

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240126002

全自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法 测定果酒中14种有机酸

宗凌丽^{1*}, 孙小杰¹, 应月¹, 杨军丽¹, 刘新梅¹, 严楠¹, 庄浩¹, 高子禾²

(1. 南京市食品药品监督检验院, 南京 211198; 2. 南京医科大学公共卫生学院, 南京 211166)

摘要:目的 建立全自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测果酒中14种有机酸的方法。方法 采用MAX固相萃取小柱净化, Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈柱(150 mm×3.0 mm, 1.8 μm)分离, 0.4%甲酸溶液-乙腈为流动相梯度洗脱, 电喷雾离子源负离子模式下, 结合动态多反应监测模式, 外标法定量。结果 14种有机酸在各自的线性范围内相关系数均大于0.991, 方法的检出限为0.7~50.0 μg/L, 方法的定量限为2.0~150.0 μg/L, 回收率为82.6%~117.1%, 相对标准偏差为0.6%~8.7% (n=6)。结论 该方法操作简单、灵敏、重现性好, 适用于果酒中有机酸的定性定量测定。

关键词: 果酒; 有机酸; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 14 kinds of organic acids in fruit wine by automated solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZONG Ling-Li^{1*}, SUN Xiao-Jie¹, YING Yue¹, YANG Jun-Li¹, LIU Xin-Mei¹,
YAN Nan¹, ZHUANG Hao¹, GAO Zi-He²

(1. Nanjing Institute for Food and Drug Control, Nanjing 211198, China; 2. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the determination of 14 kinds of organic acids in fruit wine by automated solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were purified by MAX SPE columns. The analytes were separated on a Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈ column (150 mm×3.0 mm, 1.8 μm) by gradient elution with 0.4% formic acid-acetonitrile solution as the mobile phases. The MS analysis was performed by dynamic multiple reaction monitoring mode in the negative ion mode. The external standard method was used for quantification. **Results** The developed method showed good linearity for 14 kinds of organic acids with the correlation coefficients (r^2) greater than 0.991, the limits of detection ranged from 0.7 to 50.0 μg/L. The limits of quantification ranged from 2.0 to 150.0 μg/L.

基金项目: 南京市市场监督管理局科技项目(kj2021050)、江苏省市场监督管理局科技项目(KJ2024065)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Nanjing Market Supervision Administration (kj2021050), and the Science and Technology Project of Jiangsu Provincial Market Supervision Administration (KJ2024065)

*通信作者: 宗凌丽, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 495576667@qq.com

*Corresponding author: ZONG Ling-Li, Master, Senior Engineer, Nanjing Institute for Food and Drug Control, No.199, Wenfang Road, Jiangning District, Nanjing 211198, China. E-mail: 495576667@qq.com

The recoveries were in the range of 82.6%–117.1% with the relative standard deviations of 0.6%–8.7% ($n=6$).

Conclusions The method is simple, sensitive and reproducible, and is suitable for the qualitative and quantitative determination of organic acids in fruit wine.

KEY WORDS: fruit wine; organic acids; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

有机酸是一类含有羧基、磺酸基及亚磺酸基等基团的酸性有机化合物(不包括氨基酸), 广泛存在于各种果酒中, 种类繁多。有机酸有助于增加食品的口感特性和健康特性, 对食品的品质控制起到重要作用^[1-2]。近年来提倡低度酒代替高度酒, 饮用果酒已逐渐成为一种趋势。有机酸是果酒中主要的呈味物质之一, 果酒的风味是衡量果酒品质的一个重要指标, 果酒中有机酸对果酒的口感、风味、观感和品质有重要的影响。有机酸可加速多糖的转化和果胶物质的分解, 促进果酒的老熟和澄清, 有机酸含量过高会使酒口感生涩, 过低会使酒平淡乏味。因此果酒中有机酸含量的测定及分析对果酒的研究具有重要意义^[3-6]。

目前有机酸的检测方法有很多, 比如离子色谱法^[7-9]、离子色谱质谱法^[10]、气相色谱法、气相色谱质谱法^[11]、高效液相色谱法^[12-16]、高效液相色谱-质谱法^[17-19]、毛细管电泳法^[20-21], 其中气相色谱法需要进行衍生化, 衍生化试剂毒性危险性较高, 操作烦琐, 重现性较差; 液相色谱法和离子色谱法, 其中多种有机酸会出现共洗脱现象, 不能达到良好分离效果, 易受基质干扰导致定性定量不准确; 毛细管电泳法实验成本低, 检测快速, 但其重现性不稳定, 精密度和灵敏度较差^[22]。超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)具有基质干扰少, 方法灵敏度高的特点, 综合运用保留时间、母离子、子离子和多反应监测模式确保目标分析物定性及定量结果的准确, 是目前公认的高效检测技术。

酒石酸、苹果酸、柠檬酸等主要源于果实, 乳酸、琥珀酸、丙酮酸等主要源于酒精发酵, 果酒中有机酸的含量对于果酒的风味、稳定性、品质等方面有着很大的影响, 所以果酒中有机酸的含量检测十分必要。现有的方法多采用高效液相色谱法测定果酒中酒石酸、苹果酸、莽草酸、乳酸、柠檬酸和琥珀酸等几种物质^[23], 丙酮酸、 α -酮戊二酸、丙二酸、苯甲酸、水杨酸等在果酒中含量很低, 杂质干扰较多, 在果酒中几乎很少检出这几种物质, 检测难度较大。穆瑛琦等^[10]采用离子色谱-串联质谱法对酒类产品中 10 种有机酸进行测定, 该方法单针分析需 35 min, 检测时间较长, 且未有莽草酸、丙酮酸、 α -酮戊二酸、丙二酸、己二酸、苯甲酸、水杨酸等有机酸的检测方法。因此, 本研究建立了基于全自动固相萃取-UPLC-MS/MS 测定果酒

