

使用ACQUITY UPLC H-Class PLUS和ACQUITY QDa质谱检测器分析各种饮料中的14种有机酸

Dimple D. Shah, Kerri M. Smith, Jinchua Yang, Peter Hancock

Waters Corporation

摘要

有机酸为天然存在的化合物，也常用于饮料、食品和饲料生产中。酸性添加剂可用作调节酸度的缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、增味剂和螯合剂¹。不同饮料的有机酸谱各不相同，这些有机酸有助于改善食品和饮料的感官特性，增加香味和口感。监测饮料中的有机酸对于质量控制检查、确保成分符合产品质量标准、口感一致以及评价果汁真伪和纯度非常有用。

单四极杆质谱检测器（例如ACQUITY QDa）与光学检测器（例如UV-Vis）相比具有诸多优势，包括选择性更高、检测限更低且能够采集样品组分的质谱信息。本应用纪要重点介绍了一种使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱分离14种有机酸的方法。分析采用ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统和ACQUITY QDa质谱检测器。ACQUITY QDa质谱检测器能够提高方法选择性，降低样品基质共流出对分析的影响，使目标有机酸的积分更容易、分析更准确。

我们评价和研究了该方法的保留性、峰形、稳定性和线性。该色谱柱使研究的所有分析物均表现出可接受的色谱保留。我们利用各种果汁、葡萄酒、功能饮料和运动饮料以及苏打水样品测试了该方法。与传统HPLC方法相比，ACQUITY Premier色谱柱联合ACQUITY UPLC-QDa系统使研究的有机酸表现出足够的保留时间、良好的分离度和更快的样品分析速度。

优势

- ACQUITY Premier CSH苯己基柱可减轻分析物与金属表面的相互作用，利用ACQUITY Premier CSH苯己基柱获得了优异的方法重现性

- 使用一种色谱方法即可分析14种有机酸，无需样品衍生化、离子对试剂或缓冲流动相
- ACQUITY QDa质谱检测器在单离子扫描(SIR)采集模式下可获得更高的选择性和灵敏度，从而减少来自共流出基质化合物的色谱干扰
- 使研究的有机酸获得可接受的保留性和色谱分离度
- 使用一种方法即可分析多种饮料样品，例如果汁、葡萄酒、功能饮料和苏打水
- 高效样品分析，每个样品的运行时间不到11 min

简介

有机酸可以天然存在，也可以作为酸味剂、调味剂或防腐剂添加到饮料中。有机酸可增加产品的香味、口感和特征风味，在饮料中发挥重要作用。不同产地和成熟阶段会影响不同种类水果中有机酸的含量和类型。有机酸的分析 and 定量是测定饮料中果汁百分比、检测果汁假冒伪劣品以及质量控制的有用检测方法。有机酸在加工和储存过程中不易发生变化，因此可以作为水果产品真伪鉴别的有用指标²。

有机酸是极性非常强的化合物，在传统的硅胶C₁₈反相柱上很难保留，因此难以分析。许多文献发布的方法建议使用离子色谱(IC)、毛细管电泳(CE)或滴定法来测定饮料中的有机酸。离子色谱法的分析时间往往较长且需要使用专门的仪器。传统HPLC方法使用反相C₁₈色谱柱保留和分离有机酸，通常使用UV-Vis或PDA进行检测。

由于有机酸的结构和特征相似，不同有机酸之间以及有机酸与基质组分之间实现基线分离变得非常重要，在使用传统方法（例如，UV或PDA检测器）分析时尤其如此。使用HPLC的一项挑战是某些有机酸会与分析流路（包括色谱柱）的表面相互作用，其检测结果和峰形可能因此受到影响。不同有机酸之间获得可接受的峰形、保留和分离可能具有挑战性，样品中存在共流出成分可能使有机酸的常规分析进一步复杂化。

本应用纪要介绍了各种饮料中14种有机酸的分析。采用ACQUITY Premier CSH苯己基柱分离这些分析物，并将ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统与ACQUITY QDa质谱检测器联用进行分析。ACQUITY Premier色谱柱采用的MaxPeak HPS技术可减少分析物与色谱流路相互作用，从而改善峰形和灵敏度。由于使用了ACQUITY QDa质谱检测器，因此有可能简化流动相组成，无需使用高mM浓度的缓冲液。ACQUITY QDa质谱检测器能够检测有机酸，并提供与UV或PDA检测器相比更高的灵敏度。

本研究评价了分析方法的若干性能标准，包括保留时间、分离度、灵敏度和线性。利用该方法测定各种果汁、葡萄酒、功能饮料和运动饮料、苏打水和能量增强剂中的有机酸。

实验

标准品制备

将14种有机酸标准品分别以10 mg/mL的浓度溶于MilliQ水中，制得储备液。混合各有机酸储备液并用MilliQ水稀释，制得浓度为600 µg/mL (ppm)的有机酸混合物。用MilliQ水连续稀释有机酸混合储备液，制得浓度范围为0.2~200 µg/mL的溶剂校准标样。

样品前处理

将橙汁、苹果汁、红酒、两种功能饮料、运动饮料和苏打水用MilliQ水稀释10倍。对于能量增强粉，称取9.1 g溶于119 mL MilliQ水中，并按照包装上的说明进行配制。将稀释后的能量增强剂用MilliQ水进一步稀释100倍和500倍。所有样品经水稀释后过滤。

