

柑橘皮渣发酵-青贮饲料中有机酸的 RP-HPLC 测定

雷星¹, 彭荣¹, 杜若愚^{1,2}, 殷钟意², 彭娅¹, 王松林¹, 郑旭煦^{1,2}

(1. 重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400067)

(2. 重庆工商大学催化与功能有机分子重庆市重点实验室, 重庆 400067)

摘要: 提出了一种利用反相高效液相色谱法同时测定柑橘皮渣发酵-青贮饲料中的6种有机酸的方法。水浴加热萃取法提取样品中的有机酸, 采用 Welch Materials XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 检测波长为214 nm, 流动相为0.05 mol/L 磷酸二氢钾(pH 2.70)和甲醇(体积比为97:3), 流速为0.80 mL/min, 柱温为20 °C, 进样量为20 μL。在此条件下, 6种有机酸在20 min 内分离良好, 各有机酸的回收率在94.96~103.43%, 6种有机酸在各自线性范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.99, 相对标准偏差都小于3%, 最低检出限在0.53~2.51 mg/L 范围。应用本方法测出的样品中草酸、甲酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、丙酸含量分别为: 0.84、3.69、51.13、20.61、1.76、1.06 mg/g。该方法具有样品处理简单、分析时间短、回收率好、精密度高、相对标准偏差低等优点, 可用于柑橘皮渣发酵-青贮饲料中有机酸的检测。

关键词: 反相高效液相色谱; 有机酸; 柑橘皮渣; 发酵; 青贮; 饲料

文章编号: 1673-9078(2013)10-2542-2546

Determination of Organic Acids in Fermentation-silage of Citrus Peel Wastes by RP-HPLC

LEI Xing¹, PENG Rong¹, DU Ruo-yu^{1,2}, YIN Zhong-yi², PENG Ya¹, WANG Song-lin¹, ZHENG Xu-xu^{1,2}

(1. Environmental and Biological Engineering Institute, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China) (2. Chongqing Key Lab of Catalysis & Functional Organic Molecules, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to detect six different organic acids from fermentation-silage of citrus peel wastes. The organic acids were extracted by heated water from samples. The wastes were analyzed by RP-HPLC on an applied Welch Materials XB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 214 nm using the mixture of 0.05 mol/L monopotassium phosphate (pH 2.70) and methanol (97:3, V/V) as mobile phase at a flow rate of 0.80 mL/min. The injection load was 20 μL and the column temperature was 20 °C. Under these conditions, the six organic acids had a good separation within 20 minutes and the recovery rates ranged from 94.96% to 103.43%. Each organic acid presented a good linear relationship between concentrations and chromatographic peak area with the correlation coefficient higher than 0.99 ($R^2 > 0.99$) and relative standard deviation less than 3% (RSD < 3%). The lowest detection limit was between 0.53 to 2.51 mg/L. Consequently, the determined concentrations of six organic acids (oxalic acid, formic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid and propionic acid) were 0.84, 3.69, 51.13, 20.61, 1.76 and 1.06 mg/g respectively. In conclusion, RP-HPLC was a convenient, rapid and accurate method for analysis of organic acids in fermentation-silage of citrus peel wastes.

Key words: RP-HPLC; organic acid; citrus peel wastes; fermentation; silage; forage

柑橘皮渣是柑橘在食用或食品加工过程中产生的废弃物。目前, 全国每年产生的柑橘皮渣在 1000 万 t 以上^[1], 对柑橘皮渣的处理已经成为食品加工企业的重大难题。柑橘皮渣含水量很高, 极易腐烂变臭, 若不加以利用, 既对环境造成极大的污染, 又浪费资

收稿日期: 2013-06-18

基金项目: 重庆市高校优秀成果转化资助重点项目 (KJZH11212)