中 14 种有机酸含量的分析方法, 同时准确测定果酒中酒石酸、苹果酸、柠檬酸、丙二酸、己二酸、奎宁酸、水杨酸、 α -酮戊二酸、莽草酸、丙酮酸、苯甲酸、富马酸、乳酸、琥珀酸 14 种有机酸, 为果酒中有机酸的测定提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

甲醇、乙腈、甲酸[色谱纯, 霍尼韦尔贸易(上海)有限公司]; 氨水(分析纯, 南京化学试剂股份有限公司)。

苹果酸(纯度 99.0%)、柠檬酸(纯度 98.0%)、丙二酸(纯度 97.2%)、己二酸(纯度 99.0%)、奎宁酸(纯度 98.0%)、水杨酸(纯度 99.8%)、 α -酮戊二酸(纯度 95.7%)(天津阿尔塔科技有限公司); 莽草酸(纯度 98.8%)、丙酮酸(纯度 98.5%)、苯甲酸(纯度 99.9%)(北京坛墨质检科技有限公司); 富马酸(纯度 99.6%)、琥珀酸(纯度 99.0%)[曼哈格(上海)生物科技有限公司]; 乳酸(纯度 98.0%)、酒石酸(纯度 98.0%)(上海诗丹德标准技术服务有限公司)。

1.2 仪器与设备

TRIPLE QUARD5500 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); S220-Bio-CN pH 计、XSR204 电子分析天平(精度 0.1 mg)(瑞士梅特勒-托利多公司); N-EVAP 氮吹仪(美国 Organomation 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); Waters Osis MAX 固相萃取柱(3 cc/60 mg)(美国 Waters 公司); Cleanert SAX 固相萃取柱(3 cc/60 mg)(天津博纳艾杰尔科技有限公司); CNWBOND 有机酸专用固相萃取柱(3 cc/60 mg)(上海安谱实验科技股份有限公司); Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈ 柱(150.0 mm×3.0 mm, 1.8 μ m)(美国 Agilent 公司); Waters BEH C₁₈ 柱(100.0 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)、Waters Torus™ DEA 柱(100.0 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)(美国 Waters 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

分别称取己二酸, 富马酸, 水杨酸, 苯甲酸标准品各 100 mg, 甲醇定容至 10 mL, 配制得 10.0 mg/mL 的标准储备液; 分别称取酒石酸、苹果酸, 柠檬酸、丙二酸、奎宁酸、 α -酮戊二酸、莽草酸、丙酮酸、乳酸、琥珀酸标准品各 100 mg, 水定容至 10 mL, 配制得 10.0 mg/mL 的标准储备液。

标准中间液: 分别移取苯甲酸标准储备液 2.0 mL、 α -酮戊二酸标准储备液 3.0 mL、水杨酸标准储备液 0.1 mL、苹果酸标准储备液 1.0 mL、酒石酸标准储备液 1.0 mL、柠檬酸标准储备液 1.0 mL、丙二酸标准储备液 1.0 mL、奎宁酸标准储备液 1.0 mL、莽草酸标准储备液 1.0 mL、丙酮酸标准储备液 1.0 mL、乳酸标准储备液 1.0 mL、琥珀酸标准储备液 1.0 mL、己二酸标准储备液 1.0 mL、富马酸标准储备液 1.0 mL 于 20 mL 容量瓶中, 水稀释并定容至刻度, 配制得 14 种有机酸混合标准中间溶液(500 μ g/mL)。

标准工作液: 用 0.4% 甲酸水将标准中间液逐级稀释成不同浓度的系列标准工作液。

1.3.2 样品前处理

准确移取果汁 1.0 mL, 加水稀释至 20 mL, 加氨水调 pH 至 9~10, 加水定容至 50 mL, 得样液; 设置全自动固相萃取仪(程序设置见表 1), 依次用 5 mL 甲醇, 5 mL 水活化 MAX 固相萃取柱。准确吸取 3 mL 样液上样, 5 mL 水, 5 mL 甲醇淋洗固相萃取柱, 弃去流出液, 6 mL 10% 甲酸甲醇水洗脱, 收集洗脱液于 40°C 水浴中氮气吹至近干, 0.4% 甲酸水复溶并定容至 3.0 mL, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 取滤液用于 UPLC-MS/MS 分析。(酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、奎宁酸, 琥珀酸测定样液稀释 20 倍后进样, 己二酸、莽草酸、富马酸、水杨酸、丙酮酸、 α -酮戊二酸、丙二酸、苯甲酸测定样液直接进样)。

1.4 仪器工作条件

1.4.1 液相色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus RRHD C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.8 μ m); 色谱柱温度为 35°C; 流速为 0.5 mL/min; 进样量为 10 μ L; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为含有 0.4% 甲酸水; 梯度洗脱: 0~4.0 min, 100% B; 4.0~10.0 min, 100%~40% B; 10.0~12.0 min, 40% B; 12.1~15.0 min, 100% B。