UPLC质谱检测器

UPLC系统：	配备FTN样品管理器的ACQUITY UPLC H-Class PLUS
质谱检测器：	ACQUITY QDa
色谱柱：	ACQUITY Premier CSH苯己基柱, 1.7 µm, 2.1 × 100 mm (部件号：186009475)
软件：	Empower 3 CDS
流动相A：	0.1%甲酸水溶液 (LC-MS级)
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液 (LC-MS级)
进样体积：	5 µL
柱温：	50 °C

样品温度： 10 °C

运行时间： 11 min (包括平衡时间)

样品瓶： 沃特世全回收样品瓶，已去活 (部件号 : 186000385DV)

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	100	0	初始
0.5	0.4	100	0	6
3.5	0.4	75	25	6
3.6	0.4	5	95	6
4.6	0.4	5	95	6
4.7	0.4	1	99	6
7	0.4	1	99	6
7.1	0.4	100	0	6
11	0.4	100	0	6

质谱条件

MS仪器： ACQUITY QDa质谱检测器(Performance)

电离模式： 电喷雾

极性： 负离子模式

毛细管电压:	0.8 V
锥孔电压:	5.0 V
探头温度:	600 °C
SIR质量数:	见表2

有机酸	单一同位素质量数 (Da)	SIR质量数 [M-H] ⁻ (m/z)
乳酸	90.03	89
琥珀酸	118.03	117
戊二酸	132.04	131
奎宁酸	192.06	191
异柠檬酸	192.03	191
柠檬酸	192.03	191
富马酸	116.01	115
马来酸	116.01	115
抗坏血酸	176.03	175
己二酸	146.06	145
莽草酸	174.05	173
反式乌头酸	174.02	173
顺式乌头酸	174.02	173
酒石酸	150.02	149
苹果酸	134.02	133

表2.研究的14种有机酸和5种内标的单同位素和单离子扫描(SIR)质量数

使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱分析表2中列出的有机酸混标。梯度方法由简单的水和乙腈流动相组成，各流动相均含0.1%甲酸。使用ACQUITY QDa质谱检测器在负离子电喷雾电离(ESI)模式下检测研究的所有有机酸，以产生[M-H]⁻。所有有机酸的单离子扫描(SIR)质量数或分子离子质荷比(m/z)见表2。

结果与讨论

有机酸的色谱分析可能受到目标分析物与色谱流路金属表面相互作用的影响，这些相互作用可能导致峰拖尾增加和峰面积减小。通过钝化液相色谱系统和色谱柱尽量减少分析物与金属表面之间的相互作用有多种方法，但钝化方法非常耗时且需要使用额外溶剂，增加了方法设置所需的时间和成本。解决金属相互作用的另一种方法是在流动相中使用添加剂，但这些添加剂可能导致离子抑制或色谱变化，影响方法性能。沃特世开发出一种新型低吸附ACQUITY Premier系统和色谱柱，旨在减少金属敏感分析物相关的结果差异性，同时无需进行系统和色谱柱钝化等耗时的工作。柠檬酸是一种著名的螯合剂，可与金属结合。图1展示了柠檬酸(RT 1.54 min)在ACQUITY Premier UPLC系统和色谱柱上的色谱性能与标准UPLC系统和色谱柱上的色谱性能比较。从图中可以看到，使用ACQUITY Premier色谱柱和系统时的峰面积是标准系统的5倍，且峰形得到改善³。在常规UPLC系统上使用ACQUITY Premier色谱柱时，仍然可以观察到峰形和灵敏度改善。

