扮演着重要角色。根据分离过程中有机酸的主要存在状态, 又可将有机酸的 RP-HPLC 再细分为直接 RP-HPLC、离子对 RP-HPLC 和衍生化 RP-HPLC。

直接 RP-HPLC 即通常所说的反相高效液相色谱法。在该分离模式中, 有机酸分子直接在两相中分配, 各种有机酸因分配系数不同而被分离。

Spherisorb ODS-2 是近年应用得最多的反相色谱柱之一^[40-43], 此柱柱效高, 固定相中溶质转移快, 可以使用有机溶剂来改善分离。Zorbax ODS 也是近年应用得较多的反相色谱柱^[44, 45], 该柱也有较高的柱效, 可在几分钟内分离食品中的常见有机酸。

为了使有机酸尽可能地以分子形式存在, 一般使用酸性流动相来抑制有机酸的离解。磷酸氢盐仍是最典型的淋洗液^[41, 44, 46-48]。有时为了改善有机酸的分离或减少吸附(改善峰形状), 在流动相中加入了适量的有机溶剂, 如甲醇^[40, 45]。

在 RP-HPLC 分离模式中, 有机酸是以分子形式被分离的。如果使用的是酸性淋洗液, 有机酸在检测器中几乎不离解, 因此在 IEC 和 ICE 分离模式中最常使用的电导检测器在 RP-HPLC 中几乎不用。RP-HPLC 中通用的是 UV 检测。此外, 作为改善选择性或提高灵敏度的手段, 电化学检测^[49, 50]和多波长分光检测^[51]等也常被采用。

用 RP-HPLC 分析食品中有机酸时, 最常遇到的问题就是来自食品中其它有机物质的干扰。为了解决这个难题, 人们已开始探讨用 RP-HPLC 同时分离有机酸和其它有机化合物, 这是近几年 RP-HPLC 分析有机酸的研究领域的一个特征, 例如, 有机酸和酚类^[50], 有机酸、氨基酸和糖^[49], 有机酸和糖精^[45]的同时分离。随着 ODS 柱的研究开发, 今后在有机酸和其它有机物的同时分离方面还将会有进一步的研究和更广泛的应用开发。

离子对 RP-HPLC 是在流动相中加入适当的带正电荷的离子对试剂, 有机酸阴离子与离子对试剂生成离子对化合物后在 ODS 柱上分离。Daood 等^[52]以四丁基氢氧化铵作离子对试剂, 用 Spherisorb ODS-2 柱分离了果汁和蔬菜中的有机酸和维生素。由于有机酸阴离子不像无机阴离子那样容易与离子对试剂结合生成离子对化合物, 因此应用受到限制。

衍生化 RP-HPLC 是将有机酸与 UV 吸收很强或具有荧光的衍生化试剂反应生成有机酸衍生物后用 ODS 柱分离。如关家锐等^[53]用 α -溴苯乙酮作衍生化试剂, 以 18-冠-6 作相转移催化剂, 将葡萄酒中的有机酸酯化后进行 RP-HPLC 分离。由于衍生化操作麻烦, 一般也不采用。Saari-Nordhaus 等^[54]用 ODS 树脂和阴离子交换树脂的混合床柱进行了有机酸与无机阴离子的同时分离。像这种用混合床柱同时分析两类性质差异很大的物质的方法在其它分析领域也有报道。

5 结论

IEC、ICE 和 RP-HPLC 三种色谱分离模式构成了有机酸分析的主流。如何选择合适的分离模式和检测方法, 不能单从有机酸标准混合物的分离情况和灵敏度来判断, 应更侧重于实际样品的构成。欲分析有机酸的样品大多是食品, 而食品中有机化合物种类繁多(如蛋白质、糖、醇类等), 含量丰富, 这些有机物往往容易吸附在 ICE 柱和 ODS 柱中, 在用 UV 检测的色谱图上经常出现一些干扰峰。我们^[14]曾对以上 3 种模式进行了比较研究, 尽管 ICE 柱和 ODS 柱的分析时间比 IEC 柱短, 柱效比 IEC 柱高, 但从多种葡萄酒的分析结果和色谱图中的干扰情况来看, 只有 IEC 法无干扰, 且分析结果合理。这是因为其它有机化合物在 IEC 柱中不被保留, 且对 CD 检测器无响应。因此, 在多数情况下, 选择 IEC 柱与 CD 检测来分析食品中的有机酸是合适的。

参 考 文 献

- 1 梁俊生. 第十次全国色谱学术报告会文集(中), 南京, 1995: 468
- 2 Kasai Y, Tanimura T, Tamura Z. Anal Chem, 1975; 47: 34
- 3 黄志先, 戴仁泽. 食品发酵工业, 1985; 6: 26
- 4 Cecchi L, Malaspina P. Anal Biochem, 1991; 192: 219
- 5 Gel'fand S Yu, Grin S A, Levinskii M B. Pishch Prom-st, 1990; (6): 60
- 6 Molnar B P, Morvai M. Elelm iszervizsgalati Kozl, 1991; 37(1): 23
- 7 Figenschou D L, Marais J P. Anal Biochem, 1991; 195: 308
- 8 Puchades R, Herrero M A, Maquieira A *et al.* Food Chem, 1991; 42: 167
- 9 Garcia de Maria C, Manzano Munoz T, Alonso Mateos A *et al.* Anal Chim Acta, 1991; 247: 61
- 10 Kenney F B. J Chromatogr, 1991; 546: 423
- 11 Levi V, Wehr T, Talmadge K *et al.* Int Chromatogr Lab, 1993; 15: 4
- 12 Lalljie S P D, Vindevoel J, Sandra P. J Chromatogr, 1993; A 652: 563
- 13 铃木义仁, 丁明玉, 小泉 均等. 分析化学(日文), 1991; 40: T15
- 14 Ding M Y, Suzuki Y, Koizumi H. Anal Sci, 1995; 11: 239
- 15 于 泓, 刘清林, 关良智. 色谱, 1993; 11(2): 109
- 16 朱 岩, 杨更生. 色谱, 1990; 8(1): 43
- 17 朱 岩, 朱利中, 庄向平. 分析化学, 1990; 18(3): 263

