

使用混合模式液相色谱柱和ACQUITY QDa质谱检测器分析有机酸

Jinchua Yang, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

有机酸(OA)是一组重要的化合物，在许多行业均有涉及，包括食品和饮料、动物饲料以及人体健康。之前曾研究过将ACQUITY UPLC H-Class系统与ACQUITY QDa质谱检测器联用，通过混合模式液相色谱柱（Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱）分离15种有机酸。研究了色谱条件（例如有机溶剂含量、离子强度和流动相pH）对有机酸的保留和选择性的影响。研究人员已开发出一种有机酸分析方法，并应用于果汁分析。评估了该分析方法的性能特点，包括定量限(LOQ)、色谱峰面积与浓度之间的关系、精密度和准确度。该分析方法对OA表现出良好的保留性能和分离度，运行时间短，且检测的灵敏度和选择性高。该解决方案适用于测定果汁和饮料以及其他应用领域中的有机酸。

优势

将Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱与ACQUITY UPLC H-Class系统和ACQUITY QDa质谱检测器联用分析有机酸，可以发挥以下优势：

- 保留性能更出色，色谱分离度更高
- 检测灵敏度高，有利于对果汁和饮料进行真伪试验

- 检测选择性高，不易受到样品基质中共流出化合物的干扰
- 分析速度快，运行时间少于8 min

简介

有机酸(OA)是一组重要的化合物，在许多行业均有涉及，包括食品和饮料、动物饲料以及人体健康。它们会影响果汁和饮料的风味、香味、稳定性以及微生物控制⁽¹⁾。它们通常形成不同水果和饮料的特征，可用作真伪试验的标志物或指纹图谱⁽²⁾。图1所示为本OA研究中使用的结构和 pK_a 值。

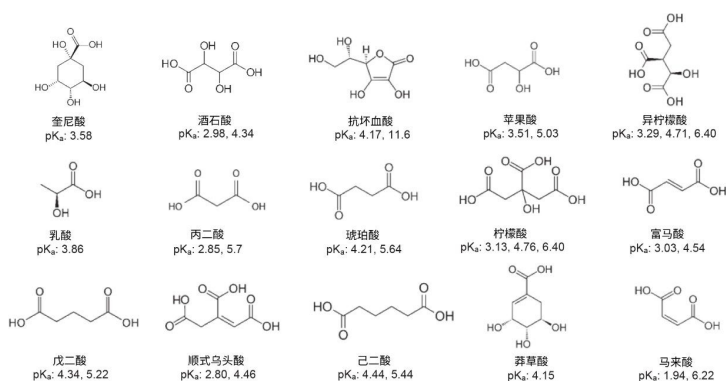


图1.有机酸的结构及其 pK_a 值

OA分析通常以液相色谱法(LC)进行，使用阴离子交换、反相或混合模式进行分离。阴离子交换色谱法对OA的分离度符合可接受标准，但运行时间通常较长。反相分离对OA的分离度有限。混合模式分离对OA的分离度高于反相液相色谱，运行时间通常短于阴离子交换色谱法。OA分析中常用的检测技术包括电导率、UV/Vis和示差折光(DRI)检测。这些检测技术对OA没有选择性，因此OA分析容易受到共流出化合物的干扰。迫切需要一种能够解决OA分析的分离度和干扰问题的解决方案。

本应用纪要介绍如何使用Waters Atlantis Premier C₁₈ AX色谱柱和Waters ACQUITY QDa质谱检测器开发一套分析解决方案以解决OA分析中的主要问题。Atlantis BEH C₁₈ AX色谱柱可

以为OA分析提供优异的保留性能和分离度。ACQUITY QDa质谱检测器是一种适用于OA分析的高选择性检测器。将这两种技术相结合，为解决棘手的OA分析中的问题提供一套优异的解决方案。