1.4.2 质谱条件

电喷雾离子源: 负离子扫描, 结合动态多反应监测模式, 离子化电压: -4500 V; 气帘气: 275.80 kPa (40 psi); 碰撞气: 62.05 kPa (9 psi); 雾化气: 379.22 kPa (55 psi); 离子源温度: 550°C; 14 种有机酸的保留时间、母离子、子离子及质谱参数见表 2。

表 1 全自动固相萃取净化程序

Table 1 Automated solid phase extraction purification procedure

程序编号	程序	溶剂	流速/(mL/min)	体积/mL
1	活化	甲醇	2	5
2	活化	水	2	5
3	加样	—	2	3
4	淋洗	水	2	5
5	淋洗	甲醇	2	5
6	空气清洗	—	5	5
7	洗脱液	10% 甲酸甲醇水	2	6

注: —表示文中无此项。

表 2 14 种有机酸的质谱参数

Table 2 Mass spectrum parameters of 14 organic acids

物质名称	保留时间/min	母离子/(Q ₁ , m/z)	碎片离子(Q ₃ , m/z)	去簇电压/V	碰撞电压/V
酒石酸	1.50	149.1	87.1*	-40	-15
			73.0	-40	-15
苹果酸	1.92	133.2	115*	-40	-15
			71.2	-40	-15
乳酸	2.44	89.2	43.1*	-40	-15
			45.1	-40	-15
柠檬酸	3.52	191.1	111.1*	-40	-18
			87.1	-40	-18
莽草酸	2.06	172.9	92.9*	-63	-18
			73.0	-65	-17
己二酸	7.71	144.9	81.2*	-60	-25
			100.9	-100	-21
奎宁酸	1.58	192.0	85.0*	-70	-26
			94.0	-70	-26
富马酸	3.91	114.9	70.9*	-34	-12
			32.1	-100	-21

表 2(续)

物质名称	保留时间/min	母离子/(Q ₁ , m/z)	碎片离子(Q ₃ , m/z)	去簇电压/V	碰撞电压/V
琥珀酸	4.27	117.0	73.0*	-25	-15
			99.0	-25	-15
水杨酸	10.09	137.0	92.9*	-51	-30
			65.1	-100	-39
丙酮酸	1.88	87.0	32.1	-50	-12
			43.1*	-50	-12
α -酮戊二酸	2.51	144.9	72.9*	-27	-16
			101.1	-90	-18
丙二酸	2.09	102.9	58.9*	-24	-11
			40.9	-60	-35
苯甲酸	9.77	121.9	78.1*	-70	-16
			77.1	-70	-17

注: *为定量离子对。

1.5 数据处理

实验数据重复 3 次测定, 结果使用 Origin 2021 制作图表。

2 结果与分析

2.1 仪器方法优化

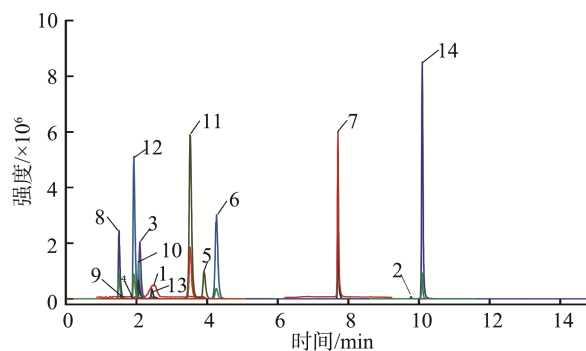
2.1.1 色谱柱的选择

反相 C₁₈ 色谱柱是目前有机酸分析常用的色谱柱, 分离高效、选择性好、稳定性强^[17-19,24-26]。为实现 14 种有机酸的分离, 分别考察了 Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈ (150.0 mm×3.0 mm, 1.8 μ m)、Waters BEH C₁₈ (100.0 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) 和 Waters Torus™ DEA (100.0 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) 3 种色谱柱对 14 种有机酸的分离效果。结果表明 Waters Torus™ DEA 色谱柱出峰时间太早, 所有物质均在 1 min 左右出峰; Waters BEH C₁₈ 色谱柱出峰时间较快, 丙酮酸、 α -酮戊二酸、丙二酸、苹果酸、乳酸未能实现很好分离, 且峰形不对称略有拖尾; Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈ 色谱柱能够有效的将 14 种有机酸进行分离, 且各个物质在 11 min 内均可出峰; 因此选择色谱柱 Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈ (150.0 mm×3.0 mm, 1.8 μ m) 进行分离测定。

2.1.2 流动相的选择

14 种目标有机酸均为弱酸, 易发生酸电离, 但离子态的有机酸在色谱柱上保留较弱, 因此需要在流动相中加入酸, 降低流动相 pH 促进有机酸向分子形式转换, 增加其在色谱柱上的保留^[16,25,27]。本研究考察了 0.1% 甲酸水, 0.4% 甲酸水, 0.8% 甲酸水为流动相, 结果发现 0.4% 甲酸为流动相时各物质响应最高、0.8% 甲酸水为流动相时响应降低,