通讯作者: 郑旭煦 (1964-), 女, 博士, 教授, 主要从事生物资源与天然药物研究

源。目前, 国内外对柑橘皮渣的利用主要集中在生产肥料、提取有效成分和生产饲料等几个方面^[1], 柑橘皮渣转化为肥料的应用效果和经济利益不甚明显; 提取有效成分的前期投入高, 限制了其在工业上的大量生产。利用柑橘皮渣生产饲料, 不仅可以短时间处理大量废弃物, 而且还有利于柑橘产业和畜牧业的可持续发展。

柑橘皮渣发酵-青贮饲料是以柑橘皮渣为原料, 接种一定比例的菌种在特定条件下先好氧发酵后厌氧青

贮而成的饲料。该饲料减少了微生物发酵法后期烘干的巨大能耗,提高了传统青贮法饲料的品质。它适宜作为牛、羊等反刍动物饲料,在单胃动物的免疫和营养方面也极具开发利用价值。柑橘皮渣发酵-青贮过程中,饲料中的营养物质在微生物以及植物酶的作用下,部分物质转化为有机酸(如乳酸、乙酸等),皮渣的pH降低,抑制有害微生物生长。有机酸增加了柑橘皮渣的风味,同时有机酸的含量还可以间接反映出微生物的代谢情况和青贮饲料质量的好坏。

有机酸的测定方法有离子色谱法^[2]、毛细管电泳法^[3]、气相色谱法^[4]等。离子色谱法一般要用稀强酸做淋洗液,对仪器会造成一定的腐蚀;毛细管电泳法分离度较高,但重复性不好,精密度不高,所测的有机酸含量不准确;气相色谱法需要对难挥发的有机酸进行衍生化处理,步骤繁冗。高效液相色谱法^[5-7]是目前普遍采用的测定有机酸的方法,该方法简单、快捷、精密度高,克服了以上方法的不足。尽管国内外对于有机酸含量的测定方法研究较多,但关于柑橘皮渣发酵-青贮饲料中有机酸组分及含量测定的研究报道很少。本实验研究高效液相色谱法同时测定柑橘皮渣发酵-青贮饲料中6种有机酸的方法,以期对柑橘皮渣发酵-青贮饲料中有机酸组分及含量测定提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

柑橘皮渣,采自重庆派森百橙汁有限公司。

米曲霉、黑曲霉、扣囊复膜孢酵母、植物性乳酸菌,重庆工商大学药物化学与化学生物学研究中心。

1.2 试剂

草酸、甲酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、丙酸(以上均为色谱纯),阿拉丁试剂(中国)有限公司;磷酸、磷酸二氢钾(以上均为分析纯),成都市科龙化工试剂厂;甲醇(色谱纯),美国TEDIA天地试剂公司。

1.3 仪器

1260型高效液相色谱仪,Agilent Technologies(美国);XB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),美国月旭Welch公司;AT-330色谱柱恒温箱,天津奥特塞恩斯仪器有限公司;PHS-3C⁺酸度计,成都世纪方舟科技有限公司;milli-Q超纯水系统,美国milli pore公司;台式冷冻高速离心机,美国KENDRO公司。

1.4 试验方法

1.4.1 标准溶液制备

依次准确称取草酸、甲酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、丙酸,5 mg、10 mg、100 mg、50 mg、10 mg、50 mg,然后用超纯水定容至10 mL,作为储备液(其中草酸0.5 g/L,甲酸1 g/L,乳酸10 g/L,乙酸5 g/L,柠檬酸1 g/L,丙酸5 g/L)。吸取1 mL储备液,依次做两倍稀释到10个梯度,经0.45 μm滤膜过滤,备用。

1.4.2 柑橘皮渣发酵-青贮饲料生产

采50吨新鲜柑橘皮渣,按课题组前期试验研究的接种比例^[8]接种混合菌种(米曲霉、黑曲霉、扣囊复膜孢酵母),自然温度下好氧发酵3天,向发酵后的柑橘皮渣中添加特定比例^[8]的植物性乳酸菌于青贮池中厌氧青贮。