实验

液相色谱条件

| | |
|---------|--|
| 液相色谱系统: | ACQUITY UPLC H-Class系统 |
| 软件: | Empower 3 CDS |
| 色谱柱: | Atlantis Premier BEH C ₁₈ AX 1.7 μm, 2.1 x 150 mm |
| 柱温: | 30 °C |
| 流速: | 0.35 mL/min |
| 进样体积: | 1.0 μL |
| 运行时间: | 8.0 min |
| 流动相: | A: 含50 mM甲酸铵和0.9%甲酸的水溶液(pH=2.9) B: 含0.9%甲酸的乙腈溶液 C: 含0.9%甲酸的水溶液 |

液

梯度洗脱程序：

| 时间 (min) | %A | %B | %C | 曲线 |
|-------------|----|----|-----|----|
| 0.0 | 0 | 0 | 100 | 6 |
| 1.4 | 0 | 0 | 100 | 6 |
| 1.5 | 60 | 0 | 40 | 6 |
| 5.0 | 60 | 40 | 0 | 6 |
| 7.0 | 60 | 40 | 0 | 6 |
| 7.1 | 0 | 0 | 100 | 6 |
| 8.0 | 0 | 0 | 100 | 6 |

质谱条件

| | |
|---------|-------------------------------|
| 质谱系统： | ACQUITY QDa质谱检测器(Performance) |
| 电离模式： | ESI- |
| 毛细管电压： | 0.8 V |
| 锥孔电压： | 5.0 V |
| 探头温度： | 600 °C |
| 采集速率： | 1 Hz |
| SIR质量数： | [M-H] ⁻ (表1) |

| 编号 | 有机酸 | 分子式 | 单同位素质量数 (Da) | [M-H] (m/z) |
|----|-------|---|--------------|-------------|
| 1 | 奎尼酸 | C ₇ H ₁₂ O ₆ | 192.06 | 191 |
| 2 | 酒石酸 | C ₄ H ₆ O ₆ | 150.02 | 149 |
| 3 | 抗坏血酸 | C ₆ H ₈ O ₆ | 176.03 | 175 |
| 4 | 苹果酸 | C ₄ H ₆ O ₅ | 134.02 | 133 |
| 5 | 异柠檬酸 | C ₆ H ₈ O ₇ | 192.03 | 191 |
| 6 | 乳酸 | C ₃ H ₆ O ₃ | 90.03 | 89 |
| 7 | 丙二酸 | C ₃ H ₄ O ₄ | 104.01 | 103 |
| 8 | 琥珀酸 | C ₄ H ₆ O ₄ | 118.03 | 117 |
| 9 | 柠檬酸 | C ₆ H ₈ O ₇ | 192.03 | 191 |
| 10 | 富马酸 | C ₄ H ₄ O ₄ | 116.01 | 115 |
| 11 | 戊二酸 | C ₅ H ₈ O ₄ | 132.04 | 131 |
| 12 | 顺式乌头酸 | C ₆ H ₆ O ₆ | 174.02 | 173 |
| 13 | 己二酸 | C ₆ H ₁₀ O ₄ | 146.06 | 145 |
| 14 | 莽草酸 | C ₇ H ₁₀ O ₅ | 174.05 | 173 |
| 15 | 马来酸 | C ₄ H ₄ O ₄ | 116.01 | 115 |

表1.有机酸的分子式、单同位素质量数和分子离子质荷比(m/z)

标样制备

将各OA以1.0% (w/v)的浓度溶于MilliQ水中，制得储备液。将富马酸以1.0% (w/v)的浓度溶于无水乙醇中。混合各OA储备液并用MilliQ水稀释，制得包含所有OA的溶液，每种QA的浓度均为600 µg/mL（记录3位有效数字）。用水连续稀释该OA混合储备液，制得较低浓度的溶液。

样品前处理

苹果、葡萄和石榴等果汁样品购自当地商店。将这些果汁用MilliQ水按1:10的比例稀释（1 mL果汁与9 mL水混合），并用0.45 µm玻璃微纤维膜式过滤器(GMF)进行过滤。需要时用水进一步稀释过滤后的果汁溶液。