在 0.4% 甲酸水中加入 5 mmol/L 甲酸铵后各物质峰形略有改善但响应值低, 故选择 0.4% 甲酸水为本研究流动相。分别考察了甲醇-0.4% 甲酸水和乙腈-0.4% 甲酸水, 结果发现由于甲醇的黏度较大导致柱压较高, 容易发生漏液, 易损坏色谱柱和相关仪器, 乙腈-0.4% 甲酸水对 14 种有机酸的分离度、峰形和响应性较好, 因此选择乙腈-0.4% 甲酸水为本研究流动相。14 种有机酸的总离子流色谱图见图 1。



注: 1. α -酮戊二酸; 2. 苯甲酸; 3. 丙二酸; 4. 丙酮酸; 5. 富马酸; 6. 琥珀酸; 7. 己二酸; 8. 酒石酸; 9. 奎宁酸; 10. 莽草酸; 11. 柠檬酸; 12. 苹果酸; 13. 乳酸; 14. 水杨酸。

图1 14种有机酸的总离子流色谱图

Fig.1 Total ion current chromatogram of 14 kinds of organic acids

2.1.3 流速的选择

本研究比较了 0.4、0.5、0.6 mL/min 3 种流速下目标化合物的出峰时间、峰形、仪器压力影响情况。结果表明: 当流速为 0.4 mL/min 时丙酮酸、 α -酮戊二酸峰较宽, 峰形较差, 苹果酸略有拖尾, 水杨酸出峰时间较晚未能在 15 min 内出峰, 见图 2; 当流速为 0.6 mL/min 时仪器压力较高; 而在

流速为 0.5 mL/min 时, 仪器压力以及出峰时间都比较合适, 最终选择流速为 0.5 mL/min。

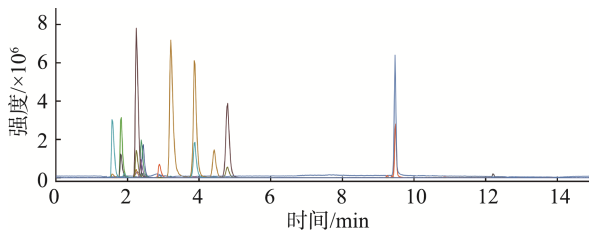


图2 流速为0.4 mL/min的总离子流色谱图

Fig.2 Total ion current chromatogram with a flow rate of 0.4 mL/min

2.2 提取条件的优化

2.2.1 固相萃取柱的优化

果酒中常存在大量的色素、多酚类、糖类等化合物, 均有可能对有机酸的检测造成干扰^[28-29]。Waters Oasis MAX 固相萃取柱是反相和强阴离子交换复合模式聚合物吸附柱, 能较好地吸附色素等杂质^[30]; Cleanert SAX 固相萃取柱是以硅胶为基质的强阴离子交换萃取柱, 键合有季胺盐官能团, 对阴离子有很强的亲和力, 适用于弱酸的提取; CNWBOND 有机酸专用固相萃取柱是针对 GB 5009.157—2016《食品安全国家标准 食品有机酸的测定》开发的专用小柱。本研究考察了 Waters Oasis MAX 固相萃

取柱、Cleanert SAX 固相萃取柱和 CNWBOND 有机酸专用固相萃取柱对含量为 1000 ng/mL 的待测样品中 14 种有机酸的回收率的影响。实验结果如图 3, Cleanert SAX 固相萃取柱对莽草酸的回收较差, CNWBOND 有机酸专用固相萃取柱对水杨酸和苯甲酸的回收率较差, 而 Waters Oasis MAX 固相萃取柱对 14 种有机酸回收率为 85.1%~110.5%, 最终选择 Waters Oasis MAX 固相萃取柱为本研究的净化柱。

2.2.2 pH 的选择

固相萃取柱上柱前样液 pH 的比较, 实验考察含量为 1000 ng/mL 待测样品溶液的 pH 为 6、8、9、10、11 时各物质的回收率。环境体系的 pH 比目标化合物的 pKa 至少大于 2 时, 才能保证弱酸性化合物解离。结果发现 pH 为 6、8、9、10 时, pH 对各物质的回收率影响不是很大, 但在 pH 为 11 时, 奎宁酸、水杨酸和莽草酸的回收率下降较多, 且在 pH 达到 9~10 时, 固相萃取柱去除色素的效果较好, 因此选择 pH 9~10 为上柱前样液的 pH, 比较结果见图 4。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围、检出限及定量限

将 14 种有机酸系列标准工作液, 按照 1.4 色谱质谱条件进行测定。以 14 种有机酸的质量浓度作为横坐标(X), 以待测物的峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 见表 2。结果表明, 14 种有机酸在考察的质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.991。分别以 3 倍和 10 倍信噪比