1.4.3 样品前处理

按GB/T14699.1采发酵-青贮3个月的柑橘皮渣,称取剪碎混匀的样品15 g置于研钵中,研磨成匀浆,准确称取已研磨混匀的样品5.0 g,加入超纯水60 mL,75 °C水浴中提取20 min,过滤后取滤液离心(20000 r/min, 20 min),上清液过滤到100 mL的容量瓶中^[9-10],残渣加入20 mL超纯水继续提取,再次过滤到100 mL容量瓶中,用超纯水定容至刻度,经0.45 μm滤膜过滤,备用。

1.4.4 色谱条件

色谱柱:Welch Materials XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);检测波长:214 nm;流动相:0.05 mol/L磷酸二氢钾(pH 2.70)和甲醇(体积比为97:3);流速:0.80 mL/min;柱温:20 °C;进样量:20 μL。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 检测波长的确定

一元有机酸因羧基中碳基氧和羟基氧上孤对电子的共轭作用,使其在205~215 nm处有吸收带,二元酸及多元酸中,除乙二酸HOOC-COOH中两个羧基的共轭效应使其最大吸收有较大的红移外,其他酸的吸收也在210 nm附近^[10]。同时本实验中用来作为流动相的磷酸二氢钾在210 nm附近几乎没有吸收^[11]。所以,本实验选择检测波长为214 nm。

2.1.2 色谱柱的确定

对于有机酸的分离,目前国内较多使用键合十八烷基填料(C₁₈)色谱柱^[12],因此实验选用Welch

Materials XB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)进行标准品和样品的测定。结果表明, Welch Materials XB-C₁₈色谱柱在优化条件下, 可将6种有机酸完全分离。所以, 本实验采用该色谱柱。

2.1.3 流动相的种类

磷酸盐-磷酸体系是反相高效液相色谱法测定有机酸常用的缓冲盐, 常用的磷酸盐有 KH₂PO₄、NH₄H₂PO₄和 NaH₂PO₄, 由于在紫外区 KH₂PO₄本身的吸收值要比 NH₄H₂PO₄低, 几乎没有吸收^[11], 因此, 实验中用作流动相的缓冲盐选定为 KH₂PO₄。

2.1.4 流动相的浓度

以6种有机酸的保留时间为纵坐标^[10], KH₂PO₄浓度为横坐标, 实验考察了0.005、0.01、0.05、0.1、0.2 mol/L 的 KH₂PO₄溶液作流动相时对有机酸标准溶液分离结果(见图1)。

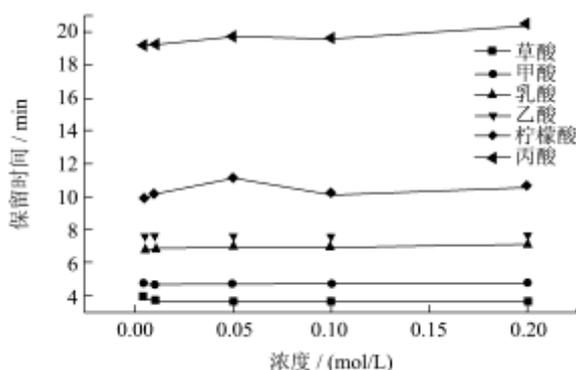


图1 KH₂PO₄浓度对保留时间的影响

Fig.1 Effects of monopotassium phosphate (KH₂PO₄) concentrations on retention time

由图1可知, 当 KH₂PO₄浓度为0.005 mol/L 时, 各有机酸分离效果不是很好; 当 KH₂PO₄浓度为0.01 mol/L 时, 柠檬酸的分离度比较差; 由于较高浓度的磷酸盐会对泵和色谱柱的使用寿命产生一定影响, 所以本实验选用0.05 mol/L 的 KH₂PO₄溶液作为流动相。