结果与讨论

色谱分析方法优化

流动相组成

Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱是一种混合模式色谱柱。其固定相不仅含有C₁₈基团，还含有在pH值大约为8以下时带正电的叔烷基胺基团⁽³⁾。研究发现流动相组成（有机溶剂含量）对OA的保留性能有显著影响。图2展示了以不同流动相组成对OA进行等度洗脱得到的容量因子(k')。在含有50 mM甲酸铵和0.9%甲酸的水溶液中，有机酸的k'值介于0.4~2.5之间。当有机溶剂含量（流动相B，含0.9%甲酸的乙腈溶液）增加至约50%时，这些酸在色谱柱上的保留最少，所有k'值均小于0.5。当有机溶剂含量进一步增加至更高水平时，OA的k'值再次升高。在不同的流动相组成中，OA的洗脱顺序也发生了变化。

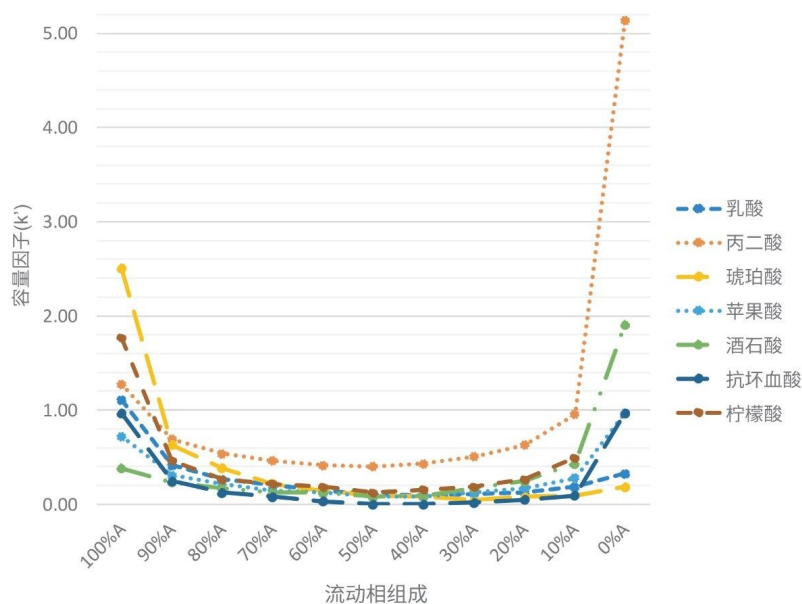


图2.使用Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱以不同流动相组成对有机酸进行等度洗脱得到的容量因子(k')。流动相A：含50 mM甲酸铵和0.9%甲酸的水溶液(pH=2.9)；B：含0.9%甲酸的乙腈溶液。

流动相缓冲液浓度

缓冲液浓度是OA分析方法优化的另一个主要因素。如图3所示，它影响有机酸的保留性能和选择性。当甲酸铵的浓度从50 mM降至0 mM时，柠檬酸和丙二酸的k'显著增加，其他OA的k'适度增加。与图3中的其他OA相比，柠檬酸和丙二酸的k'显著增加与这两种化合物的pK_a值较低有关，改变缓冲液浓度后，OA的洗脱顺序也发生了变化。

