

双进样液相色谱仪测定食品中 7 种有机酸含量

LC-434

摘要： 本文使用岛津双进样液相色谱仪建立了快速测定食品中有机酸等 7 种原料的检测方法。7 种有机酸在各自线性浓度范围内，相关系数均大于 0.997，各浓度点的回读准确度在 89.1%~114.7% 之间，线性相关性良好。稳定性考察中，7 种组分的保留时间相和峰面积的相对标准偏差分别在 0.016~0.195% 和 0.071~2.700% 之间，仪器精密密度良好。双进样液相色谱仪可以实现一次进样同时分析两组样品，既不改变法规方法又可实现分析快速，满足食品安全国家标准 GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》的检测需求。

关键词： 双进样液相色谱仪 有机酸

技术特点：

- ❖ 针对标准要求的两针进样方法，双进样系统可通过一次分析实现
- ❖ 应对 GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》

世界上使用的酸味剂约有 20 余种，每年需求量增长率为 3-5%。食品酸味剂分为有机酸味剂和无机酸味剂，常见的酸味剂一般是有机酸，如柠檬酸、苹果酸、酒石酸等均广泛应用于食品加工。在食品加工、贮存及品质管理等方面被认为是最重要的成分，测定食品中的酸度具有非常重要意义，有机酸影响食品

的色、香、味及稳定性，另外，食品中有机酸含量高，则其 pH 值低，而 pH 值对食品的安全性有一定影响，pH 值是果蔬罐头杀菌条件的主要依据。本文参考食品安全国家标准 GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》，采用岛津双进样液相色谱仪建立了食品中 7 种有机酸的检测方法。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津双进样液相色谱仪，具体配置为：

输液泵：	LC-40B XR、LC-40D XR (LPGE)	系统控制器：	CBM-40
脱气机：	DGU-405×2	检测器：	SPD-M40×2
自动进样器：	SIL-40C XR	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114
柱温箱：	CTO-40C		

1.2 系统介绍

该系统有两套独立的色谱流路，共用一个自动进样器；自动进样器有两个进样口，可以将同一瓶号样品（或不同瓶号样品）分别注入两条色谱流路中，然后同时触发两条色谱流路进行样品分析。流路图如下：

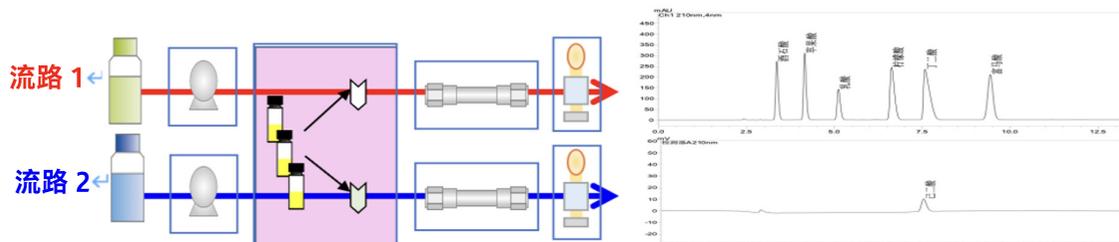


图 1 仪器流路图

- 注：1. 该系统具有两个独立液相流路，既可以同时使用，也可以单独使用。
2. 该系统也可配置两个四元系统、两个二元系统或者四元系统 + 二元系统。
3. 两个流路检测器可以配置紫外 + PDA; 也可配置 PDA+PDA

1.3 分析条件

液相条件

色 谱 柱： Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm 5 μm), P/N:227-30017-08;
Shim-pack GIST C18-AQ (250 mm x 4.6 mm 5 μm), P/N:227-30742-08
(岛津(上海)实验器材有限公司)

流 动 相： A- 磷酸溶液 (0.1%) B - 甲醇

流 速： 1.0 mL/min 柱 温： 40°C

波 长： 210 nm 进样体积： 20 μL

洗脱方式： 梯度洗脱，两组的梯度程序分别如下图。

分组：

第一组 (G1)，测定酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、丁二酸、富马酸梯度条件

表 1 第一组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	97.5	2.5
10.0	97.5	2.5
10.1	0	100
15.0	0	100
15.1	97.5	2.5
22.0	97.5	2.5