- 18 朱 岩, 朱利中. 分析化学, 1990; 18(2): 102
- 19 铃木义仁, 丁明玉, 小泉 均等. 分析化学(日文), 1991; 40: 899
- 20 铃木义仁, 丁明玉, 小泉 均等. 分析化学(日文), 1992; 41: 323
- 21 Ludwig C R. J Chrom atogr, 1992; 592: 101
- 22 Walker T A, Ho T V, Akbari N. J Liq Chrom atogr, 1991; 14: 1351
- 23 绵谷敏彦, 早川和一, 能村京子等. 分析化学(日文), 1994; 43: 817
- 24 丁明玉, 铃木义仁, 小泉 均. 分析化学(日文), 1993; 42: T129
- 25 丁明玉, 铃木义仁, 小泉 均. 分析化学(日文), 1993; 42: 49
- 26 丁明玉, 铃木义仁, 小泉 均. 分析化学(日文), 1993; 42: 343
- 27 Ding M Y, Suzuki Y, Koizumi H. Analyst, 1995; 120: 1773
- 28 严晋婴, 施荫玉. 色谱, 1993; 11(1): 13
- 29 郜志峰, 傅承光. 分析化学, 1994; 22: 1234
- 30 郜志峰, 傅承光. 第十次全国色谱学术报告会文集(下), 南京, 1995: 595
- 31 Glod B K, Haddad P R, Alexander P W. J Chrom atogr, 1992; 589: 209
- 32 Bouzas J, Kantt C A, Bodyfelt F *et al.* J Food Sci, 1991; 56(1): 276
- 33 Tom lins K I, Baker D M, McDowell I J. Chrom atographia, 1990; 29: 557
- 34 Heard J, Talmadge K. Am Lab, 1992; 24(8): 24
- 35 Calcull M, Lopez E, Marce R M *et al.* J Chrom atogr, 1992; 589: 151
- 36 Calcull M, Marce R M, Borrull F. J Chrom atogr, 1992; 590: 215
- 37 Moreira de Campos L M, Becue T, Pradeau D *et al.* Anal Chim Acta, 1991; 254: 33
- 38 Chong R W, Moore B J. J Chrom atogr, 1995; A 692: 203
- 39 de Backer B L, Nagels L J. Anal Chim Acta, 1994; 290: 259
- 40 Marce R M, Calcull M, Olucha J C *et al.* J Chrom atogr, 1991; 542: 277
- 41 Blanco D, Moran M J, Gutierrez M D *et al.* J Liq Chrom atogr, 1991; 14: 2707
- 42 Marce R M. Chrom atographia, 1990; 29: 54
- 43 Romero Rodriguez M A, Vazquez Oderiz M L, Lopez Hernandez J *et al.* J Chrom atogr Sci, 1992; 30: 433
- 44 丁海标, 张声华. 色谱, 1993; 11(3): 174
- 45 杨更生, 朱 岩, 庄向平. 色谱, 1989; 7(5): 318
- 46 陈尚文, 胡 谦. 色谱, 1993; 11(3): 175
- 47 王玉君, 李烈英, 孙永乐等. 色谱, 1991; 9(4): 271
- 48 李金昶, 石 晶. 分析化学, 1993; 21(8): 878
- 49 Moegele R, Pabel B, Galensa R. J Chrom atogr, 1992; 591: 165
- 50 Zhou J, Wang E. Talanta, 1991; 38: 547
- 51 吴风武, 张 平. 色谱, 1992; 10(5): 311
- 52 Daood H G, Biacs P A, Dakar M A *et al.* J Chrom atogr Sci, 1994; 32: 481
- 53 关家锐, 邓从蕊, 王吉顺等. 色谱, 1993; 11(5): 282
- 54 Saar+Nordhaus R, Anderson J M Jr. Anal Chem, 1992; 64: 2283

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Organic Acids in Foods

Ding M ingy, Chen Peirong and Luo Guoan

(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing, 100084)

Abstract Because of the speed, selectivity, reliability, and simple sample preparation high performance liquid chromatography (HPLC) is the preferred method for simultaneous separation and determination of organic acids in foods. Ion exchange chromatography, ion exclusion chromatography and reversed phase HPLC are the most common chromatographic modes for analysis of organic acids in foods. The development and application of the three chromatographic modes are reviewed with 54 references. Ion exchange chromatography is most satisfactory for analysis of organic acids in foods, because organic acids are not interfered by other organic compounds, and inorganic anions in foods are determined simultaneously with organic acids.

Key words high performance liquid chromatography, ion chromatography, organic acids, food analysis