

覆盆子中有机酸含量的测定

孙金旭^{1,2}, 朱会霞^{1,2}, 肖冬光¹

(1. 工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

(2. 衡水学院生命科学系, 河北衡水 053000)

摘要: 覆盆子为药食两用果实, 具有抗衰老、调节生殖系统、促进细胞免疫机能、减肥之功效。本研究利用 HPLC 法对覆盆子干果中有机酸含量进行测定, 测定的色谱条件为: 柱温 30 °C, 流动相为 0.05 mmol H₂SO₄, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL, 色谱柱为 C₁₈ 柱, 在设定的色谱条件下覆盆子干果处理液峰面积与有机酸标品线性关系良好, 相关系数在 0.9998~0.9999 之间, 精密度实验各有机酸 RSD 值在 0.30~0.90% 之间, 重现性实验各有机酸 RSD 值在 0.42~3.69% 之间, 加标回收率在 97.86~102.35% 之间, 此方法用于测定覆盆子干果中有机酸含量准确、可行。

关键词: 覆盆子; 有机酸; HPLC

文章编号: 1673-9078(2013)6-1374-1376

Determination of the Contents of Organic Acids of Raspberry

SUN Jin-xu^{1,2}, ZHU Hui-xia^{1,2}, XIAO Dong-guang¹

(1. Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (2. Department of Biology, Heng shui College, Heng shui, He bei 053000, China)

Abstract: As an edible Chinese herb, raspberry could improve overall energy, vitality aphrodisiac and immune booster. A method for determining organic acids in Raspberry by HPLC was developed and the best HPLC determination conditions with a C₁₈ column were determined as follows: column temperature 30 °C, mobile phase 0.05 mmol H₂SO₄, flow rate 0.5 mL/min, detection wavelength 210 nm and injection volume 10 μL. Under the detection conditions, five organic acids could be successfully separated with good linear relationships (correlation coefficients above 0.9998). The precision RSD, repeatability RSD and recovery rates were of 0.30~0.90%, 0.42~3.69% and 97.86~102.35%, respectively. The method was convenient, rapid, accurate and applicable to determine organic acids in raspberry.

Key words: Raspberry; organic acids; HPLC

覆盆子 (Raspberry) 干果为药食两用果实, 2005 年被《中华药典》收录, 味甘, 略带涩味, 覆盆子干果中含有的有机酸, 糖类, 维生素, 鞣花酸, β-谷甾醇及微量元素等具有抗衰老、调节生殖系统、促进细胞免疫机能、减肥之功效^[1-2]有助阳缩尿、补肾固精功能, 用于治疗阳痿、肾虚遗精、尿频和遗尿等病症^[3], 对金黄色葡萄球菌、人型结核杆菌和霍乱弧菌有较强的抑制作用和延缓肌体衰老, 提高免疫能力的作用, 因此, 覆盆子具有很强的药用及保健作用。

目前, 国内对覆盆子的利用主要集中在食品加工、药品生物制品及保健品的加工、化妆品生产等方面。

收稿日期: 2013-03-01

基金项目: 河北省科技厅资助项目 (11215645)

作者简介: 孙金旭 (1975-), 男, 博士, 副教授, 主要从事发酵工程、食品等方面的研究

通讯作者: 肖冬光 (1955-), 男, 博导, 主要从事发酵工程、食品等方面的研究

国外则主要对覆盆子中的活性物质进行研究^[4-6], 如花青素、葡糖苷酶、多酚氧化酶等。食品加工和化妆品生产主要是针对覆盆子鲜果的利用, 如果酱、果酒、果汁等系列产品的开发, 药品主要是对覆盆子干果中草药方面的利用。但传统的水煮煎熬的方法使得覆盆子干果的药效成分易被破坏, 利用率低。

覆盆子干果主要功能性成分为多糖、黄酮、萜类、鞣花酸、有机酸等, 据文献报道^[6], 覆盆子多糖、黄酮^[7-11]方面的研究较多, 而对于有机酸的研究报道几乎没有, 本研究以覆盆子干果为原料, 对 HPLC 法测定覆盆子干果中的有机酸含量进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