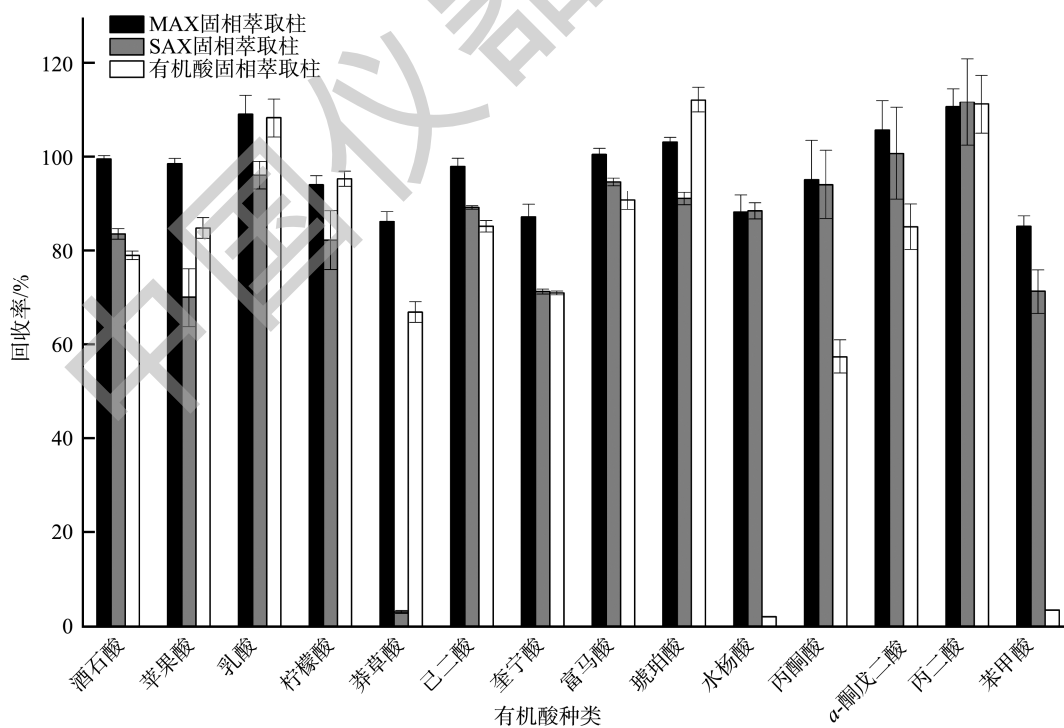


图3 固相萃取柱对14种有机酸回收率的影响

Fig.3 Effects of SPE cartridges on the recoveries of 14 kinds of organic acids

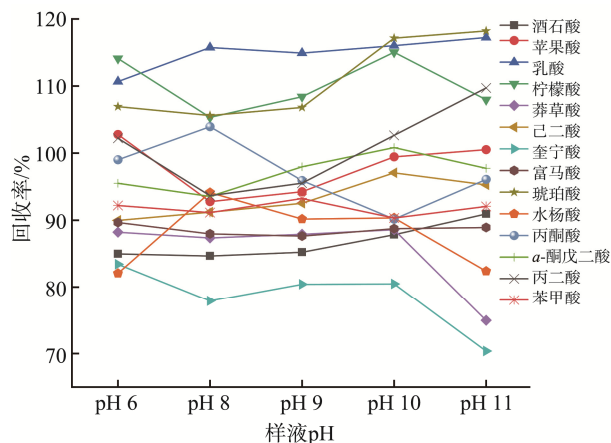


图4 样液pH对14种有机酸回收率的影响

Fig.4 Effects of value of sample solution on the recoveries of 14 kinds of organic acids

(S/M)确定方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ), 结果表明 14 种有机酸的 LOD 为 0.7~50.0 μg/L, LOQ 为 2.0~150.0 μg/L, 满足实验要求, 结果见表 3。

2.3.2 回收率及精密度试验

在蓝莓酒和荔枝酒加入低、中、高 3 个添加水平的适

量混合标准溶液, 每个水平进行 6 次平行试验, 结果见表 4。低、中、高 3 个添加水平的方法回收率为 82.6%~117.1%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSD)为 0.6%~8.7%。结果表明该方法的准确度和精密度良好, 适用于果酒中 14 种有机酸的测定。

2.3.3 稳定性

蓝莓酒和荔枝酒加入中浓度适量标准溶液, 按照 1.3.2 制备供试品溶液, 分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 进行测定。结果表明各物质在 24 h 内稳定, 蓝莓酒加标样进样峰面积 RSD ≤ 5.2%, 荔枝酒加标样进样峰面积 RSD ≤ 5.5%。

2.4 实际样品的检测

采用所建立的方法对购买的蓝莓酒、荔枝酒、猕猴桃酒、杨梅酒、葡萄酒等进行测定, 测得样品中有机酸的含量见表 5。结果表明, 蓝莓酒、荔枝酒、杨梅酒的主要有机酸均为柠檬酸, 其含量在 1662.7~4141.4 mg/L 之间。蓝莓酒和葡萄酒含有丰富的酒石酸, 含量分别为 1600.6 mg/L 和 1100.5 mg/L, 猕猴桃酒中乳酸和柠檬酸含量较高, 分别为 2708.5 mg/L 和 2240.1 mg/L。

表 3 14 种有机酸的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 3 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (r^2), LODs and LOQs of 14 kinds of organic acids

