

三波长分光光度法快速测定青苹果中的苹果酸

Fast determination of malic acid in greenapple by three-wavelength spectrophotometry

庞向东^{1,2} 江虹^{1,2} 张琴^{1,2} 蒋天艳^{1,2}

PANG Xiang-dong^{1,2} JIANG Hong^{1,2} ZHANG Qin^{1,2} JIANG Tian-yan^{1,2}

(1. 长江师范学院化学化工学院, 重庆 408100; 2. 重庆市无机特种功能材料重点实验室, 重庆 408100)
(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China;
2. Chongqing Key Laboratory of Inorganic Special Functional Materials, Chongqing 408100, China)

摘要:为建立快速测定青苹果中苹果酸的三波长分光光度法,利用孔雀石绿能在弱酸性的 Tris—盐酸缓冲溶液中与苹果酸反应,在可见光区生成具有 3 个明显正吸收峰(分别位于 568, 644, 424 nm 波长处)的绿色离子缔合物,对用三波长法测定苹果酸进行了研究,并考察了适宜的反应条件及吸收光谱特征。结果表明,用三波长叠加法测定,表观摩尔吸光系数(κ)为 $5.88 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$,苹果酸的质量浓度在 $0.008 \sim 1.900 \text{ mg/L}$ 时服从朗伯—比尔定律,定量限为 $0.0032 \text{ g}/100 \text{ g}$,样品加标回收率为 $98.23\% \sim 102.9\%$,相对标准偏差为 $1.8\% \sim 2.4\%$ 。该法可用于青苹果中苹果酸的测定。

关键词:青苹果;苹果酸;孔雀石绿;三波长;分光光度法

Abstract: A triple wavelength spectrophotometry to measure malice acid in green apples was established in this study. The reaction between malic acid and tris-hydrochloric acid buffer solution of malachite green showed that a green ionic association complex with three positive absorption peak locating in 568 nm, 644 nm and 424 nm, respectively, could be found in visible light generated area. Moreover, the malic acid with triple wavelength spectrophotometry and its related reaction condition and absorption spectral character were investigated. The result showed that the molar absorption coefficient of performance was $5.88 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, and the quality concentration of malic acid was found to be $0.008 \sim 1.900 \text{ mg/L}$, conforming to Lambert-Beer's Law. It was also found that the limit of quantitation was $0.0032 \text{ g}/100 \text{ g}$, and the adding standard recovery rate was 98.23% to 102.9% , with a relative standard deviation at

$1.8\% \sim 2.4\%$. This method could be used for the determination of malic acid in green apple.

Keywords: green apple; malic acid; malachite green; three-wavelength; spectrophotometry

苹果酸在改善记忆功能、预防老年性痴呆、增强钙的活性及降低抗癌药物毒副作用等方面具有一定价值^[1]。目前,苹果酸含量的测定方法主要有:高效液相色谱法^[2-4]、气相色谱法^[5]、液质联用法^[6-7]和电化学法^[8-9]等。高效液相色谱法仪器价格昂贵,且前处理繁琐、费时;气相色谱法的前处理也较繁琐;电化学法的重现性较差。由于紫外—可见分光光度法仪器价廉,操作简便,且未见利用三波长可见分光光度法进行苹果酸测定的报道。因此,本研究拟以三苯甲烷类染料孔雀石绿为探针,在弱酸性溶液中,采用三波长可见分光光度法测定苹果酸的含量,旨在建立一种青苹果中苹果酸的快速测定方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

紫外—可见—近红外分光光度计:U-4100 型,日本日立公司;

精密酸度计:pHS-3C 型,上海虹益仪器仪表有限公司;

电子天平:EL104 型,上海梅特勒—托利多仪器有限公司;

青苹果:1#~4#,购自重庆 4 个农贸市场;

三羟甲基氨基甲烷:分析纯,齐一生物科技(上海)有限公司;

盐酸:分析纯,重庆华东化工有限公司;