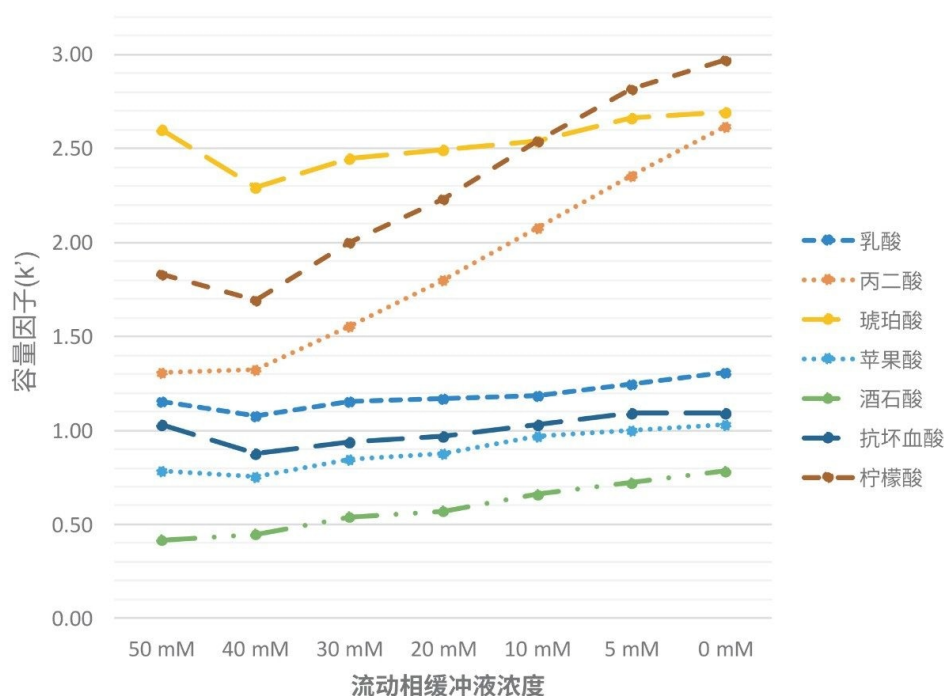


图3.使用Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱以不同浓度缓冲液的水溶液（含0.9%甲酸，pH=2.9）对有机酸进行等度洗脱得到的容量因子(k')。缓冲液：甲酸铵。

流动相的pH值

流动相的pH值也是方法开发的重要因素。流动相的pH值会影响OA的酸解平衡，从而影响其保留性能和峰形。本研究使用pH 2.9以获得良好峰形。

有机酸分析

研究人员开发出梯度洗脱程序并用于OA分析中（参见实验部分）。它本质上是一种二元溶剂梯度，再加上一段使用不含缓冲液的水（离子强度低）进行的等度洗脱。先使用不含缓冲液的水进行等度洗脱，再进行梯度洗脱，可以使先洗脱的OA获得更强的保留性能，并使重要的奎宁酸、酒石酸和苹果酸获得良好的分离度。

使用11个单离子扫描(SIR)通道采集15种有机酸的色谱图（图4）。这些OA的大多数分子离子[M-H]⁻具有不同的质荷比(m/z)。使用单独的SIR通道进行检测可以消除彼此之间可能存在的干扰。表2中列出了15种有机酸的RT、定量限(LOQ)和校准结果。溶剂溶液中有机的LOQ范围为0.2~6 ppm（在溶液中相当于μg/mL）。