有机酸	线性范围 (ng/mL)	线性方程	r^2	LODs (μg/L)	LOQs (μg/L)
酒石酸	50~3000	$Y=4029.36870X+3.58912e4$	0.99947	2.0	6.0
苹果酸	50~3000	$Y=9755.53535X+4.61603e4$	0.99924	2.0	6.0
乳酸	50~6000	$Y=1331.68972X+8.88611e4$	0.99147	5.0	15.0
柠檬酸	50~5000	$Y=12690.91581X+6.48473e5$	0.99758	1.0	3.0
莽草酸	50~3000	$Y=2384.59455X+4.17797e5$	0.99270	1.0	3.0
己二酸	50~3000	$Y=3000.14242X+1.35255e5$	0.99628	10.0	30.0
奎宁酸	50~3000	$Y=238.16788X+8280.12694$	0.99349	2.0	6.0
富马酸	50~3000	$Y=2493.64100X+3.05667e4$	0.99841	10.0	30.0
琥珀酸	50~3000	$Y=8043.01087X+7.87698e4$	0.99900	3.0	9.0
水杨酸	2.5~150.0	$Y=1.14703e5X+3.22491e5$	0.99825	0.7	2.0
丙酮酸	50~3000	$Y=129.83118X+1561.15675$	0.99685	10.0	30.0
α-酮戊二酸	150~9000	$Y=130.21996X+2717.57083$	0.99910	50.0	150.0
丙二酸	50~3000	$Y=4224.82012X+5.27004e4$	0.99852	1.5	4.5
苯甲酸	100~6000	$Y=47.10105X+990.93748$	0.99983	33.0	100.0

表 4 14 种有机酸在不同添加水平下的回收率和相对标准偏差(n=6)

Table 4 Recoveries and relative standard deviations of the 14 kinds of organic acids at different spiked levels (n=6)

有机酸	蓝莓酒			荔枝酒		
	加标水平 (g/L)	回收率/%	RSDs/%	加标水平/(g/L)	回收率/%	RSDs/%
酒石酸	0.40	105.4	2.0	0.10	108.0	8.4
	0.80	95.7	6.1	0.20	101.7	6.4
	1.20	97.2	4.8	0.40	98.3	2.5
苹果酸	0.10	106.7	4.6	0.10	117.1	6.9
	0.20	109.3	3.3	0.20	105.8	4.3
	0.40	108.0	3.2	0.40	101.4	6.8

表 4(续)

有机酸	蓝莓酒			荔枝酒		
	加标水平/(g/L)	回收率/%	RSDs/%	加标水平/(g/L)	回收率/%	RSDs/%
乳酸	0.25	98.5	6.8	0.25	105.6	8.3
	0.50	103.5	3.5	0.50	89.2	8.7
	0.75	96.3	3.8	0.75	101.4	6.8
柠檬酸	0.40	96.3	7.9	0.40	100.3	7.0
	0.80	98.5	5.0	0.80	89.2	8.7
	1.20	103.2	5.4	1.20	88.5	3.5
莽草酸	0.10	115.7	4.4	0.10	100.8	8.3
	0.20	113.9	2.6	0.20	113.2	3.6
	0.40	86.1	2.0	0.40	84.0	2.7
己二酸	0.10	103.8	3.0	0.10	107.7	3.4
	0.20	113.6	1.4	0.20	99.0	0.9
	0.40	112.7	1.8	0.40	110.6	1.1
奎宁酸	0.10	87.5	6.1	0.10	83.9	8.5
	0.20	107.6	2.6	0.20	102.9	4.1
	0.40	96.7	2.7	0.40	109.1	4.6
富马酸	0.10	114.5	2.8	0.10	106.1	2.6
	0.20	114.3	2.2	0.20	106.8	2.2
	0.40	103.5	0.9	0.40	101.1	1.5
琥珀酸	0.10	101.2	6.7	0.10	91.9	6.4
	0.20	113.3	3.0	0.20	102.0	3.7
	0.40	91.4	5.0	0.40	114.3	1.1
水杨酸	0.01	83.0	1.6	0.01	86.7	3.8
	0.02	91.7	0.8	0.02	92.1	1.8
	0.04	92.2	1.2	0.04	85.3	3.5
丙酮酸	0.10	101.0	5.4	0.10	86.0	2.4
	0.20	98.9	4.7	0.20	88.4	6.1
	0.40	86.9	3.5	0.40	101.5	0.6
α -酮戊二酸	0.30	93.3	6.1	0.30	92.8	3.8
	0.60	98.0	5.4	0.60	82.6	3.4
	1.20	86.9	3.5	1.20	92.0	3.9
丙二酸	0.10	115.3	5.3	0.10	110.3	6.1
	0.20	115.1	1.4	0.20	108.3	5.4
	0.40	112.3	3.5	0.40	104.7	2.3
苯甲酸	0.20	108.4	6.2	0.20	105.1	5.8
	0.40	103.1	1.7	0.40	99.8	2.4
	0.80	98.9	4.6	0.80	93.6	2.1

表 5 果酒样品中 14 种有机酸含量(mg/L)

Table 5 Content of the 14 kinds of organic acids in fruit wine samples (mg/L)

有机酸	蓝莓酒	猕猴桃酒	荔枝酒	杨梅酒	葡萄酒
酒石酸	1600.6	309.0	ND	ND	1100.5
苹果酸	104.7	159.7	624.5	133.6	136.3
乳酸	1092.2	2708.5	103.4	66.3	1985.8
柠檬酸	1662.7	2240.1	1946.8	4141.4	13.6
莽草酸	4.6	52.0	6.3	ND	34.9
己二酸	ND	ND	ND	ND	ND
奎宁酸	66.1	521.1	19.0	13.6	ND
富马酸	ND	ND	0.5	ND	ND
琥珀酸	363.5	82.5	118.3	12.5	612.9
水杨酸	0.4	ND	0.2	0.1	0.4
丙酮酸	1.2	4.5	2.3	4.0	0.0
α -酮戊二酸	15.4	2.9	2.7	1.0	10.6
丙二酸	6.6	5.4	5.9	1.6	5.3
苯甲酸	0.3	0.0	0.1	0.2	0.2