孔雀石绿:生物染色剂,上海试剂三厂;

苹果酸:分析纯,重庆药品食品检定所;

试验用水:二次蒸馏水。

基金项目:重庆市教委科技基金资助项目(编号:KJ1401226);长江师范学院科技基金资助项目(编号:2015CX080)

作者简介:庞向东,男,长江师范学院副教授。

通信作者:江虹(1956—),女,长江师范学院教授。

E-mail: jianghongch@163.com

收稿日期:2016-09-06

1.2 试验方法

1.2.1 溶液配制

(1) 孔雀石绿 (malachite green, MAG) 溶液: 1.0×10^{-3} mol/L。称取适量孔雀石绿于小烧杯中,用水溶解后,转移至 500 mL 容量瓶中,用水定容。

(2) 苹果酸(malic acid,MAL)标准溶液:134.1 mg/L 贮备液。称取适量苹果酸于小烧杯中,用水溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,用水稀至刻度,冰箱 4 ℃ 保存。使用时用水稀释 10 倍。

(3) Tris (三羟甲基氨基甲烷)—盐酸缓冲溶液:用 0.20 mol/L Tris 溶液与 0.10 mol/L 盐酸混合,用酸度计测定,配成 pH 3.0~9.6 的系列缓冲溶液。

1.2.2 样品的处理 取青苹果 1#~4# 各多个,削皮,去核,榨汁。准确称取搅拌均匀的 1# 果汁 5.062 3 g,2# 果汁 5.023 6 g,3# 果汁 5.017 4 g 和 4# 果汁 5.025 5 g,过滤,滤液分别置于 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,摇匀,即得待测液。

1.2.3 测定波长及 pH 值的选择 取 11 支 10 mL 具塞比色管,分别准确加入 13.41 mg/L 苹果酸标准溶液 1.0 mL 和 1.0×10^{-3} mol/L 孔雀石绿溶液 2.0 mL,再分别加入 pH 值为 3.09,3.56,4.07,4.35,5.03,5.49,5.86,6.15,6.45,6.85,7.58 的 Tris—盐酸缓冲溶液 1.0 mL,用水稀至 10 mL 刻度,摇匀,用 1 cm 比色皿,以试剂空白作参比,扫描吸收光谱。根据光谱图,确定测定波长。再根据吸收峰处的吸光度 A,作吸光度—pH 曲线图,确定缓冲溶液的最佳 pH 值。

1.2.4 缓冲溶液用量的选择 在标准溶液和显色剂溶液浓度不变的情况下,分别加入 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL 1.2.3 节选定的 pH 值,并按 1.2.3 节的方法扫描吸收光谱,作吸光度—缓冲液用量的曲线图,确定最佳缓冲液的用量。

1.2.5 显色剂溶液浓度的选择 在其它条件不变的情况下,改变 1.0×10^{-3} mol/L 孔雀石绿溶液的用量,再按 1.2.3 节方法扫描吸收光谱,作吸光度—显色剂溶液浓度曲线图,确定最佳显色剂溶液的浓度。

1.2.6 加入顺序的选择 在上述选定的条件下,改变各试剂的加入顺序,按 1.2.3 节方法扫描吸收光谱,根据光谱曲线图,确定最佳加入顺序。

1.2.7 测定时间的选择 在上述选定的条件下,扫描不同时间(*t*)下的吸收光谱,作吸光度—反应时间曲线图,确定最佳测定时间。

1.2.8 标准曲线的制作 在选定的显色剂浓度、pH 值、用量及顺序的条件下,分别加入 13.41 mg/L 苹果酸标准溶液 0.2、0.6、1.0、1.4 mL,再用水稀至刻度,摇匀,在选定的时间下,用 1 cm 比色皿,以试剂空白作参比,按选定条件扫描吸收光谱,根据测定波长下的吸光度及苹果酸的质量浓度,绘制吸光度—苹果酸质量浓度标准曲线。

