

LC-MS/MS 法测定植物源性食品中有机酸的含量

LCMSMS-675

摘要： 本文利用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了植物源性食品中 14 种有机酸物质含量的分析检测方法。该方法可以将目标物与其他杂质组分的色谱峰实现良好的分离；在 0.1~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内建立标准曲线，线性关系良好；植物源性样品的综合加标回收率在 83.4%~103.8% 之间；14 种有机酸物质的 LOD 为 0.0003~0.010 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，LOQ 为 0.001~0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，均满足 GB/T 40179-2021《植物中有机酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法》标准的要求。该方法具备操作简捷、灵敏度高、分析速度快，可以满足多种植物源性样品中有机酸物质的定性定量分析。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 植物 有机酸

有机酸 (Organic acids) 是指分子结构中含有羧基 (—COOH) 的化合物。在植物的茎、叶、根、特别是果实中广泛分布。常见的植物中的有机酸有脂肪族的一元、二元、多元羧酸，如：酒石酸、草酸、苹果酸、枸橼酸、抗坏血酸等；亦有芳香族的有机酸，如：苯甲酸、水杨酸、咖啡酸等。有报告认为，有机酸除具有抗生素作用外，还具有着广泛的生物活性，如：苹果酸、枸橼酸、酒石酸、抗坏血酸等有机酸就可作用于中枢神经系统。还有些特殊种类的有机酸是某些中草药的有效成分，如：土槿皮酸有抗真菌作用，咖啡酸有生物活性，绿原酸有抗菌、利胆、降血压、降血脂和升高白血球等作用。

现代科学对有机酸生物活性的研究已深入到食品、保健、医药和日用化工等多个领域。

随着各行各业对有机酸类物质的逐渐关注，2021 年 5 月 21 日，由国家市场监督管理总局与国家标准化委员会联合发布了植物中有机酸含量的检测方法，并在 2021 年 12 月 1 日实施执行，其中规定了采用高效液相色谱串联质谱法对多种植物中的 14 种有机酸类物质的含量进行分析测定。

本文采用岛津三重四极杆液质联用仪，参照 GB/T 40179-2021《植物中有机酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法》，建立了植物中 14 种有机酸物质的含量测定方法。该方法快速准确、灵敏度高，适用于植物源性食品中的 14 种有机酸类物质的快速筛查及准确测定。

■ 实验部分

1.1 仪器配置

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{5R}

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

检测器：LCMS-8045

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GIST-HP C18-AQ 色谱柱 (2.1 mm I.D.×100 mm L, 3 μm ，岛津 (上海) 实验器材有限公司 P/N: 227-30765-03)

流动相：A 相 0.1% 甲酸水溶液，B 相 甲醇

流速：0.2 mL/min

进样量：2 μL

柱温：35°C

洗脱方式：梯度洗脱

初始浓度：A 相初始浓度为 95%，B 相初始浓度为 5%，详见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
6	泵	B.Conc	5
15	泵	B.Conc	60
20	泵	B.Conc	95
23	泵	B.Conc	95
23.1	泵	B.Conc	5
28	控制器	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI (-)	接口电压: -4.5 kV
雾化气流速: 3 L/min	加热模块温度: 400°C
加热气流速: 10.0 L/min	DL 温度: 250°C
接口温度: 300°C	干燥气流速: 10.0 L/min
扫描模式: 多反应监测 (MRM)	MRM 参数: 详见表 2

表 2 有机酸物质 MRM 参数

序号	化合物名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	富马酸	110-17-8	115.0	71.0*	13	9	15
				27.0	12	12	30
2	反式 - 乌头酸	4023-65-8	173.0	84.9*	19	11	20
				128.9	19	10	13
3	没食子酸	149-91-7	169.0	124.9*	19	15	13
				124.5	19	22	13
4	2, 5- 二羟基苯甲酸	490-79-9	153.0	109.0*	17	14	12
				107.9	17	22	11
5	己二酸	124-04-9	145.1	100.9*	17	14	11
				83.0	17	13	18
6	绿原酸	327-97-9	353.1	191.0*	18	17	20
				84.9	18	44	18
7	对羟基苯甲酸	99-96-7	137.0	92.9*	16	17	10
				65.0	15	29	13
8	3, 4- 二羟基苯甲酸	99-50-3	153.0	107.9*	17	22	11
				109.0	17	14	11
9	香草酸	121-34-6	167.1	152.0*	12	17	16
				107.9	19	18	12
10	咖啡酸	331-39-5	179.0	135.0*	20	16	25
				134.0	20	23	24
11	丁香酸	530-57-4	197.1	181.9*	10	13	20
				122.9	10	22	13
12	对香豆酸	501-98-4	163.0	119.0*	18	15	12
				92.9	18	29	10