注: ND 表示未检出。

3 结 论

本研究建立了基于全自动固相萃取-UPLC-MS/MS 测定果酒中 14 种有机酸含量的方法, 并对蓝莓酒、荔枝酒、猕猴桃酒、杨梅酒、葡萄酒等果酒样品进行分析检测, 仅需 15 min 内即可完成上机, 与离子色谱法^[7]和高效液相色谱法^[15]相比大大缩短了进样时间。相较于离子色谱法^[7]的共流出、多种有机酸难以分离现象以及高效液相色谱法^[15]有机酸紫外吸收不明显, 光谱图难以确证等存在的问题, 本研究抗干扰能力强, 有效去除了果酒中干扰物质色素、糖类等物质, 增加了检测灵敏度, 实现了 14 种有机酸的分离及定性定量检测, 大大缩短了有机酸的分析检测时间, 提高了检测的效率和准确度, 同时本研究采用全自动固相萃取仪进行前处理, 降低了检验人员操作带来的误差。本研究的灵敏度、稳定性及重复性好, 适用于果酒种 14 种有机酸的准确测定, 为果酒生产加工和风味控制提供必要的技术支持。希望在此研究的基础上通过后续的研究开展, 扩大应用范围, 囊括更多种类的有机酸, 多方向扩展, 将方法应用于更多食品基质的检测, 降低检验成本, 提高检验效率。

参考文献

- [1] COELHO EM, SILVA-PADILHA CVD, MISKINIS GA, *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil [J]. *J Food Compos Anal*, 2018, 66: 160–167.
- [2] COELHO EM, SILVA-HAAS ICD, AZEVEDO LCD, *et al.* Multivariate chemometric analysis for the evaluation of 22 *Citrus* fruits growing in Brazil's semi-arid region [J]. *J Food Compos Anal*, 2021, 101: 103964.
- [3] WANG GN, SONG XB, ZHU L, *et al.* A flavoromics strategy for the differentiation of different types of Baijiu according to the non-volatile organic acids [J]. *Food Chem*, 2022, 374: 131641.
- [4] PINHEIRO KMP, DUARTE LM, DUARTE-JUNIOR GF, *et al.* Chip-based separation of organic and inorganic anions and multivariate analysis of wines according to grape varieties [J]. *Talanta*, 2021, 231: 122381.
- [5] 曹颖, 耿瑶, 韩乃瑄, 等. 果酒中的有机酸及降酸策略研究[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(14): 457–464.
CAO Y, GENG Y, HAN NX, *et al.* Research on organic acids in fruit wine and acid reduction strategies [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2023, 44(14): 457–464.
- [6] 董法宝, 李声威, 刘元昊, 等. 火龙果香蕉刺梨复合果酒酿造工艺优化及其风味品质分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(14): 155–165.
DONG FB, LI SW, LIU YH, *et al.* Brewing process optimization and flavor quality analysis of *Hylocereus polyrhizus*, *Musa nana* and *Rosa roxburghii* compound fruit wine [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(14): 155–165.
- [7] 龙四红, 陈谢花, 李红洲, 等. 离子色谱法测定酸汤中 13 种有机酸的分析方法[J]. *食品科技*, 2022, 47(8): 256–263.
LONG SH, CHEN XH, LI HZ, *et al.* Determination of 13 organic acids in sour soup by ion chromatography [J]. *Food Sci Technol*, 2022, 47(8): 256–263.
- [8] 夏雪琴, 罗钰颖, 吕尚, 等. 离子色谱法同时测定乌梅中 4 种有机酸的含量[J]. *江西中医药大学报*, 2022, 34(3): 68–72.
XIA XQ, LUO YY, LV S, *et al.* Determination of 4 organic acids in fructus mume by ion chromatography [J]. *Jiangxi Univ Chin Med*, 2022, 34(3): 68–72.
- [9] UZHEL AS, BORODINA AN, GORBOVSKAYA AV, *et al.* Determination of full organic acid profiles in fruit juices and alcoholic beverages using novel chemically derivatized hyperbranched anion exchanger [J]. *J Food Compos Anal*, 2021, 95: 103674.
- [10] 穆瑛琦, 吴奕萱, 王逍, 等. 离子色谱-串联质谱法检测酒类产品中 10 种有机酸[J]. *色谱*, 2022, 40(12): 1128–1135.
MU YQ, WU YX, WANG X, *et al.* Determination of 10 organic acids in alcoholic products by ion chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2022, 40(12): 1128–1135.
- [11] MUTYAM S, CHILAKALA S, TALLAPALLY M, *et al.* Gas chromatography-mass spectrometric determination of organic acids in fruit juices by multiwalled carbon nanotube-based ion-pair dispersive solid-phase extraction and in situ butylation [J]. *Commun Mass Spectrom*, 2021, 35(19): e9165.
- [12] KOZAKI D, YAMAMOTO A, TANIHATA S, *et al.* Development of a size-exclusion/ion-exclusion/reversed-phase separation method for the simultaneous determination of inorganic and organic acids, sugars, and ethanol during multiple parallel fermentation of rice wine [J]. *Food Anal Methods*, 2021, 14: 290–299.
- [13] HUANG J, WANG Y, REN Y, *et al.* Effect of inoculation method on the quality and nutritional characteristics of low-alcohol kiwi wine [J]. *LWT*, 2022, 156: 113049.
- [14] RESTUCCIA D, SPIZZIRRI UG, PUOCI F, *et al.* LC with evaporative light-scattering detection for quantitative analysis of organic acids in juices [J]. *Food Anal Methods*, 2017, 10: 704–712.
- [15] SEDDIQ N, ASAN A. One-step pre-column derivatization method for HPLC-UV determination of organic acids in fruit juices [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2023, 46(11–15): 192–199.
- [16] QIAN Z, HUANG D, HE Z, *et al.* Rapid determination of three organic acids in polygonum vivipari rhizoma via one marker by HPLC-UV at equal absorption wavelength and effervescence-assisted matrix solid-phase dispersion [J]. *Int J Anal Chem*, 2023, 5546053: 10.
- [17] 战楠, 孙青, 郝瑞霞, 等. 在线固相萃取-高效液相色谱-高分辨质谱法测定植物中 11 种水溶性有机酸[J]. *食品科学*, 2023, 44(4): 256–264.
ZHAN N, SUN Q, HAO RX, *et al.* Determination of 11 water-soluble organic acids in plants by online solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2023, 44(4): 256–264.
- [18] SANDÍN-ESPAÑA P, MATEO-MIRANDA M, LÓPEZ-GOTI C, *et al.* Development of a rapid and direct method for the determination of organic acids in peach fruit using LC-ESI-MS [J]. *Food Chem*, 2016, 192: 268–273.
- [19] SUTO M, KAWASHIMA H, NAKAMURA Y. Determination of organic acids in honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J].