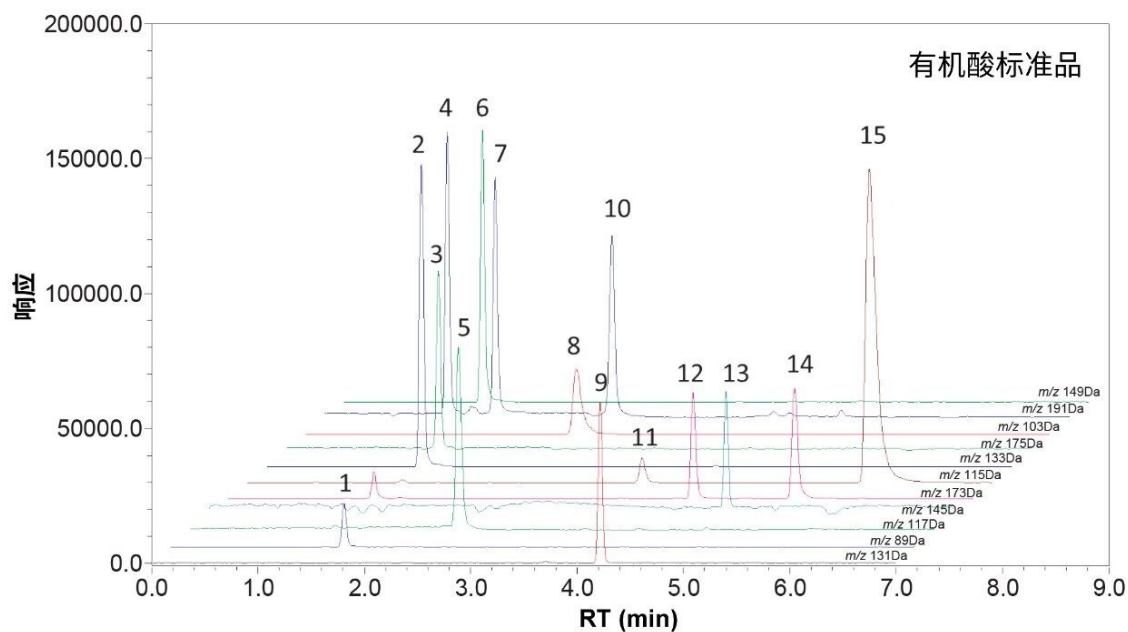


图4.在11个SIR通道中检测15种有机酸标准品得到的色谱图。有机酸浓度：20 ppm。色谱柱：*Atlantis Premier BEH C₁₈ AX, 1.7 μm, 2.1×100 mm*。峰ID：1.乳酸；2.羟基丁二酸；3.抗坏血酸；4.奎尼酸；5.琥珀酸；6.酒石酸；7.异柠檬酸；8.丙二酸；9.戊二酸；10.柠檬酸；11.富马酸；12.顺式乌头酸；13.己二酸；14.莽草酸；15.马来酸。

| | 酸 | RT (min) | 方程 | R ² | LOQ (ppm) | 范围 (ppm) | [M-H] ⁻ (m/z) | 峰面积RSD (%) | |
|----|-------|----------|---|----------------|-----------|----------|--------------------------|------------|--------|
| | | | | | | | | 200 ppm | 60 ppm |
| 1 | 奎尼酸 | 1.16 | $Y = -1.10e+001 X^2 + 1.48e+004 X - 3.53e+002$ | 0.996 | 2 | 2-600 | 191 | 4.5 | 8.6 |
| 2 | 酒石酸 | 1.31 | $Y = -1.09e+001 X^2 + 1.63e+004 X - 6.05e+003$ | 0.995 | 0.6 | 0.6-600 | 149 | 4.1 | 9.6 |
| 3 | 抗坏血酸 | 1.46 | $Y = -5.83e+000 X^2 + 8.038e+003 X - 4.26e+003$ | 0.992 | 2 | 2-600 | 175 | 5.3 | 7.9 |
| 4 | 苹果酸 | 1.48 | $Y = -3.54e+001 X^2 + 1.79e+004 X - 3.17e+003$ | 0.995 | 0.2 | 0.2-200 | 133 | 1 | 4.3 |
| 5 | 异柠檬酸 | 1.63 | $Y = -7.58e+000 X^2 + 1.37e+004 X - 9.84e+003$ | 0.995 | 6 | 6-600 | 191 | 5.7 | 10.5 |
| 6 | 乳酸 | 1.65 | $Y = -1.70e+000 X^2 + 2.34e+003 X + 1.93e+002$ | 0.995 | 2 | 2-600 | 89 | 5.1 | 3.7 |
| 7 | 丙二酸 | 2.60 | $Y = -4.96e+000 X^2 + 7.68e+003 X - 2.76e+003$ | 0.995 | 2 | 2-600 | 103 | 5.6 | 9 |
| 8 | 琥珀酸 | 2.64 | $Y = -7.84e+001 X^2 + 1.38e+004 X - 3.15e+002$ | 0.980 | 2 | 2-60 | 117 | - | 15.1 |
| 9 | 柠檬酸 | 2.80 | $Y = -5.76e+000 X^2 + 1.30e+004 X - 3.81e+004$ | 0.984 | 6 | 6-600 | 191 | 14.1 | 16.7 |
| 10 | 富马酸 | 3.78 | $Y = -9.29e+001 X^2 + 2.48e+003 X - 5.72e+003$ | 0.998 | 4 | 6-600 | 115 | 1.1 | 7.3 |
| 11 | 戊二酸 | 4.26 | $Y = -5.16e+000 X^2 + 7.67e+003 X - 2.10e+003$ | 0.997 | 2 | 2-600 | 131 | 5.4 | 5.3 |
| 12 | 顺式乌头酸 | 4.39 | $Y = -4.52e+000 X^2 + 6.16e+003 X - 8.59e+003$ | 0.995 | 1 | 2-600 | 173 | 6.3 | 9.7 |
| 13 | 己二酸 | 4.86 | $Y = -3.63e+000 X^2 + 6.23e+003 X + 1.15e+002$ | 0.998 | 6 | 6-600 | 145 | 3 | 2.5 |
| 14 | 莽草酸 | 5.33 | $Y = -4.79e+000 X^2 + 6.61e+003 X - 1.98e+003$ | 0.987 | 0.6 | 0.6-600 | 173 | 4.5 | 7.7 |
| 15 | 马来酸 | 5.88 | $Y = -4.29e+002 X^2 + 5.76e+004 X + 3.663e+003$ | 0.996 | 0.2 | 0.2-60 | 115 | - | 2.4 |