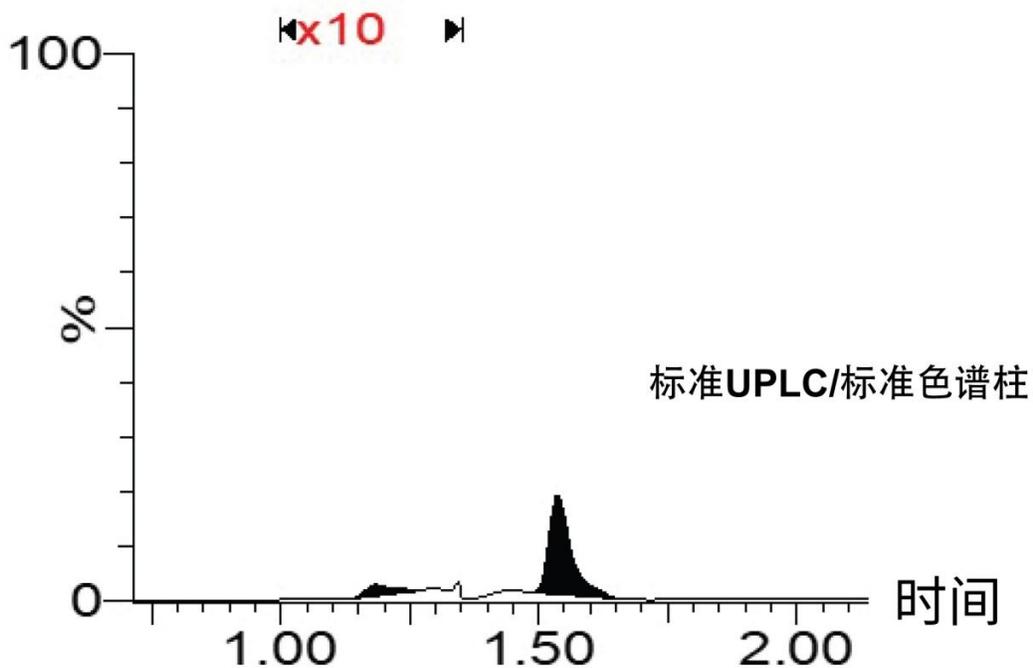
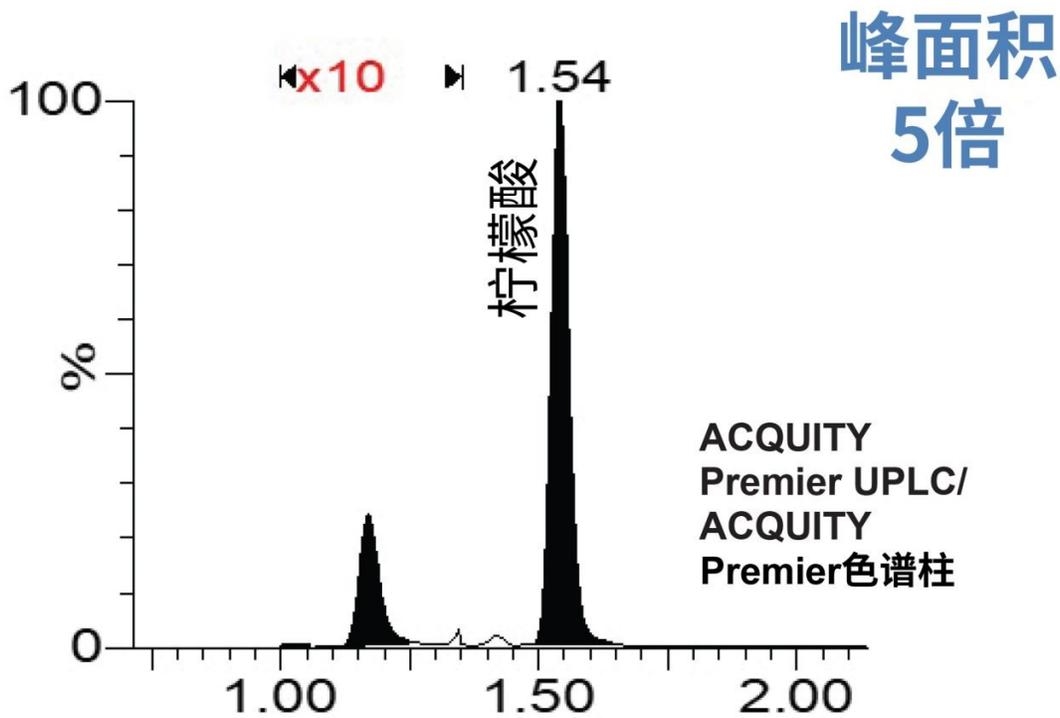


图1.使用

ACQUITY Premier系统和色谱柱与标准色谱柱和系统相比，柠檬酸峰面积得到改善（LC-MS数据）。

使所有14种有机酸实现基线分离并避免与饮料产品的其他成分共洗脱可能具有挑战性。使用ACQUITY QDa质谱检测器在SIR模式下获得了更高的选择性，可能不需要使所有分析物均获得基线分离。使用光学检测器（例如UV-Vis）的方法需要所有分析物均获得基线分离，并且可能发生共流出，由此给一致的积分带来挑战。

图2展示了采用UPLC-PDA方法生成的示例色谱图⁴。该方法需要使用缓冲流动相来检测有机酸。UPLC-PDA方法的检测需要使用缓冲流动相。对于PDA检测器而言，流动相缓冲液或添加剂与目标分析物之间的吸光度差异至关重要。有机酸的吸光度(210 nm)与甲酸相似，因此无法与流动相背景噪音区分，从而导致基线较高。因此，使用甲酸开发的LC-QDa方法不能用于UPLC-PDA检测。如UPLC-PDA方法所示(图2)，抗坏血酸与苹果酸共流出，马来酸与己二酸共流出。图3展示了ACQUITY QDa质谱检测器对14种有机酸的分离结果。