2.1.5 流动相的 pH 值

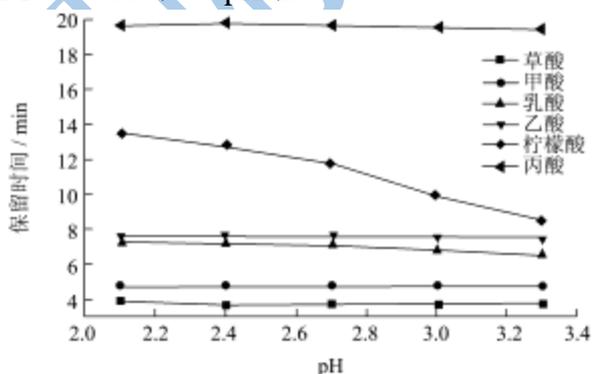


图2 pH 对保留时间的影响

Fig.2 Effects of pH on retention time

有机酸是弱酸, 流动相中水的比例很高, 在流动相中会发生解离, $RCOOH \rightleftharpoons RCOO^- + H^+$, 形成分子态和离子态两种形式。pH 为~3时, 解离反应受到抑制, 有机酸解离向逆反应方向进行。用20%磷酸调节 KH₂PO₄缓冲溶液的 pH 值分别为2.1、2.4、2.7、3.0、3.3, 研究不同 pH 值对分离效果的影响(见图2)。

由图2可知, 随着 pH 的增加, 柠檬酸、乙酸的出峰时间逐渐靠拢; 当 pH 在2.1到3.0范围内, 各种有机酸都能得到较好的分离。由于 pH 太低将对色谱柱的使用寿命产生不利影响, 所以本实验选择流动相 pH 为2.70。

2.1.6 流动相中甲醇的添加量

向流动相中添加微量的甲醇, 可以较好的改善峰形。以0.05 mol/L 的磷酸二氢钾 (pH2.7) 溶液作流动相, 研究不同甲醇含量(体积比0、3%、6%、9%、12%) 对色谱分离效果的影响, 详见图3。

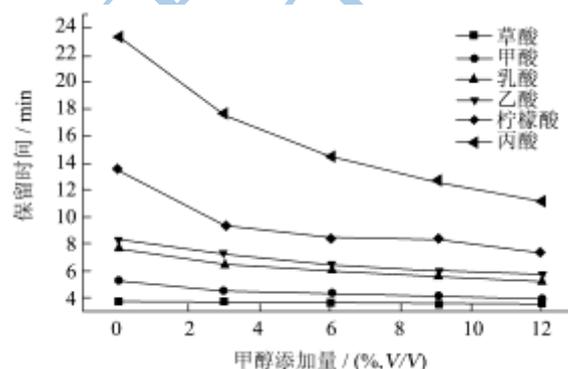


图3 甲醇添加量对保留时间的影响

Fig.3 Effects of methanol dosages on retention time

由图3可知, 随着甲醇添加量的不断增加, 各有机酸的出峰时间逐渐提前, 当甲醇添加量体积比为9%和12%时, 乳酸和乙酸不能很好的分离, 但是如果添加甲醇, 各峰的拖尾较大, 出峰时间太长, 峰的对称性不好。故选择在流动相中添加体积比为3%的甲醇。

2.1.7 流动相的流速

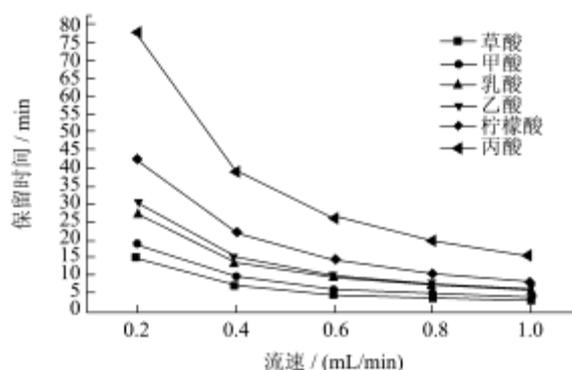


图4 流速对保留时间的影响

Fig.4 Effects of flow rate on retention time

实验考察了流动相的流速为0.2、0.4、0.6、0.8、

1.0 mL/min 时, 分别对各种有机酸的分离效果的影响, 详见图4。

由图4可知, 流速越大, 各有机酸的保留时间越短。但是流速越大, 柱压越高, 不利于色谱柱的保护和长期使用。综合考虑流速对色谱柱压力和保留时间的影响, 选择流速为0.80 mL/min。