第二组 (G2)，测定己二酸梯度条件

表 2 第二组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	75	25
10.0	75	25
10.1	0	100
15.0	0	100
15.1	75	25
22.0	75	25

1.4 混合标准溶液配置

I 组标准工作溶液【乳酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、丁二酸、富马酸】：分别称取酒石酸 1.25 g、苹果酸 2.5 g、柠檬酸 2.5 g、丁二酸 6.25 g (精确至 0.01 g) 和富马酸 2.5 mg (精确至 0.01 mg) 于 50 mL 小烧杯中，加水溶解，用水转移到 50 mL 容量瓶中，定容，混匀，于 4°C 保存，其中酒石酸质量浓度为 25000 μg/mL、苹果酸 50000 μg/mL、乳酸 50000 μg/mL、柠檬酸 50000 μg/mL、丁二酸 125000 μg/mL 和富马酸 50 μg/mL。分别吸

取混合标准储备液 0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.00 mL 于 25 mL 容量瓶中，用 0.1% 磷酸水溶液定容至刻度，摇匀，于 4℃ 保存。

II 组标准工作溶液【己二酸】：准确称取按其纯度折算为 100% 质量的己二酸 12.5 mg，置于 25 mL 容量瓶中，加水至刻度，摇匀，于 4℃ 保存。分别吸取 0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.00 mL 于 25 mL 容量瓶中，用 0.1% 磷酸水溶液定容至刻度，混匀，备用。

1.5 样品前处理方法

果茶：称取 5 g（精确至 0.01 g）均匀试样（若试样中含有二氧化碳应先加热除去），加入 25 mL 容量瓶中，加水至刻度，经 0.45 μm 水相滤膜过滤，注入高效液相色谱仪分析。

果冻：称取 10 g（精确至 0.01 g）均匀试样，放入 50 mL 塑料离心管中，像其中加入 20 mL 水后在 15000 r/min 的转速下提取 2 min，4000 r/min 离心 5 min，取上层提取液至 50 mL 容量瓶中，残留物再用 20 mL 水重复提取一次，合并提取液于同一容量瓶中，并用水定容至刻度，经 0.45 μm 水相滤膜过滤，注入高效液相色谱仪分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

7 种有机酸混合标准溶液色谱图如图 2-3 所示，各目标化合物编号同表 3。

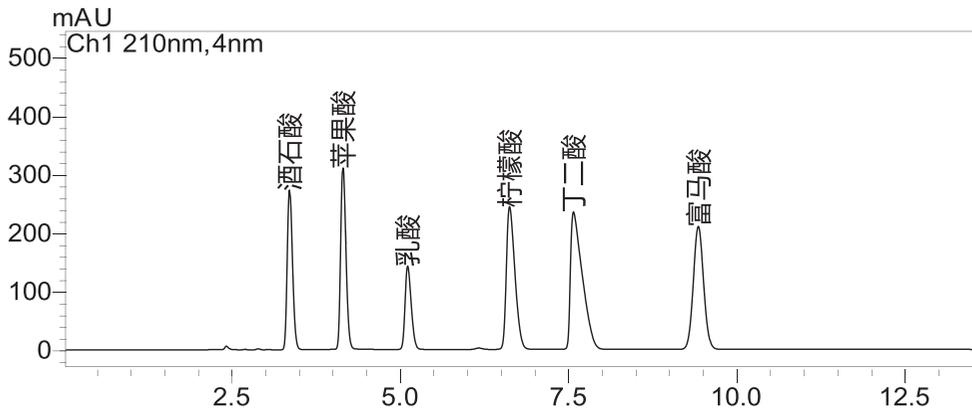


图 2 标准品溶液色谱图（流路 1）

（酒石酸 1000 mg/L、苹果酸 2000 mg/L、乳酸 2000 mg/L、柠檬酸 2000 mg/L、丁二酸 5000 mg/L、富马酸 2 mg/L）