表2.有机酸保留时间、校准结果、LOQ和峰面积重现性

利用加标研究评估了有机酸定量的准确度。在苹果汁、葡萄汁和石榴汁中以两种加标浓度（0.1 mg/mL和4 mg/mL）加入四种重要的有机酸，即奎宁酸、酒石酸、苹果酸和柠檬酸。按照AOAC指导原则⁽⁴⁾计算回收率，结果见表3。大部分回收率在80-120%的范围内。在加标研究中使用了外部校准法。但是，如果需要更准确的结果，建议使用内标。使用内标是提高分析准确度和精密度的常用方法，在涉及质谱分析时尤其如此。

| | 苹果汁 | | | 葡萄汁 | | | 石榴汁 | | |
|-----|-------------------|-------------------|---------|-------------------|-------------------|---------|-------------------|-------------------|---------|
| | 原始浓度 (果汁中, mg/mL) | 加标浓度 (果汁中, mg/mL) | | 原始浓度 (果汁中, mg/mL) | 加标浓度 (果汁中, mg/mL) | | 原始浓度 (果汁中, mg/mL) | 加标浓度 (果汁中, mg/mL) | |
| | | 0.1 mg/mL | 4 mg/mL | | 0.1 mg/mL | 4 mg/mL | | 0.1 mg/mL | 4 mg/mL |
| 奎尼酸 | 0.24 | 109% | 88% | 0 | 85% | 84% | 0.02 | 118% | 92% |
| 酒石酸 | 0 | 135% | 89% | 0.75 | 82% | 82% | 0.007 | 92% | 88% |
| 苹果酸 | 3.36 | N/A* | 86% | 1.64 | N/A* | 94% | 0.57 | 99% | 95% |
| 柠檬酸 | 0.06 | N/A* | 119% | 0.12 | 105% | 116% | 7.45 | N/A* | 163% |

*由于加标浓度低，回收率无效。

表3.果汁中常见有机酸的回收率

该方法用于OA分析的主要优势在石榴汁分析中得到凸显。图5展示了石榴汁的叠加色谱图，插图为放大后的叠加

色谱图。测得石榴汁中的酒石酸含量低至0.007 mg/mL（见表3）。请注意，酒石酸SIR色谱图中的基线平坦，图5中酒石酸的峰(RT 1.5 min)附近存在多个峰。如果使用非选择性检测器，很难对浓度低至该水平并且有很多峰在其临近位置洗脱的酒石酸进行定量分析。酒石酸是掺假石榴汁的标志物。掺假石榴汁中酒石酸的含量为0.07 mg/mL或更高⁽⁵⁾。高灵敏度检测OA（例如，在本例中检测石榴汁中的酒石酸）对于果汁真伪试验是必需的。