1.2.9 共存物质的影响 在选定的条件下,加入 1.0 mL 13.41 mg/L 苹果酸标准溶液,按 1.2.3 节方法配制溶液并扫描吸收光谱;另取若干支 10 mL 具塞比色管,在前述溶液的基础上,分别加入需考察的共存物质,再按选定条件扫描吸

收光谱,并与未加共存物质的谱线比较,判断共存物质是否干扰苹果酸的测定。

1.2.10 样品中苹果酸的测定 取 1.2.2 节中的待测样液适量,按选定的条件加入显色剂及缓冲溶液,用水稀至 10 mL 刻度,摇匀,按选定条件扫描吸收光谱,根据样品的吸光度及标准曲线或回归方程,求得样液中苹果酸的含量,再求出原始样液中苹果酸的含量。各平行测定 6 份,同时做加标回收试验(*n*=6)。

2 结果与讨论

2.1 反应体系的吸收光谱特征

图 1 为 MAG—MAL 体系的吸收光谱图。由图 1 可知,苹果酸在可见光区几乎无吸收;孔雀石绿在可见光区有较强吸收,最大吸收波长为 616 nm;在孔雀石绿的弱酸性溶液中加入苹果酸标准溶液后,因孔雀石绿为碱性染料,可与苹果酸以静电引力作用生成二元离子缔合物,使可见光区内的光谱曲线上出现 3 个较强的吸收峰,最大吸收峰位于 568 nm,次大吸收峰位于 644 nm,相对最小的吸收峰位于 424 nm。在此 3 个波长处,一定浓度范围的苹果酸的质量浓度与二元缔合物的吸光度呈良好的线性关系。根据吸光度的加和性,用三波长叠加法测定时,一定浓度范围的苹果酸的质量浓度与体系的吸光度仍呈线性关系,并服从朗伯—比尔定律,且方法的灵敏度 5.88×10^4 L/(mol·cm),是单波长法测定的 2.5~4.0 倍。故选择用三波长法定量检测苹果酸的含量。

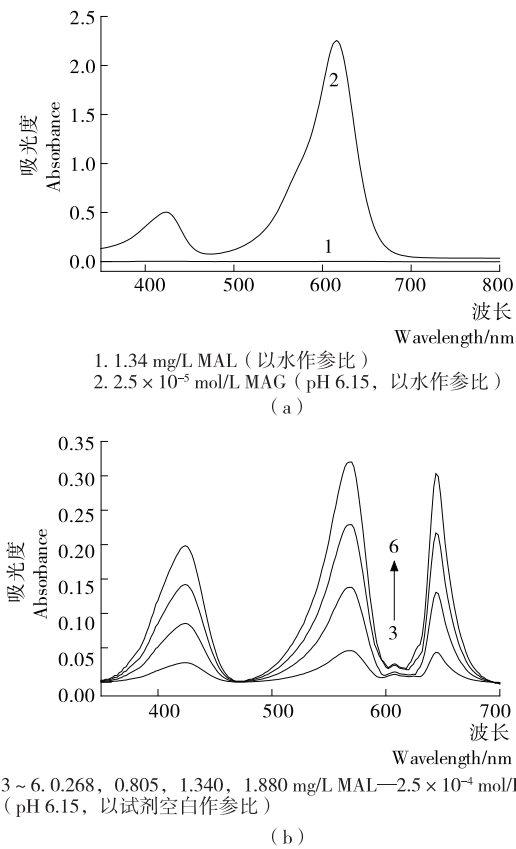


图 1 吸收光谱

Figure 1 The absorption spectra

2.2 反应条件的优化

2.2.1 pH 值 由图 2 可知:在 pH 5.5~6.8 时,缔合物在 644,568,424 nm 波长处的吸光度均较大,且基本处于一个平台上,这表明反应的适宜 pH 范围为 5.5~6.8,在此范围外,缔合物的吸光度均有不同程度降低。当采用三波长法测定时,因三波长处的吸光度叠加值比单波长大,灵敏度更高。因此选择用 pH 6.15 的 Tris—盐酸缓冲溶液。继而固定其它条件不变,改变 pH 6.15 的用量,结果表明:适宜用量为 1.5 mL。