13	阿魏酸	1135-24-6	193.1	134.0*	10	16	14
				178.0	14	13	20
14	水杨酸	69-72-7	137.0	92.9*	16	17	10
				65.0	16	29	13
15	氘代琥珀酸 (ISTD)	14493-42-6	121.0	76.9*	14	13	19
				101.9	13	14	11

注：* 表示定量离子

1.3 标准溶液配置

参照 GB/T 40179—2021GB/T 40179-2021《植物中有机酸的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》标准，使用 50% 甲醇溶液将 14 种有机酸成分的混合母液进行逐级稀释，得到浓度分别为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作溶液（其中都含有氘代琥珀酸内标浓度为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），待上机分析。

1.4 样品前处理方法

参照 GB/T 40179—2021GB/T 40179-2021《植物中有机酸的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》标准。

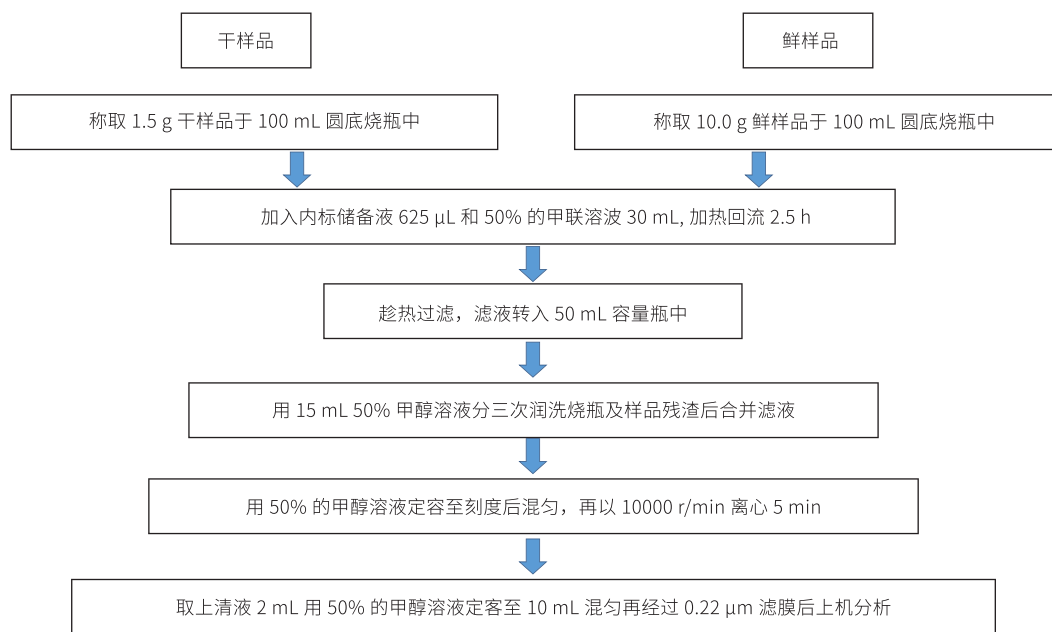


图 1 前处理流程图

■ 结果与讨论

2.1 线性范围

参照 GB/T 40179—2021GB/T 40179-2021《植物中有机酸的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》标准，选用三重四极杆液质联用仪在负模式下进行 14 种有机酸物质的标准溶液数据采集，14 种有机酸物质及氘代琥珀酸内标物质的 MRM 色谱图如图 2 所示。将 14 种有机酸物质按照 1.3 配制成标准工作溶液，再以目标物与氘代琥珀酸内标物的浓度比值为横坐标，峰面积比值为纵坐标，以内标法绘制 14 种有机酸物质的校准曲线，如图 3 所示，标准曲线线性关系良好，相关系数 R 均大于 0.999，线性方程情况详见表 3。