覆盆子干果: 购于衡水市中医院中药店; 酒石酸、苹果酸、草酸、枸橼酸、抗坏血酸标准品, 购于国家标准物质网。

1.2 仪器

高效液相色谱 (Agilent1200系列DAD检测器); HPX-87柱 (300 mm×7.8 mm×9 μm) 电子天平, 上海田宫称重制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱测定条件^[12]

液相色谱法测定条件为柱温 30 ℃, 流动相为 0.05 mmol H₂SO₄, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL。

1.3.2 样品处理方法^[12]

准确称取覆盆子干果 10 g, 粉碎过 60 目后, 加入超纯水 50 mL, 60 ℃水浴超声提取 40 min, 经冷却后, 经 3000 r/min 离心处理 10 min 后, 上清液经过滤后转入 100 mL 的容量瓶中, 超纯水定容至刻度后, 待测液用微孔过滤器过滤后待用。

1.3.3 标准品处理及标准曲线的绘制^[6]

准确称取酒石酸、苹果酸、草酸、枸橼酸、抗坏血酸标准品各 50 mg, 转移至 10 mL 的容量瓶中, 用超纯水定容至, 摇匀, 得到 5.00 mg/mL 的有机酸的标准母液, 分别吸取标准母液, 进行梯度稀释, 经 0.45 μm 微孔过滤膜过滤后待用, 以峰面积(X)对质量浓度(Y)求回归方程和相关系数。

1.3.4 样品测定

经上述 1.3.2 处理后的样品, 进样量 10 μL 进行测定, 采用外标法测定。

1.3.5 RSD 计算公式

相对标准偏差计算公式如所示。

$$X = \frac{\sum x}{n} = \frac{(x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5)}{5}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - X \times \sum x}{n-1}}$$

$$RSD = \frac{S}{X} \times 100\%$$

1.3.6 回收率计算

回收率计算公式如下:

$$A = \frac{W + Z - E}{W + Z} \times 100\%$$

注: A:回收率; W: 原覆盆子中各有机酸含量 mg; Z: 加标量 mg; E: 加标后测定混合液中各有机酸含量 mg。

2 结果与讨论

2.1 有机酸标准品 HPLC 色谱图

各有机酸标准品 HPLC 测定条件为: 柱温 30 ℃, 流动相为 0.05 mmol H₂SO₄, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL, 测定结果如图 1 所示。

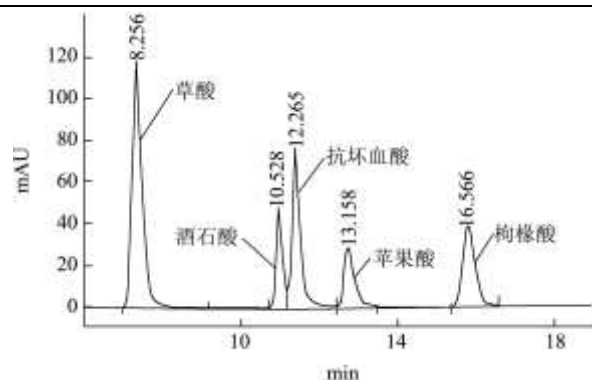


图 1 有机酸标准品 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of organic acid standards

由图 1 可知, 在设定的 HPLC 测定条件下, 各有机酸都能够分开, 且分离效果较好, 各有机酸的出峰时间分别为: 草酸 8.256 min、酒石酸 10.528 min、抗坏血酸 12.265 min、苹果酸 13.158 min、枸橼酸 15.566 min, 表明该 HPLC 测定条件较适宜于各有机酸的测定。

2.2 有机酸标准品 HPLC 曲线方程及相关性

各有机酸标准品在浓度为 0.001~1.0 mg/mL 范围内, 按照一定浓度梯度将一系列的混合标准品进行 HPLC 分析, 以峰面积为 x、有机酸含量为 Y, 对各有机酸测定值进行相关分析和线性回归分析, 结果如表 1 所示。