2.1.8 色谱柱的温度

色谱柱温度也会对有机酸分离效果产生一定的影响, 实验考察了色谱柱温度分别为15、20、25、30、35、40 °C 时对各有机酸分离效果的影响, 详见图5。

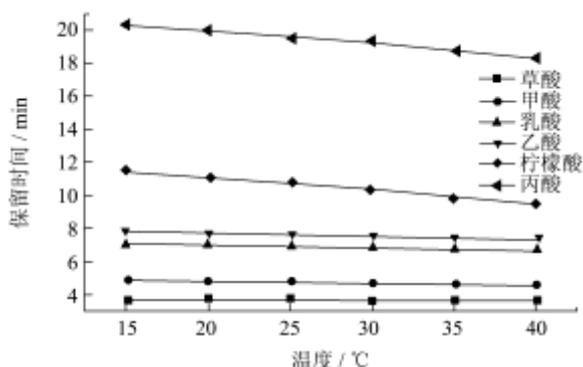


图5 柱温对保留时间的影响

Fig.5 Effects of column temperatures on retention time

由图5可知, 色谱柱温度升高, 对草酸、甲酸、乳酸、乙酸的出峰时间影响较小, 柠檬酸和丙酸的保留时间降低, 综合考虑选择色谱柱温度为20 °C, 分离效果较好。

综合上述考察结果, 确定本实验的色谱条件: 色谱柱为 Welch Materials XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 检测波长为214 nm, 流动相为0.05 mol/L 磷酸二氢钾 (pH 2.70) 和甲醇 (体积比为97:3), 流速为0.80 mL/min, 柱温为20 °C。

2.2 标准曲线的线性回归分析

表1 回归方程、相关系数及检测限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients and detection limits of six organic acids

有机酸	回归方程	线性范围/(mg/L)	相关系数 R ²	检测限/(mg/L)
草酸	Y=41.48+11.43X	7.81~250	0.99	2.31
甲酸	Y=15.35+1.16X	15.63~500	0.99	1.84
乳酸	Y=1.58+0.57X	78.13~5000	0.99	1.02
乙酸	Y=1.14+0.67X	39.06~2500	0.99	0.72
柠檬酸	Y=3.05+1.41X	15.63~500	0.99	2.51
丙酸	Y=1.47+0.70X	39.06~2500	0.99	0.53

将 1.4.1 中处理好的 10 个不同浓度的有机酸混合标准溶液, 按 1.4.4 节的色谱条件分别进行进样分析,

以各有机酸的峰面积 (Y) 对质量浓度 (X/mg/L) 作图, 绘制标准曲线, 进行线性回归分析, 以信噪比 (RSN) 为 3 时, 测定各有机酸的检测限。

由表1可知, 各有机酸在线性范围内, 线性关系良好, 相关系数都在0.99以上, 最低检出限在0.53~2.51 mg/L 范围。

2.3 回收率和精密度

将同一柑橘皮渣发酵-青贮饲料样品提取液分成2份, 其中一份加入已知量有机酸标样, 另一份不加, 经0.45 μm 水系微孔滤膜过滤后, 按照1.4.4节的色谱条件测定, 每份样品进行5次平行测定, 通过各有机酸的加入量和测量值计算回收率和相对标准偏差, 结果见表2。

表2 回收率及精密度 (n=5)

Table 2 Recovery and precision of the method

组分	本底值/(mg/L)	加入量/(mg/L)	测定值/(mg/L)	回收率/%	RSD/%
草酸	42.03	50.00	89.51	94.96	0.84
甲酸	184.42	200.00	379.03	97.31	2.57
乳酸	2556.62	2000.00	4606.62	102.50	1.01
乙酸	1030.69	1000.00	2014.77	98.41	1.37
柠檬酸	88.24	100.00	184.24	96.00	2.46
丙酸	52.95	100.00	156.38	103.43	2.11

由表2可知, 各组分有机酸的回收率为94.96~103.43%, 回收率较高, 各种有机酸的相对标准偏差在0.84~2.46%范围, 该测定方法的灵敏度较好, 重复性较高。