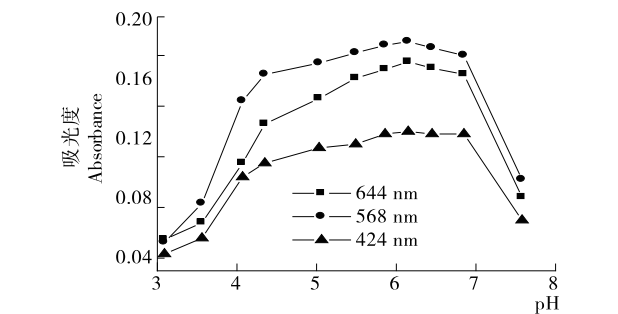


图 2 pH 值对吸光度的影响
Figure 2 Effect of buffer pH on absorbance

2.2.2 显色剂溶液的浓度 由图 3 可知:当孔雀石绿溶液浓度为 2.5×10^{-4} mol/L 时,缔合物在 644,568,424 nm 波长处的吸光度值均较大,当用三波长法测定时,其三波长叠加吸光度比单波长更大,灵敏度更高。故试验用 2.5 mL 1.0×10^{-3} mol/L 孔雀石绿溶液。

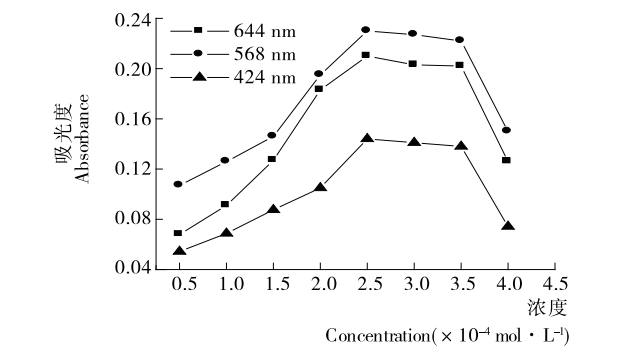


图 3 孔雀石绿溶液的浓度对吸光度的影响
Figure 3 Effect of malachite green concentration on absorbance

2.2.3 试剂加入顺序 由表 1 可知,在选定条件下,当加入顺序为 Tris—盐酸缓冲溶液、孔雀石绿溶液、苹果酸标准溶液时,缔合物在 644,568,424 nm 波长处的吸光度值相对最大,当用三波长法测定时,其三波长叠加吸光度更大,灵敏度更高。故试验按此最佳顺序进行。

加入顺序	波长/nm		
	644	568	424
标准溶液、显色剂、缓冲溶液	0.192	0.203	0.115
标准溶液、缓冲溶液、显色剂	0.182	0.192	0.109
缓冲溶液、显色剂、标准溶液	0.207	0.219	0.132

2.2.4 反应时间及缔合物的稳定性 由图 4 可知,开始时,缔合物的吸光度随时间的增加而逐渐增大,至 20 min 后,吸光度值基本不变。这说明苹果酸与孔雀石绿的显色反应在 20 min 内即可完成,生成的缔合物稳定时间至少 1 h。故试验选在 20 min 后测定。