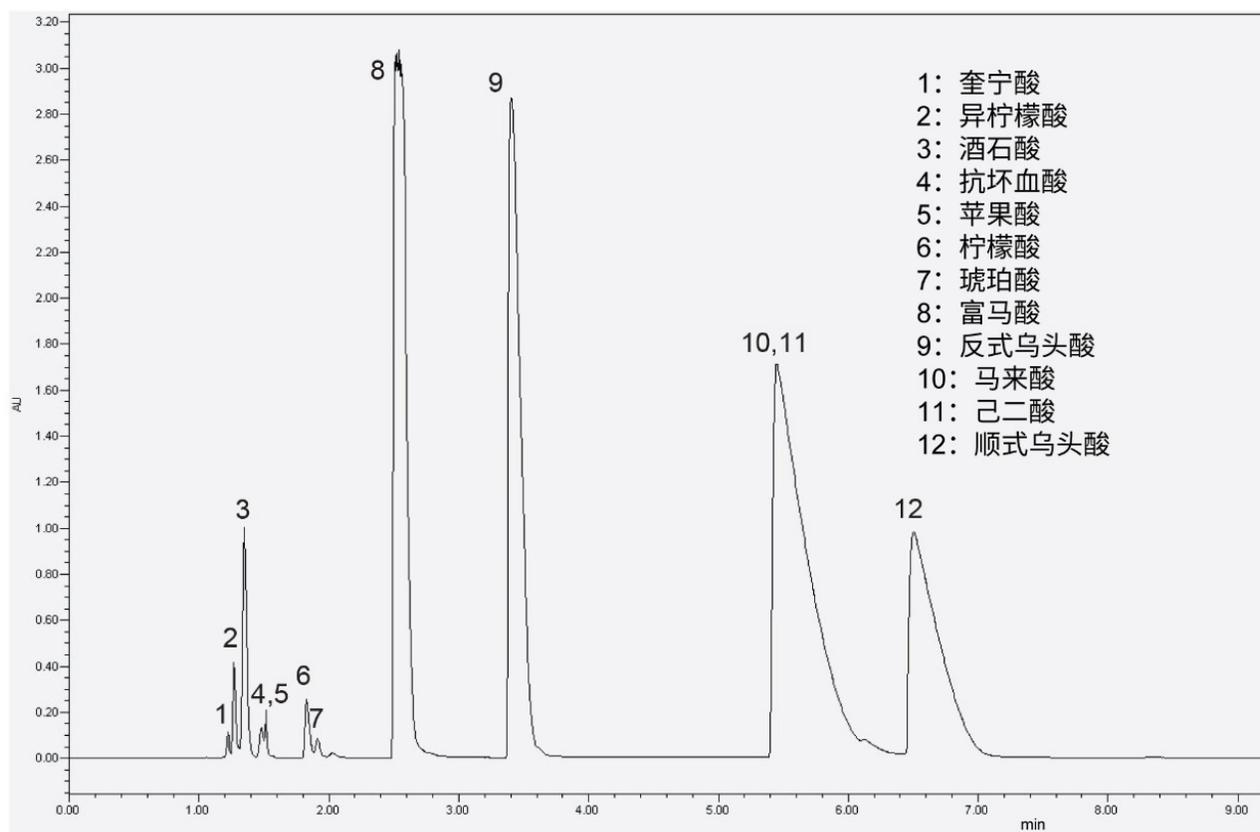


图2.使用UPLC-PDA检测器所得到的各种有机酸的示例色谱图

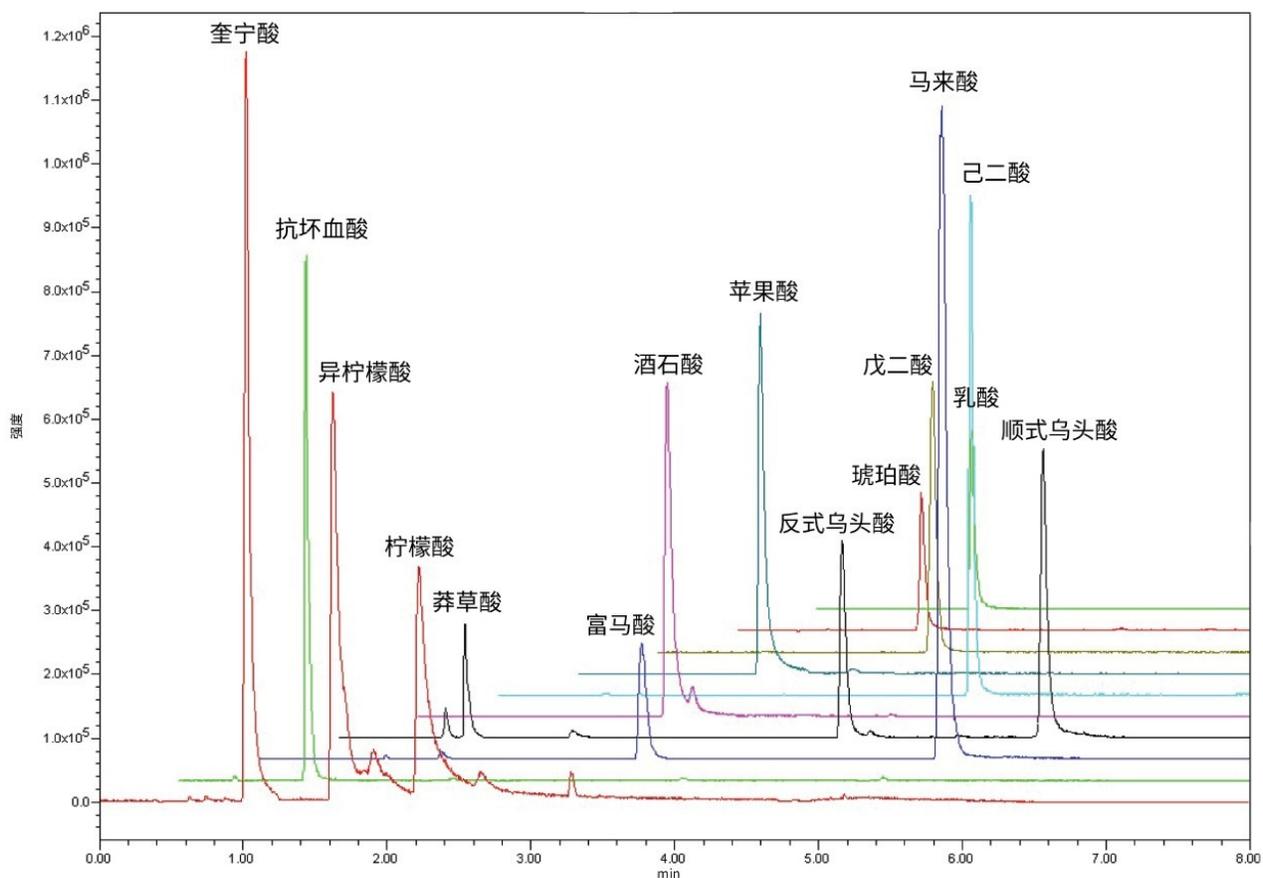


图3.使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱对浓度为6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm)的14种有机酸的色谱分离。每种化合物的色谱图均叠加在一幅带有时间轴偏移的图中。