表 1 有机酸标准品测定线性相关性

Table 1 Linear equations for organic acid determination

组分	回归方程	相关系数	线性范围
草酸	Y=1.15×107X-2.15×104	0.9998	0.001~0.500
酒石酸	Y=5.32×105X+4.65×102	0.9998	0.001~1.000
抗坏血酸	Y=7.85×105X+2.13×103	0.9999	0.001~1.000
苹果酸	Y=1.57×106X+1.86×103	0.9998	0.001~1.000
枸橼酸	Y=6.84×105X+1.89×102	0.9999	0.001~1.000

由表 1 可知, 各有机酸线性回归方程的相关系数都在 0.9998~0.9999 之间, 表明各有机酸组分的峰面积和有机酸浓度之间的线性关系良好, 以此条件测定有机酸含量可信度较高。

2.3 精密度实验

表 2 方法精密度试验

Table 2 Results of precision experiments

组分	峰面积	平均值	RSD/%
草酸	537656 538638 539669 536588 535669 537644	537644	0.30
酒石酸	623635 625496 626758 623869 624513 624854	624854	0.21
抗坏血酸	388586 389763 387885 388691 389782 388941	388941	0.21
苹果酸	766833 763825 765910 763883 765829 765256	765256	0.18
枸橼酸	283643 286595 287656 282712 288660 285853	285853	0.90

取一定浓度的混合标准样品, 分 5 次进样, 分别测定 5 次进样各有机酸的峰面积, 计算各有机酸 5 次

进样的RSD值,结果如表2所示。

由表2可知,根据各有机酸标准品的峰面积分别计算各有机酸的精密度,草酸、酒石酸、抗坏血酸、苹果酸、枸橼酸的RSD值在0.30~0.90%之间,表明该方法精密度良好。

2.4 重复性试验

精密称取同一份经处理后覆盆子样品,均匀的分为5份,按样品处理方法进行处理后制成供试溶液,经HPLC测定其中各有机酸含量,计算各有机酸平均值及RSD值,结果如表3所示。

表3 重复性试验

Table 3 Result of repetitive test

组分 (mg/mL)	1	2	3	4	5	平均值	RSD /%
草酸	0.1318	0.1325	0.1315	0.1328	0.1326	0.1322	0.42
酒石酸	0.0086	0.0079	0.0083	0.0085	0.0080	0.0083	3.69
抗坏血酸	0.2136	0.2158	0.2146	0.2131	0.2140	0.2142	0.48
苹果酸	0.1128	0.1135	0.1136	0.1123	0.1141	0.1133	0.63
枸橼酸	0.0758	0.0746	0.0755	0.0750	0.0738	0.0750	1.05

由表3可知,经测定后5份覆盆子中各有机酸含量的平均值分别为:草酸0.1322 mg/mL,酒石酸0.0083 mg/mL,抗坏血酸0.2142 mg/mL,苹果酸0.1133 mg/mL,枸橼酸0.0750 mg/mL, RSD值在0.42~3.69%之间,表明该方法的重复性均达到分析的要求。

2.5 回收率实验

精确量取同一覆盆子提取液5份,每份10 mL,将不同浓度的各有机酸标准品添加至覆盆子提取液中,混匀,经过滤膜过滤后,取10 μL进样测定各混合样有机酸含量,计算回收率,结果如表4所示。

表4 有机酸回收率试验

Table 4 Recovery rates of organic acids

组分	含量 (mg/mL)	加标量 (mg/mL)	测定值 (mg/mL)	回收率 RSD/%
草酸	0.1315	0.1000	0.2283	98.65
酒石酸	0.0089	0.002	0.1116	102.35
抗坏血酸	0.2135	0.2000	0.4046	97.86
苹果酸	0.1133	0.1000	0.2105	98.66
枸橼酸	0.0765	0.0300	0.1082	101.58