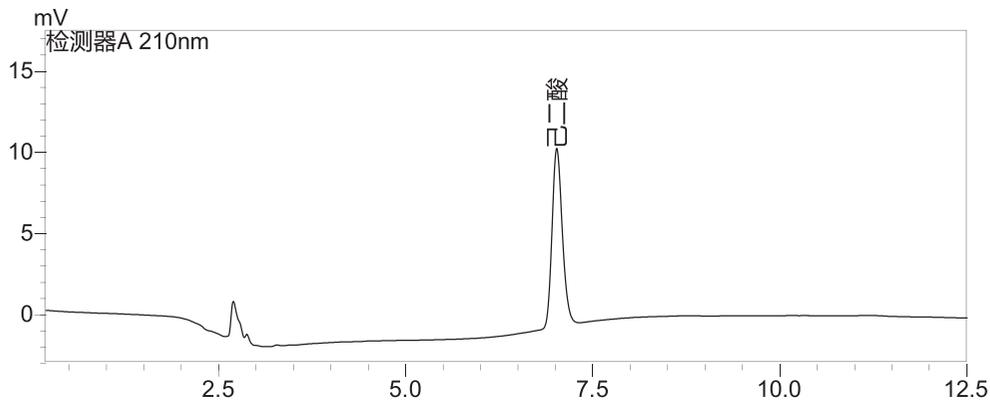


图 3 己二酸的标准品溶液色谱图（200 mg/L）（流路 2）

2.2 线性范围

将不同浓度的标准品溶液，按 1.3 中的分析条件进行测定，结果显示浓度范围内，酒石酸 (500-10000 $\mu\text{g/mL}$)、苹果酸 (1000-20000 $\mu\text{g/mL}$)、乳酸 (1000-20000 $\mu\text{g/mL}$)、柠檬酸 (1000-20000 $\mu\text{g/mL}$)、丁二酸 (2500-50000 $\mu\text{g/mL}$)、富马酸 (1-20 $\mu\text{g/mL}$)、己二酸 (10-200 $\mu\text{g/mL}$) 具有较好的线性关系，线性相关系数 > 0.997 ，各浓度点的回读准确度在 89.1%~114.7% 之间，具体结果见表 3。