虽然使用质谱检测与使用UV-Vis相比的确提供了更高的特异性，但仍然需要获得一些关键的基线分离。这些有机酸的一些分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 具有相似的质荷比(m/z)。例如，奎宁酸、柠檬酸和异柠檬酸的 m/z 为191，莽草酸和两种乌头酸异构体（反式和顺式）的 m/z 为173，富马酸和马来酸的 m/z 为115。异柠檬酸是柠檬酸的结构异构体，因此这两种有机酸之间的基线分离非常重要。

在同一SIR通道中检测具有相同 m/z 的有机酸，并确保它们之间获得足够高的分离度。图4展示了这些分析物在溶剂标准品中的基线分离。

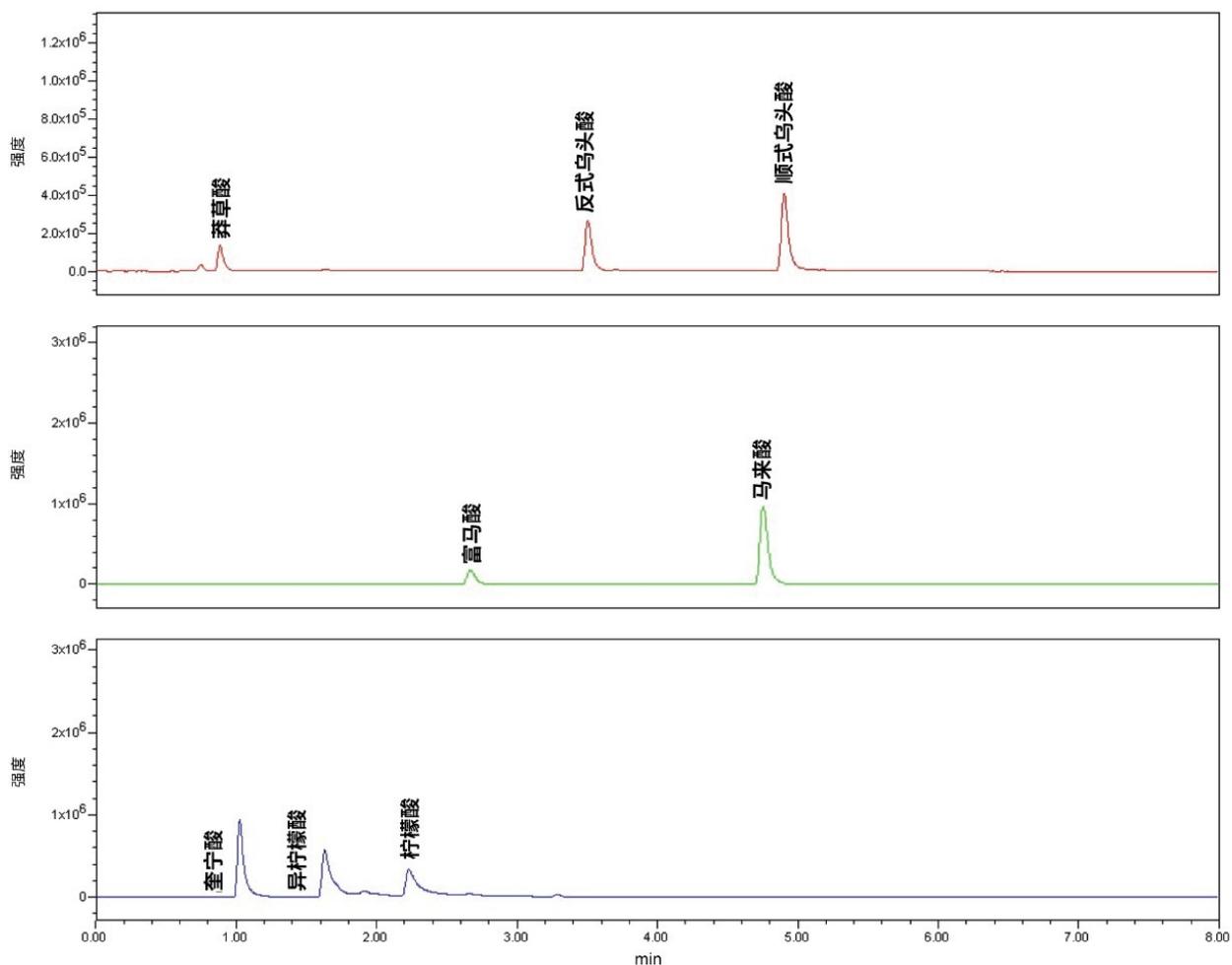


图4.基线分离：奎宁酸、异柠檬酸和柠檬酸（蓝色迹线）；富马酸和马来酸（绿色迹线）；莽草酸、反式乌头酸和顺式乌头酸（红色迹线）

为评估该方法的性能，检测了几种饮料样品以确定其有机酸谱。如样品前处理部分所述，样品在分析前经稀释和过滤。

功能饮料样品

检测三个功能饮料样品发现其中存在的主要有机酸是柠檬酸。柠檬酸通常作为增味剂添加至饮料中，用于提供酸味。在研究的所有三种功能饮料中，柠檬酸在成分列表中均榜上有名。由于ACQUITY QDa质谱检测器具有更高的选择性和灵敏度，因此在样品A中还检测到较低含量的苹果酸和乳酸，在样品C中检出苹果酸、抗坏血酸和低含量的酒石酸、苹果酸、富马酸和马来酸。三个样品中均检出其成分列表所列的已鉴定有机酸。图5A、5B和5C展示了在功能饮料样品A、样品B和样品C中发现的有机酸。