- Food Anal Methods, 2020, 13: 2249–2257.
- [20] IVANOVA-PETROPULOS V, NACEVA Z, SÁNDOR V, *et al.* Fast determination of lactic, succinic, malic, tartaric, shikimic, and citric acids in red Vranec wines by CZE-ESI-QTOF-MS [J]. Electrophoresis, 2018, 39(13): 1597–1605.
- [21] ZERAVIK J, FOHLEROVA Z, MILOVANOVIC M, *et al.* Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines [J]. Food Chem, 2016, 194: 432–440.
- [22] 王清萍. 毛细管电泳在茶叶有效成分分离检测中的应用[D]. 福州: 福州大学, 2010.
WANG QP. Application of capillary electrophoresis for determination of active components in tea samples [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2010.
- [23] IVANOVA-PETROPULOS V, PETRUŠEVA D, MITREV S. Rapid and simple method for determination of target organic acids in wine using HPLC-DAD analysis [J]. Food Anal Methods, 2020, 13: 1078–1087.
- [24] 刘露, 吴文睿, 方颂平, 等. UPLC-QTOF-MS 法检测白酒中 9 种有机酸[J]. 安徽科技学院学报, 2021, 35(2): 81–85.
LIU L, WU WR, FANG SP, *et al.* Developed UPLC-QTPF-MS method to detect 9 organic acids in liquor [J]. J Anhui Sci Technol Univ, 2021, 35(2): 81–85.
- [25] 王思威, 刘艳萍, 王潇楠, 等. 基于高效液相色谱-三重四极杆串联质谱技术测定鲜荔枝果肉中 10 种有机酸含量[J]. 农药学报, 2019, 21(3): 359–365.
WANG SW, LIU YP, WANG XN, *et al.* Determination of ten organic acids content in fresh litchi based on high performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry technique [J]. Chin J Pestic Sci, 2019, 21(3): 359–365.
- [26] 陈山乔, 陈惠云, 孙志栋, 等. 水果中有机酸及小分子糖类成分液相色谱测定研究进展[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 298–309.
CHEN SQ, CHEN HY, SUN ZD, *et al.* Current development in analytical methods for organic acids, monosaccharides and oligosaccharides in fruits: A review [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(9): 298–309.
- [27] WIEDENBECK E, GEBAUER D, CÖLFEN H. Potentiometric titration method for the determination of solubility limits and pka values of weak organic acids in water [J]. Anal Chem, 2020, 92(14): 9511–9515.
- [28] 余松柏, 吴奇霄, 黄张君, 等. 基于 HPLC 结合多元统计方法分析不同种类酒中有机酸的差异[J]. 中国酿造, 2023, 42(2): 46–52.
YU SB, WU QX, HUANG ZJ, *et al.* Differential analysis of organic acids in different kinds of alcoholic beverage based on HPLC combined with multivariate statistical methods [J]. China Brew, 2023, 42(2): 46–52.
- [29] 梁艳玲, 陈麒, 伍彦华, 等. 果酒的研究与开发现状[J]. 中国酿造, 2020, 39(12): 5–9.
LIANG YL, CHEN Q, WU YH, *et al.* Research and development status of fruit wine [J]. China Brew, 2020, 39(12): 5–9.
- [30] 易华娟, 朱洁灵, 周瑞铮, 等. 全自动固相萃取结合 UPLC-MS/MS 测定茶叶中的草甘膦及其代谢物[J]. 茶叶科学, 2023, 43(6): 857–869.
YI HJ, ZHU JL, ZHOU RZ, *et al.* Determination of glyphosate and its metabolites in tea by automatic solid phase extraction combined with UPLC-MS/MS [J]. J Tea Sci, 2023, 43(6): 857–869.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)

作者简介



宗凌丽, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 495576667@qq.com