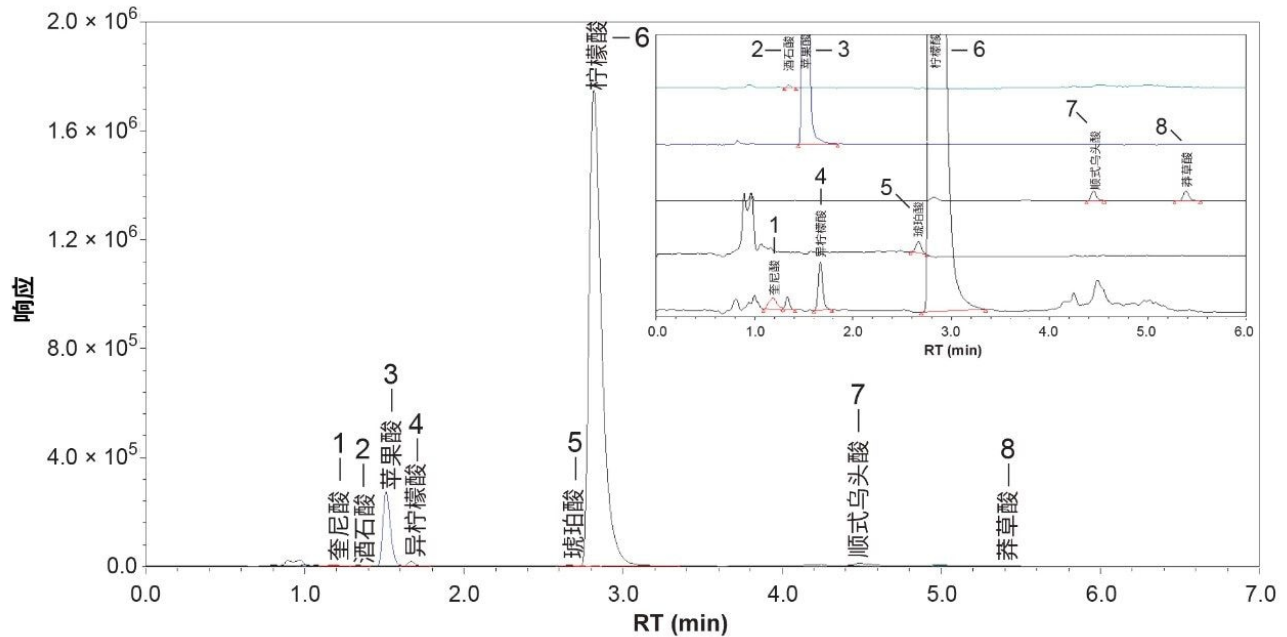


图5.石榴汁的SIR叠加色谱图。分析前，用去离子水将果汁稀释10倍。插图所示为放大的OA检测色谱图，含基线补偿。

结论

由于难以分离样品中可能存在的大量天然OA，因此OA分析是一项非常艰巨的任务。Waters UPLC/QDa系统结合Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱为QA分析提供了一种杰出方法。该OA分析方法的主要优势包括：

- 保留性能更出色，分离度更高
- 检测灵敏度高，在某些应用中非常有利

- 检测选择性高，使分析不易受到样品基质中共流出化合物的干扰
- 分析速度快，运行时间少于8 min

参考资料

1. Monica Gonzalez and Venerando Gonzalez. Organic Acids in Food Analysis by HPLC; 3rd ed. Leo M.L. Nollet, Fidel Toldra., Eds; CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2013, pp 443.
2. Hyoung S. Lee, HPLC Method for Separation and Determination of Non-Volatile Organic Acids in Orange Juice, *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1991–1993.
3. Thomas H. Walter, Bonnie A. Alden, Cheryl Boissel, Jessica Field, Nicole Lawrence, Donna Osterman, and Amit Patel, A New Mixed-Mode Reversed-Phase/Anion-Exchange Stationary Phase Based on Hybrid Particles, Waters Application Note, Waters Corporation, 720006742en, 2020.
4. AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2012) Official Methods of Analysis, 19th Ed., Appendix K, *AOAC INTERNATIONAL*, Rockville, MD, USA. http://www.eoma.aoc.org/app_k.pdf.
5. Stefan Ehling and Shannon Cole, Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by LC-MS: An Enhanced Tool for Authenticity Testing, *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 2229–2234.

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 3色谱数据软件 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720006938ZH, 2020年6月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie Cookie 设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号