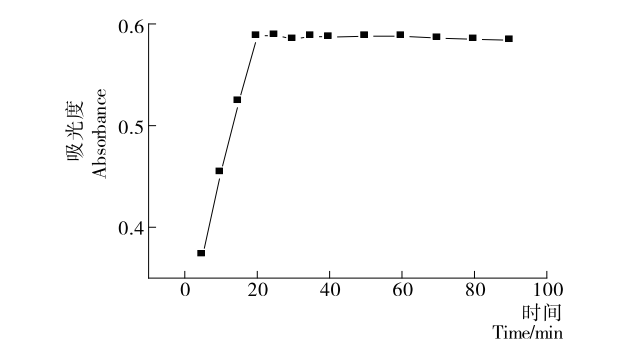


图 4 反应时间对吸光度的影响
Figure 4 Effect of reaction time on absorbance

2.3 标准曲线

于 10 mL 具塞比色管中,准确加入 pH 6.15 Tris—盐酸缓冲溶液 1.5 mL 和 1.0×10^{-3} mol/L 孔雀石绿溶液 2.5 mL,再加入适量的 13.41 mg/L 苹果酸标准溶液,用水稀至刻度,摇匀,20 min 后,用 1 cm 比色皿,以试剂空白作参比,采用三波长(644,568,424 nm)叠加法测定溶液的吸光度 A 。作吸光度—苹果酸质量浓度标准曲线见图 5。由图 5 可知,苹果酸的质量浓度在 0.008~1.900 mg/L 时量与缔合物的吸光度呈线性关系,服从朗伯—比尔定律。该方法的一元线性回归方程为 $A = -0.001\ 03 + 0.439\ 1\rho$,相关系数 $r = 0.999\ 9$,根据朗伯—比尔定律可求得表观摩尔吸光系数为 5.88×10^4 L/(mol·cm),再根据式(1)求出方法的定量限为 0.003 2 g/100 g。

$$Q = \frac{10s_b}{Sm}, \tag{1}$$

式中:
 Q ——定量限, $\mu\text{g/g}$;
 s_b ——多次测定的空白信号的标准偏差;
 S ——分析方法的灵敏度, μg^{-1} ;
 m ——样品的质量, g。

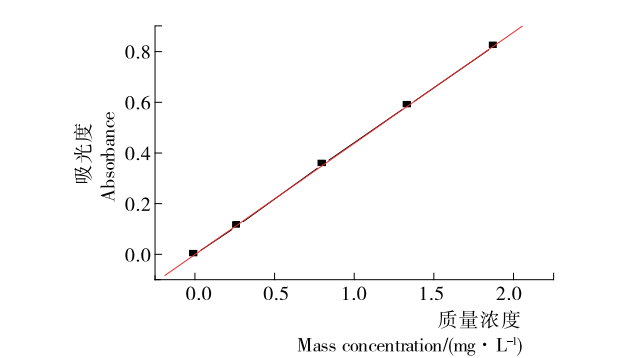


图 5 苹果酸的标准曲线
Figure 5 Standard curve of malic acid

2.4 共存物质的影响

在室温及最佳试验条件下,用三波长法测定某些常见物质对测定 1.341 mg/L 苹果酸的影响。结果表明,相对误差 $\leq \pm 5\%$ 时,以下物质不干扰测定:100 倍的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、*L*-赖氨酸、*L*-组氨酸、*L*-亮氨酸、*L*-白氨酸、*L*-色氨酸、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- ;40 倍的 *D*-果糖、谷氨酸、甘氨酸、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Fe^{2+} 、 SO_3^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 SO_4^{2-} ;20 倍的酒石酸、山梨酸、苯甲酸、柠檬酸、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 、 CO_3^{2-} ;5 倍的 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 。可见,食品中常见的有机

酸、糖类及常见阴、阳离子不干扰苹果酸的测定。虽然 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 的允许量较小,但它在苹果中的共存量一般很小,故方法具有良好的选择性。

2.5 分析应用

取 1.2.2 节中的待测样液各 0.5 mL,按最佳试验条件配制溶液,并扫描吸收光谱。根据三波长法的标准曲线或回归方程求得样液及原始样液中苹果酸的含量,同时做加标回收试验。测定结果与 HPLC 法(GB/T 5009.157—2003)对照,结果见表 2。

表 2 样品分析结果及回收试验
Table 2 Analytical results of samples and recovery tests ($n=6$)