2.4 样品测定

按照1.4.3节的方法处理样品, 按照1.4.4节的色谱条件进样分析, 有机酸标准混合液和样品提取液色谱图如图6、7所示。

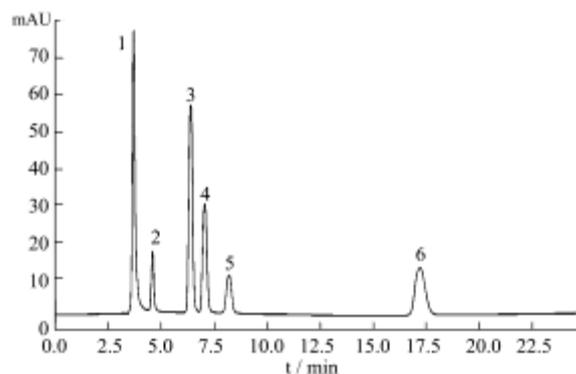


图6 对储备液稀释4倍的有机酸混合标样色谱图

Fig.6 Chromatogram of 4-fold diluted mixed organic acids standard solution

注：1.草酸；2.甲酸；3.乳酸；4.乙酸；5.柠檬酸；6.丙酸。

由图 6、7 可知，无论是混合标准品，还是柑橘皮渣样品，6 种有机酸均得到有效分离。以标准样品保留时间为对照，标准曲线为依据，计算得到柑橘皮渣发酵-青贮饲料中各种有机酸的含量，详见表 3。

由表3可知，柑橘皮渣发酵-青贮饲料中含有草酸、甲酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、丙酸，其中乳酸含量最高为51.13 mg/g，其次是乙酸，达20.61 mg/g。优质青贮的明显特征是 pH 值低，且乳酸含量高^[13]；本实验的乳酸含量高，说明青贮效果良好。此外，乙酸能抑制腐败微生物的生长，所以本实验乙酸含量较高，有利于青贮饲料在有氧条件的稳定性。

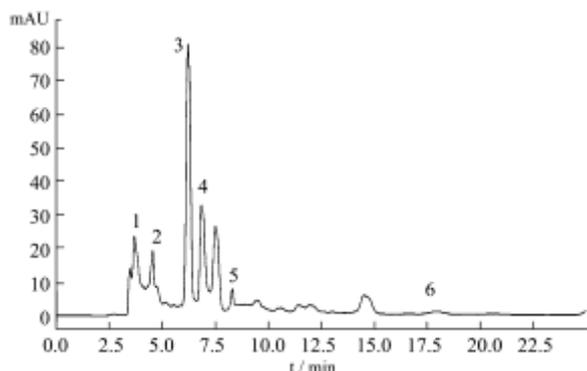


图 7 柑橘皮渣发酵-青贮饲料中有机酸色谱图

Fig.7 Chromatogram of organic acids in fermentation-silage of citrus peel wastes

注：1.草酸；2.甲酸；3.乳酸；4.乙酸；5.柠檬酸；6.丙酸。

表3 柑橘皮渣发酵-青贮饲料中有机酸含量 (mg/g)

Table 3 Concentrations of the organic acids in fermentation-silage of citrus peel wastes

样品	草酸	甲酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	丙酸
1	0.84	3.79	50.76	20.77	1.71	1.09
2	0.85	3.59	50.67	20.11	1.73	1.03
3	0.83	3.79	50.84	20.71	1.82	1.05
4	0.84	3.63	51.67	20.73	1.77	1.07
5	0.84	3.64	51.72	20.74	1.78	1.06
平均	0.84	3.69	51.13	20.61	1.76	1.06
RSD/%	0.84	2.57	1.01	1.37	2.46	2.11

3 结论

3.1 实验确立了同时测定柑橘皮渣发酵-青贮饲料中6种有机酸的反相高效液相色谱分析条件，即色谱柱：Welch Materials XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm，5 μm)，检测波长：214 nm，流动相：0.05 mol/L 磷酸二氢钾 (pH 2.70) 和甲醇 (体积比为97:3)，柱温：25 °C，流速：0.80 mL/min，进样量：20 μL。在该分析条件下，6种有机酸在20 min 内分离效果良好，相关系数均在0.99