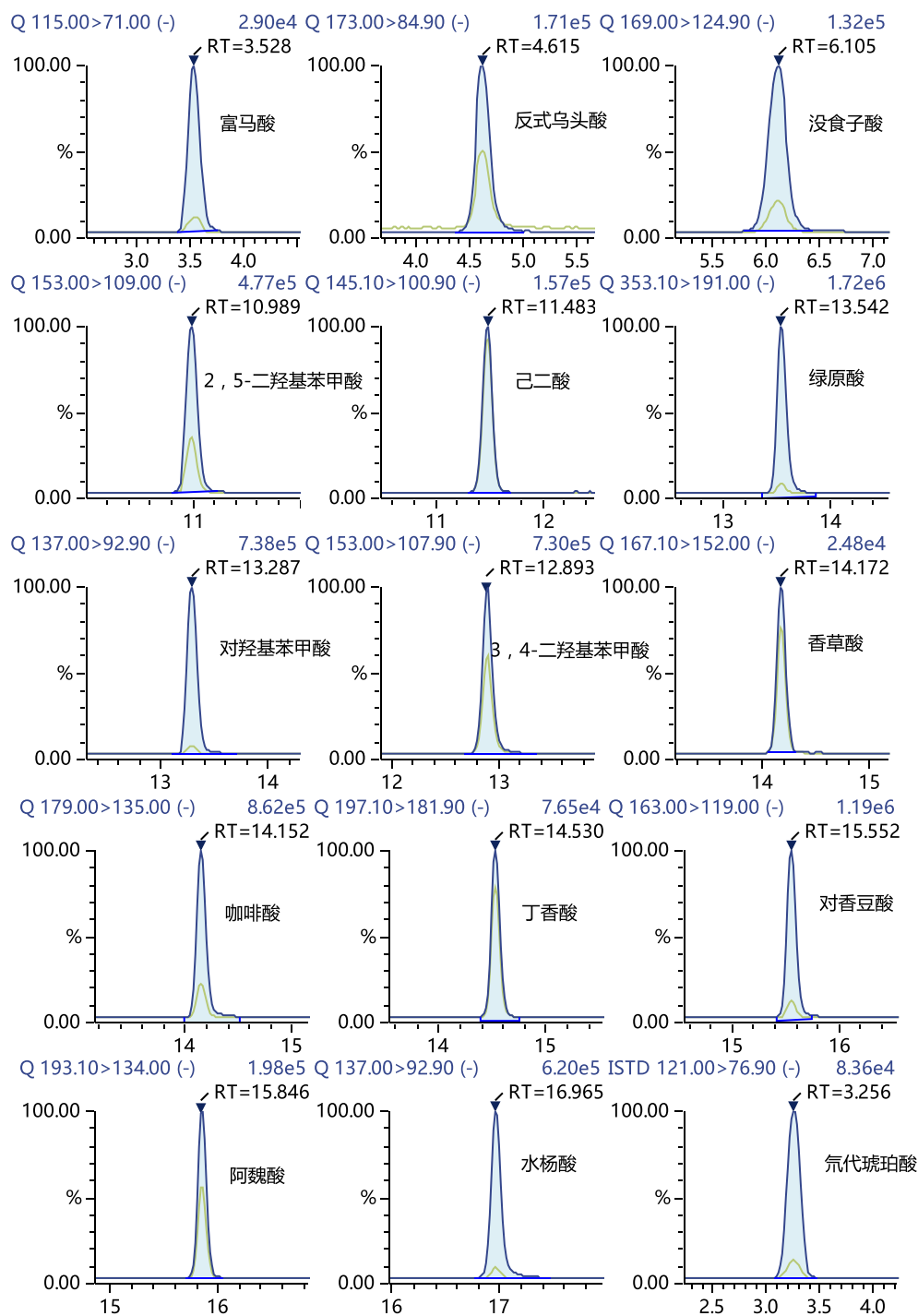
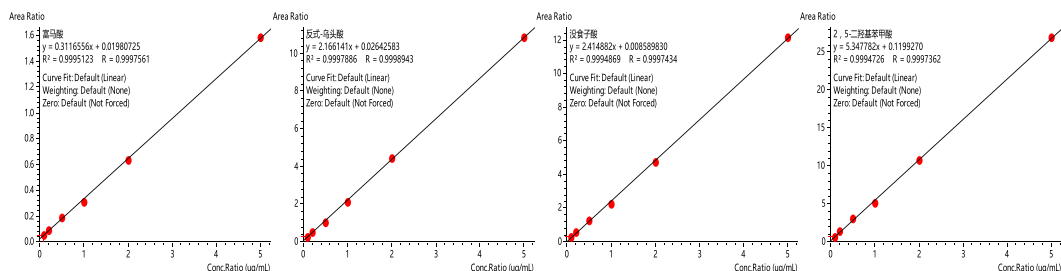