样品	测得值/(10 ⁻² g · g ⁻¹)		本底值/ (×10 ⁻⁶ g)	加入标准量/ (×10 ⁻⁶ g)	测得值/ (×10 ⁻⁶ g)	回收率/%	RSD/%
	本法	HPLC 法					
1#	0.418 0	0.405 2	10.58	4.023, 2.682, 5.364	14.75, 13.33, 16.08	102.90	2.4
2#	0.426 2	0.433 1	10.71	5.364, 6.705, 4.023	16.00, 17.34, 14.62	98.23	1.8
3#	0.448 1	0.456 4	11.24	2.682, 4.023, 5.364	13.90, 15.20, 16.56	98.93	2.1
4#	0.422 0	0.414 2	10.61	3.353, 4.023, 4.694	14.02, 14.74, 15.40	102.10	2.2

由表 2 可知,回收率为 98.23%~102.9%,相对标准偏差为 1.8%~2.4%,表明本方法具有较高的准确度和精密度,测定结果与国标法基本一致。

3 结论

本试验建立了测定青苹果中苹果酸的三波长吸收光谱法。该法具有简便、快速的特点,并具有较高的准确度和精密度,可用于系列苹果中苹果酸的测定。但也存在灵敏度不很高的问题,有待对三元体系进行进一步研究。

参考文献

[1] 顾晓玲,张印红,王小宏. 100%苹果汁的营养成分分析与评价[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(1): 69-71.
[2] 李俦,戴涛涛,程超,等. 南酸枣及其枣糕有机酸组成及分析[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 17-20.
[3] 曹小彦,夏延斌,汪辉,等. 南北方葡萄酒中有机酸的研究[J].

食品与机械, 2013, 29(1): 45-48.
[4] 孙琦,谢让金,邓烈,等. 江津甜橙 3 个变异品种的果实品质及酸组分分析[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 124-129.
[5] 张霞,刘志华,杨光宇,等. 固相萃取富集/气相色谱法测定烟草中的 9 种有机酸[J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 545-550.
[6] 黄思棋,刘晓雪,张华,等. LC-MS 法测定果蔬中 6 种有机酸[J]. 食品科技, 2016, 41(1): 275-279.
[7] 刘晓雪,张华,张志丰,等. LC-MS 法测定四种果蔬中的有机酸[J]. 食品工业, 2016, 37(5): 283-287.
[8] CHEN Yan-min, GUO Liang-hong. Combined florescence and electrochemical investigation on the binding interaction between organic and human serum albumin[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(3): 373-379.
[9] FRANCO M, FRANCESCO B, GABRIELE F. Peroxidase based biosensors for the selective determination of *D*, *L*-lactic acid and *L*-malic acid in wines [J]. Microchemical Journal, 2007, 87(1): 81-86.

信息窗

美国更新果蔬等进口法规

美农业部农业销售局(AMS)发布一项临时法规,对水果、蔬菜、特种作物进口法规中部分受控商品的报告和通报要求进行更新。AMS 称,进行相关修改是为了支持国际贸易数据系统,促进贸易方提交进出口信息并实现自动化。评议于 2017 年 2 月 3 日前截止。相关修改包括:

1. 针对输往非商业性商店试销性质的西红柿,其豁免商品表格的提交程序有所改变,即从依据西红柿进口法规转为依据蔬菜进口法规的安保程序。

2. 更新开心果进口法规,不再要求输入时进行纸质通

报(即“签章和传真”方式),而代之以电子提交(须符合国际贸易数据系统 ITDS 要求)。

3. 简化橄榄和枣椰进口声明,涉及进口商向 USDA 检查人员提供识别信息,包括所检查的每批商品海关报关号。

4. 删除枣椰进口法规中的"进口"章节,原因是向 CBP (美海关边境保护局)提交的检验、豁免文件方面存在多余、不完整信息。

(来源:www.foodmate.net)

82