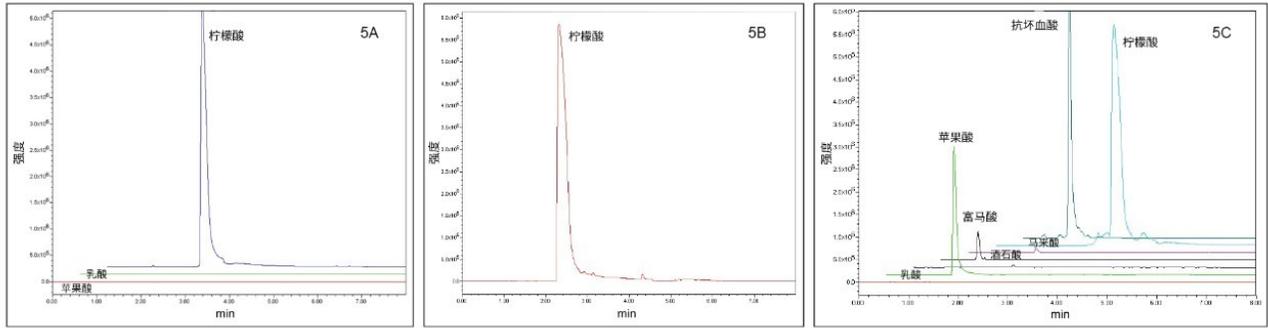


图5.在功能饮料样品A (5A)、样品B (5B)和样品C (5C)中检测到的有机酸
运动饮料和苏打水

研究的运动饮料样品包含柠檬酸（即标签上列出的主要有机酸）。除柠檬酸以外，在运动饮料样品中还检测到较低含量的苹果酸和反式乌头酸。在苏打水样品中检出低浓度的乳酸、琥珀酸、富马酸、马来酸和奎宁酸。图6A和6B展示了在所研究的运动饮料和苏打水中发现的有机酸。

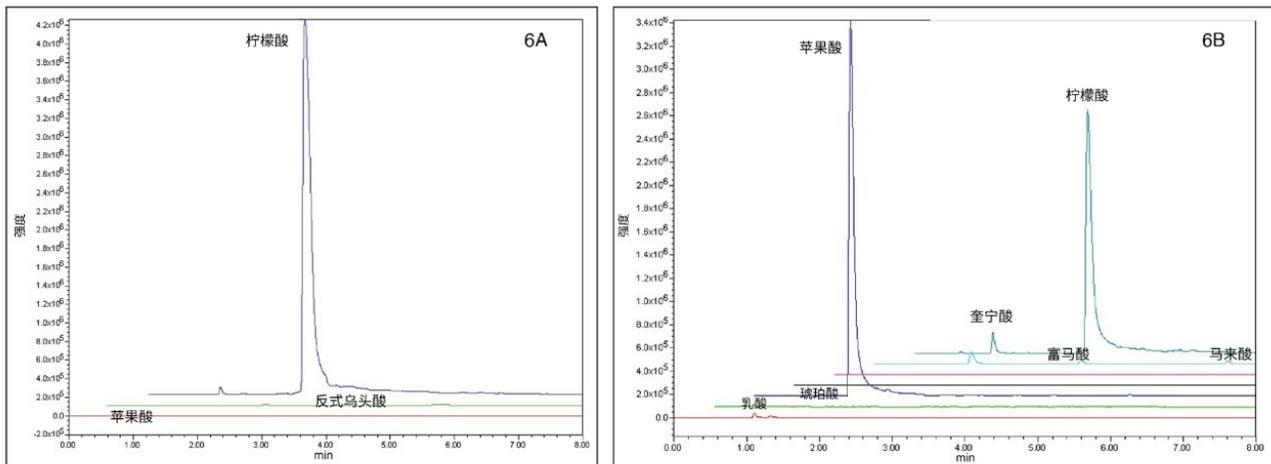


图6.在运动饮料(6A)和苏打水(6B)中检测到的有机酸
红葡萄酒

红酒中主要含有酒石酸、琥珀酸和乳酸。在红酒样品中还检出其他低含量的有机酸，例如莽草酸、奎宁酸、柠檬酸、顺式及反式乌头酸以及苹果酸。SIR提供了比UV-Vis更高的选择性，由此减少了基质干扰的影响，从而能够检测红酒样品中的低含量有机酸并且更容易积分。所开发的方法可能适用于研究和比较不同葡萄酒中的有机酸谱。