由表4可知,经加标后,各有机酸的回收率在97.86~102.35%之间,表明标品回收良好,此方法适宜于覆盆子干果提取液中各有机酸含量的测定。

2.6 覆盆子干果中各有机酸含量的测定

根据设定的HPLC色谱条件,经覆盆子干果处理液进行色谱分离,结果如图2所示。

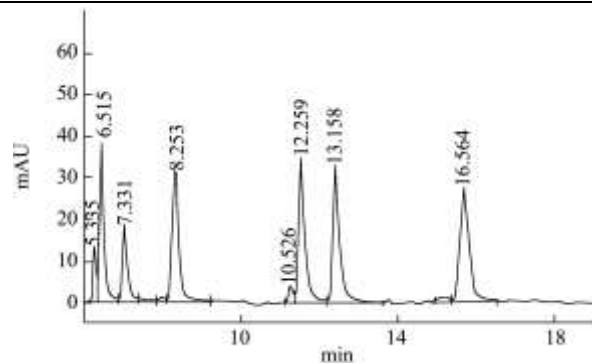


图2 覆盆子干果提取液有机酸HPLC色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of organic acids in Raspberry

由图2可知,在设定的色谱条件下,覆盆子干果处理液的分离效果较好,色谱峰之间的分离度较大,覆盆子干果处理液HPLC色谱图中的出峰时间和标准品色谱图对照可知,覆盆子干果提取液中含有草酸、酒石酸、抗坏血酸、苹果酸、枸橼酸5种有机酸,除此之外,还有3个未知成分的色谱峰出现,说明该方法能成功的将覆盆子干果处理液中的成分分开,该HPLC条件适宜于覆盆子干果处理液中有机酸含量的测定分析。

表5 覆盆子干果中各有机酸含量

Table 5 The organic acids content in raspberry

有机酸种类	草酸	酒石酸	抗坏血酸	苹果酸	枸橼酸
含量/(mg/g)	1.315	0.089	2.135	1.133	0.765

表5表明,经HPLC色谱法测定覆盆子中的各有机酸含量,抗坏血酸含量最高为2.135 mg/g,其次为草酸为1.315 mg/g,各有机酸含量的高低次序为:抗坏血酸>草酸>苹果酸>枸橼酸>酒石酸。

3 结论

本实验研究建立了准确、快速的测定覆盆子干果中有机酸含量的测定方法,采用HPLC法测定覆盆子干果处理液中有机酸含量的色谱条件为:柱温30℃,流动相为0.05 mmol H₂SO₄,流速0.5 mL/min,检测波长210 nm,进样量10 μL,色谱柱为C₁₈柱,此方法测定覆盆子干果处理液峰面积与有机酸标品线性关系良好,相关系数在0.9998~0.9999之间,加标回收率在97.86~102.35%之间,此方法用于测定覆盆子干果中有机酸含量准确、可行。

参考文献

[1] 郭启雷,杨峻山.掌叶覆盆子的化学成分研究[J].中国中药杂志,2005,30(3):198-200
 [2] 孙金旭.超滤在覆盆子发酵酒中的应用研究[J].现代食品科技,2012,28(10):1712-1715

- [3] Guo Q L, Yang J S. Studies on the chemical constituents in fruits of *Rubus chingii* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2005, 30 (3): 198-200
- [4] Zou H Y, Tu P F. Study on flavonoids from *Lysimachia clethroides* [J]. *Chin J Nat Med*, 2004, 2 (1): 59-61
- [5] Roestos C, Boziaris I S, Nyehas G J E. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity [J]. *Food Chemistry*, 2006, 95: 664-671
- [6] Yang J X, Cai J P, Zhu L. Utilization of cellulose in extraction of Chinese medicine components [J]. *Chin Med Mater*, 2009, 28(1): 64-67
- [7] Frederick Kachik, Rockville, M D(US). Process for extraction purification of lutein, zeaxanthin and arecaroteids from marigold flowers and plants [P]. 2005, 2-7
- [8] 朱会霞. 覆盆子黄酮的抑菌特性研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(11): 1826-1829
- [9] Masao H, Kue P K, Yue Z S, et al. Atriterpene from the fruits of *rubus chingii* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27 (12): 3975
- [10] 程丹, 李洁, 周斌, 等. 覆盆子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材, 2012, 25(11): 38-42
- [11] 郭燕, 梁俊, 李敏敏, 等. 高效液相色谱法测定苹果果实中的有机酸[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 227-230