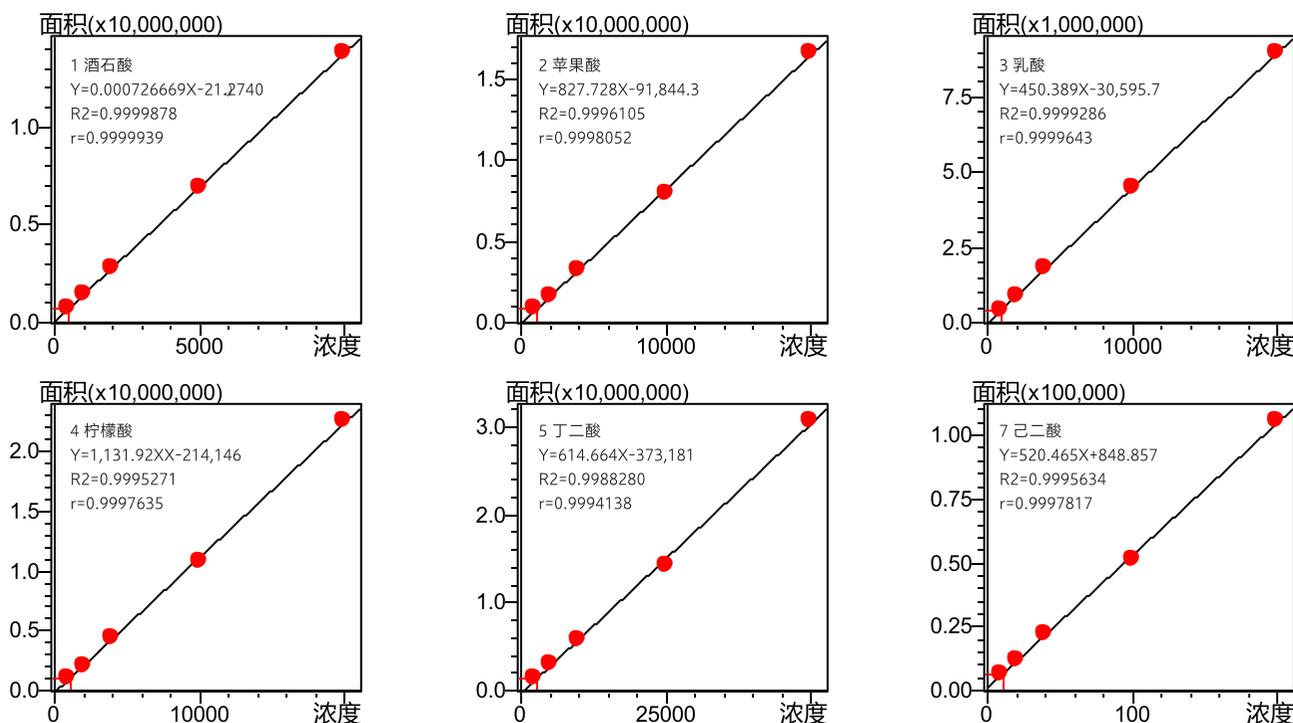


图 4 部分化合物的校准曲线

2.3 精密度实验

不同浓度的标准品溶液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，浓度点信息、保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.016~0.195% 和 0.071~2.700% 之间，仪器精密度良好。

2.4 加标回收率测试

取某果汁样品如上方法进行测试，样品中检出苹果酸和柠檬酸。以该样品进行加标回收率实验，加入一定浓度的有机酸标液，按照 1.5 中样品制备方法，每个浓度平行制备 2 份样品。加标回收率测试结果显示：7 种有机酸的样品加标回收率在 86.8%~107.6% 之间，满足标准测试要求，样品加标回收色谱图如图 5、6 所示，加标浓度和结果如表 3。

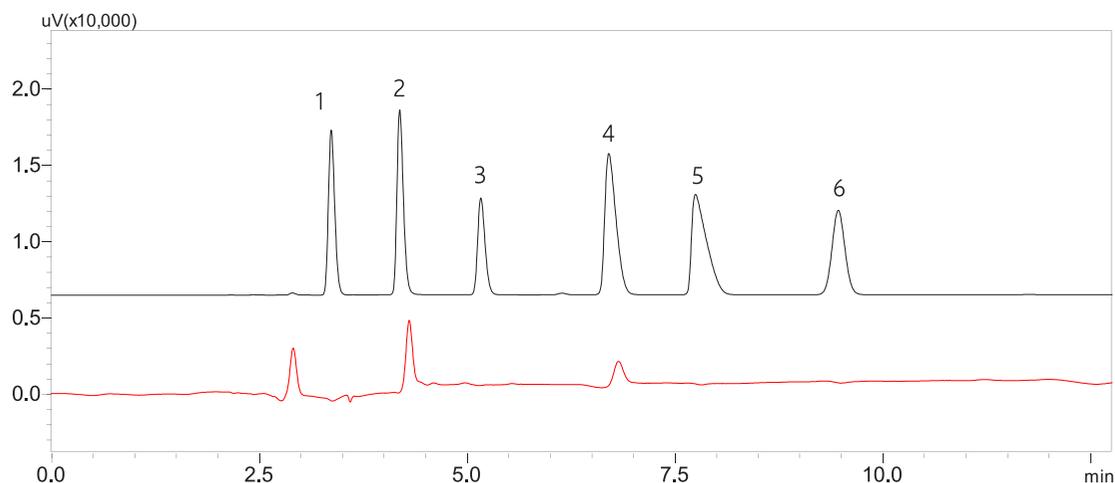


图5 加标回收色谱图（黑色：加标样品；红色：空白样品）
（第一组，1. 酒石酸 500 $\mu\text{g/g}$ 、2. 苹果酸 1000 $\mu\text{g/g}$ 、3. 乳酸 500 $\mu\text{g/g}$ 、4. 柠檬酸 500 $\mu\text{g/g}$ 、
5. 丁二酸 2500 $\mu\text{g/g}$ 、6. 富马酸 2.5 $\mu\text{g/g}$ ）