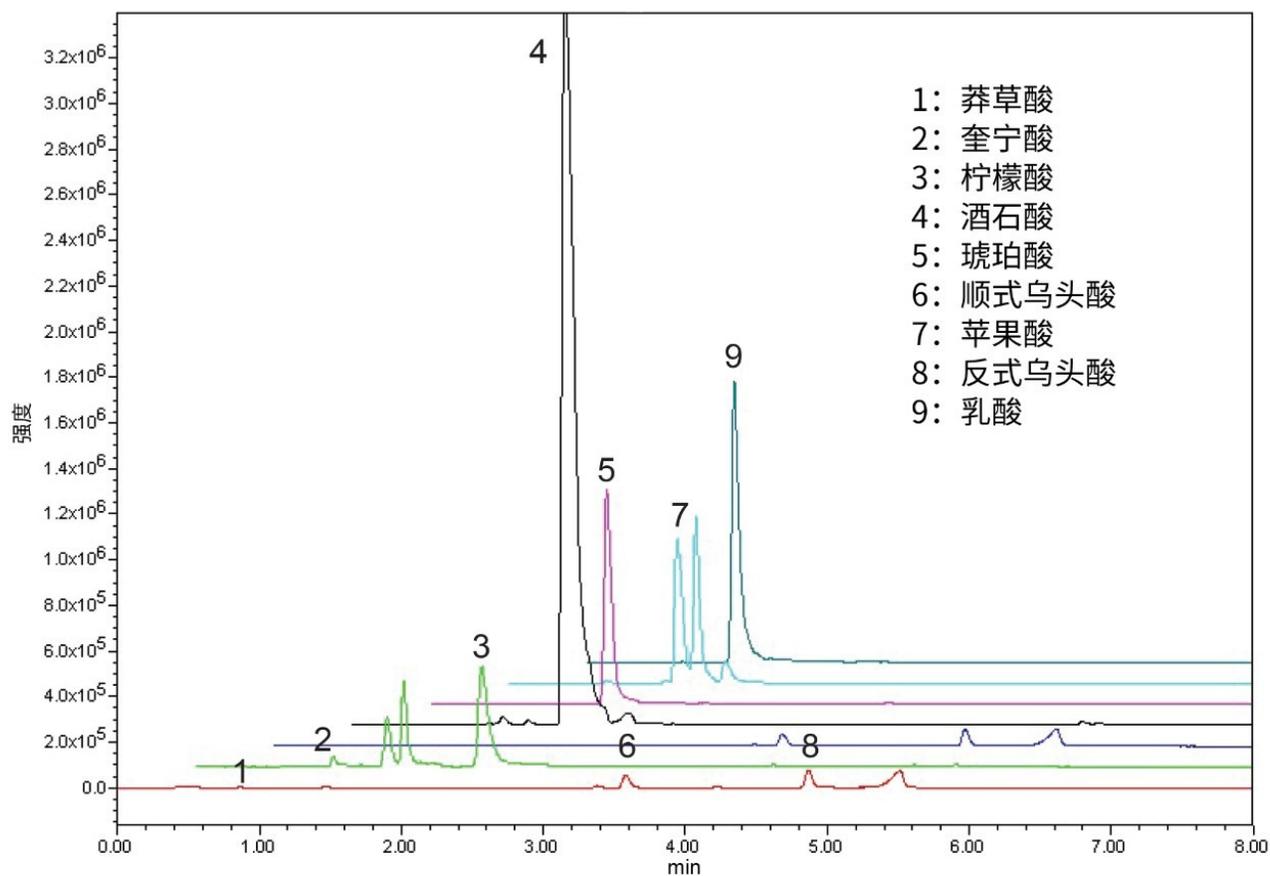


图7.在红酒样品中检测到的有机酸

果汁：橙汁和苹果汁

苹果酸、柠檬酸和奎宁酸是苹果汁中常见的有机酸。但是，使用ACQUITY QDa质谱检测器除检出这些酸以外，还检测到另外一些低含量有机酸。在橙汁中检测到高含量柠檬酸，还检测到乳酸、琥珀酸、苹果酸、奎宁酸、异柠檬酸、酒石酸、富马酸、反式及顺式乌头酸以及抗坏血酸。