以上，回收率为 94.96~103.43%，最低检出限在 0.53~2.51 mg/L 范围，RSD<3%。

3.2 本文建立的反相高效色谱分析方法具有样品处理过程简单、分析时间短，回收率好、相对标准偏差低、重现性好、精密度高等特点，可用于柑橘皮渣发酵-青贮饲料中有机酸含量的分析与控制，具有较大的实用价值。

参考文献

- [1] 孙金辉,陈海桂,卢沿钢,等.柑橘皮渣生物转化利用研究进展[J].食品科学,2011,32(19):312-315
SUN Jin-hui, CHEN Hai-gui, LU Yan-gang, et al. Research Advance in Biotransformation and Utilization of Citrus Peels [J]. Food Science, 2011, 32(19): 312-315
- [2] Cao J, Hang Y, Lu J, Tong Z, et al. Determination of nonnitrogenous organic acids and inorganic anions in sugarcane molasses and molasses alcohol waste by ion chromatography with solid-phase extraction [J]. Se Pu, 2010, 28(9): 893-897
- [3] Altria K D. Analysis of Small Organic Acids by Capillary Electrophoresis [J]. LC-GC Europe, 2012, 25(12): 682-684
- [4] Jae Y L, Duc-Toan N, Young S P, et al. Organic Acid Profiling Analysis in Culture Media of Lactic Acid Bacteria by Gas Chromatography-Mass Spectrometry [J]. Mass Spectrometry Letters, 2012, 3(3): 74-77
- [5] Pelin G E, Cevdet N. Determination of organic acids in olive fruit by HPLC [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2010, 28(3): 202-205
- [6] Violeta N, Ion T, Mira E I. HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions [J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2010, 38(1): 44-48
- [7] V G Amelin, I V Podkolzin, A V Tretiakov. Determination of organic acids in alcoholic and nonalcoholic beverages by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2012, 67(3): 262-268
- [8] 殷钟意,王颖,郑旭煦,等.柑桔皮渣发酵高蛋白饲料菌种筛选与工艺研究[J].饲料研究,2009,4:43-46
YIN Zhong-yi, WANG Ying, ZHENG Xu-xu, et al. Citrus Peel Fermented High-Protein Feed Bacteria Screening and Technology [J]. Feed Research, 2009, 4: 43-46
- [9] Zhang Y Z, Li P M, Cheng L L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Homey crisp' apple flesh [J]. Food Chemistry, 2010, 123(4): 1013-1018

- [10] 贾洪锋,贺稚非,李洪军,等.高效液相色谱法测定发酵辣椒中的有机酸[J].食品科学,2008,29(3):374-379
JIA Hong-feng, HE Zhi-fei, LI Hong-jun, et al. Analysis of Organic Acids in Fermented Capsicum by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography [J]. Food Science, 2008, 29(3): 374-379
- [11] 崔婧,段长青,潘秋红.反相高效液相色谱法测定葡萄中的有机酸[J].中外葡萄与葡萄酒,2010,5:25-30
CUI Jing, DUAN Chang-qing, PAN Qiu-hong. Determination of Organic Acids in Grape Berry with Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography [J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2010, 5: 25-30
- [12] 吕利华,梁丽绒,赵良启.山西老陈醋中有机酸的HPLC测定分析[J].食品科学,2007,28(11):456-459
LV Li-hua, LIANG Li-rong, ZHAO Liang-qi. Determination of Organic Acids in Shanxi Ageing Vinegar by High Performance Liquid Chromatography [J]. Food Science, 2007, 28(11): 456-459
- [13] 吉进卿.青贮饲料营养价值的影响因素[J].中国饲料,1998,7:29-32
JI Jin-qing. The Influence Factors Affecting the Nutrition Value of Silage [J]. China Feed, 1998, 7: 29-32