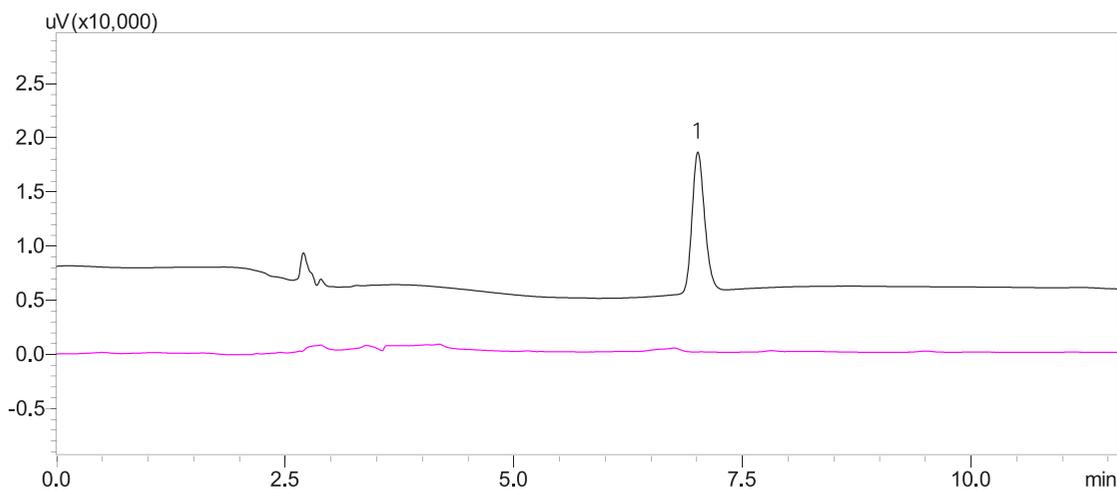


图6 加标回收色谱图（黑色：加标样品；红色：空白样品）
（第二组：1. 己二酸 50 $\mu\text{g/g}$ ）

■ 结论

本文使用岛津双进样液相色谱仪建立快速测定食品中有机酸7种原料含量的方法，并考察了线性、重复性、加标回收率，可以满足食品安全国家标准 GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》。双进样液相色谱仪可以实现一次进样同时分析两组样品，不改变法规方法、分析耗时降低一倍，可供相关行业参考。

表 3 校准曲线参数、保留时间和峰面积重复性及回收率测试结果

No.	化合物名称	CAS	相关系数 r	准确度 (%)	检出限 (mg/kg)	RSD% ①			RSD% ②			空白样品测试结果 (µg/g)	加标浓度①			加标浓度②		
						浓度 (µg/mL)	R.T.	Area	浓度 (µg/mL)	R.T.	Area		加标值 (µg/g)	检测值 (µg/g)	回收率 (%)	加标值 (µg/g)	检测值 (µg/g)	回收率 (%)
1	酒石酸	87-69-4	0.9999	97.3~100.7	74.85	1000	0.057	0.290	5000	0.096	0.318	N.D.	500	518.5	103.7	1000	1052	105.2
2	苹果酸	6915-15-7	0.9998	97.3~108.6	149.70	2000	0.018	0.153	10000	0.040	0.440	314.7	1000	1286.7	97.2	2000	2241	96.3
3	乳酸	50-21-5	0.9999	89.1~102.3	109.45	2000	0.041	0.190	10000	0.016	0.228	N.D.	500	512.5	102.5	1000	1054	105.4
4	柠檬酸	77-92-9	0.9997	97.2~114.7	69.65	2000	0.079	0.105	10000	0.195	0.175	173.4	500	711.3	107.6	1000	1189	101.6
5	丁二酸	110-17-8	0.9993	95.4~114.4	169.15	5000	0.082	0.084	25000	0.055	0.111	N.D.	2500	2210	88.4	5000	4565	91.3
6	富马酸	110-17-8	0.9994	95.3~113.2	0.79	2	0.204	0.071	10	0.351	0.103	N.D.	2.5	2.17	86.8	5.0	4.41	88.2
7	己二酸	124-04-9	0.9997	97.1~104.2	23.40	10	0.046	0.814	50	0.132	2.700	N.D.	50	51.45	102.9	100	104.7	104.7

N.D. 未检出

岛津应用云