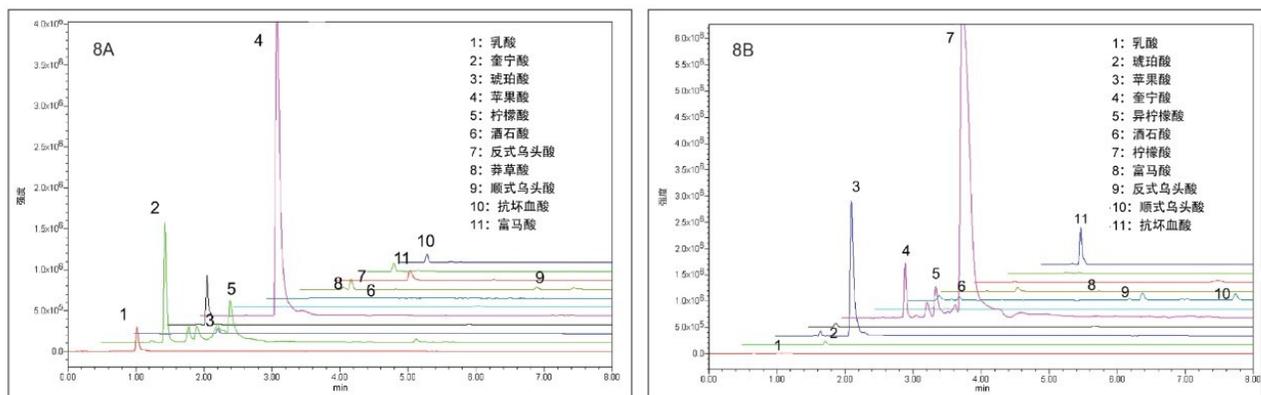


图8.在苹果汁(8A)和橙汁(8B)中检测到的有机酸

通过连续进样50次功能饮料（样品G）研究方法重现性。图9展示了样品中柠檬酸的保留时间和峰面积。50次进样的保留时间和峰面积%RSD分别为0.3%和1.9%。

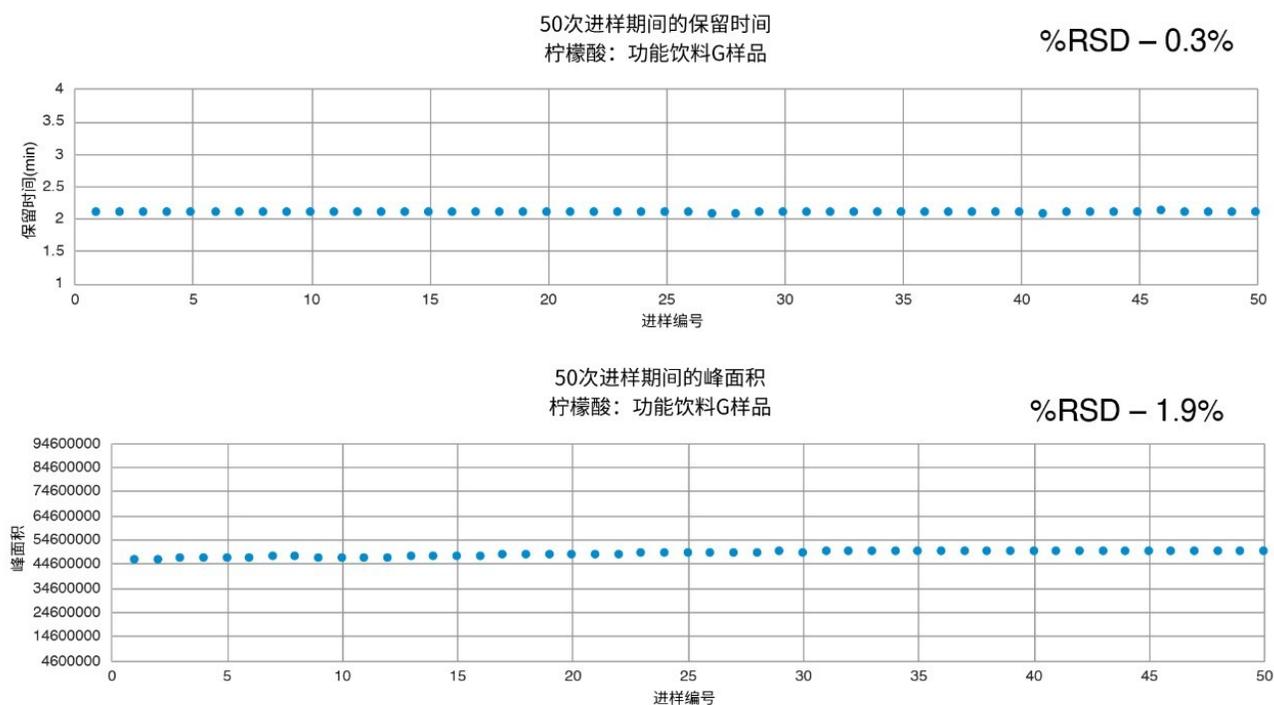


图9.使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱50次进样功能饮料样品的重现性。图中展示了柠檬酸的保留时间（上图）和峰面积（下图）以及%RSD。

结论

- 本应用纪要重点介绍了一种使用简单的样品前处理程序和无缓冲流动相分析14种有机酸的UPLC-MS方法。
- 与常规色谱柱相比，ACQUITY Premier色谱柱表现出更优异的色谱峰形和灵敏度。
- 与UV或PDA检测器相比，ACQUITY QDa质谱检测器具有更高的选择性和灵敏度，能够检测饮料样品中存在的较低含量和较高含量有机酸。
- 该方法能够分离并检测各种果汁、葡萄酒、运动饮料和功能饮料中的有机酸。
- 采用该方法将功能饮料样品进样分析50次的过程中，柠檬酸的保留时间和峰面积表现出优异的重现性。

参考资料

1. Jiaxiu Li, Chunling Zhang, Hui Liu, Jiechao Liu, and Zhonggao Jiao. Profiles of Sugar and Organic Acid of Fruit Juices: A Comparative Study and Implication for Authentication, <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2020/7236534/> <
<https://www.hindawi.com/journals/jfq/2020/7236534/>>.
2. Camara MM, Diez C, Torija ME and Cano MP.(1994).HPLC Determination of Organic Acids in Pineapple Juices and Nectars.Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, *China Eur.Food Res.Technol.*198:52–56.*Journal of Food Quality* Volume 2020, Article ID 7236534, 11 pages <https://doi.org/10.1155/2020/7236534> <<https://doi.org/10.1155/2020/7236534>> .
3. Kerri M. Smith, Paul D. Rainville.利用MaxPeak高性能表面提高三羧酸循环相关分析物的分离效果和回收率.沃特世应用纪要, 2020年修订, [720006727ZH](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/tca-cycle-analytes-by-mixed-mode-chromatography-mass-spectrometry.html) <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/tca-cycle-analytes-by-mixed-mode-chromatography-mass-spectrometry.html>> .
4. Dimple Shah.一种测定饮料中柠檬酸含量的快速、准确、灵活的LC-PDA方法.沃特世应用简报, 2021, [720007290ZH](https://www.waters.com/nextgen/in/en/library/application-notes/2021/fast-accurate-and-flexible-lc-pda-method-for-the-determination-of-citric-acid-in-beverages.html) <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/library/application-notes/2021/fast-accurate-and-flexible-lc-pda-method-for-the-determination-of-citric-acid-in-beverages.html>> .

特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统](https://www.waters.com/10138533) <<https://www.waters.com/10138533>>

- [ACQUITY QDa质谱检测器 <https://www.waters.com/134761404>](https://www.waters.com/134761404)
- [Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007289ZH, 2021年8月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.