图 2 14 种有机酸及氘代琥珀酸内标物质的 MRM 谱图



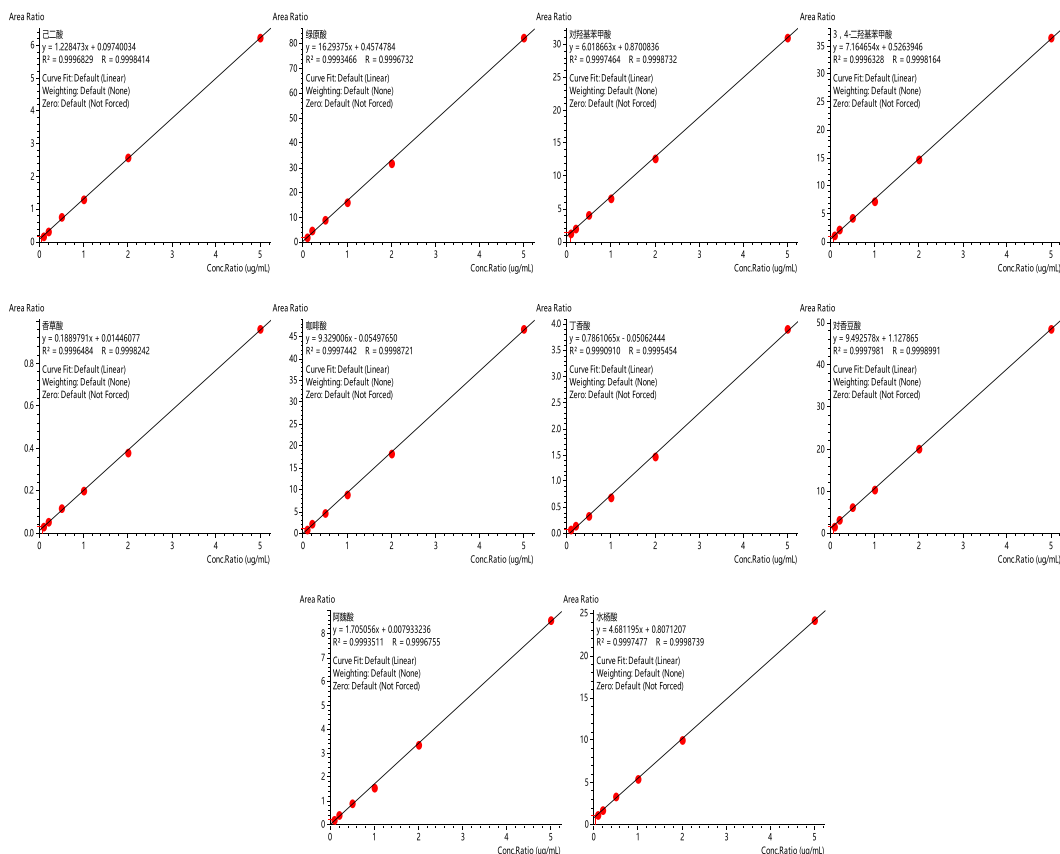


图 3 14 种有机酸物质的校准曲线图

表 3 14 种有机酸物质的校准曲线参数

序号	化合物名称	校准曲线	线性范围 (µg/mL)	相关系数 R	精确度 (%)
1	富马酸	$Y = 0.3116556X + 0.01980725$	0.1~5.0	0.9997	85.4~101.7
2	反式 - 乌头酸	$Y = 2.166141X + 0.02642583$	0.1~5.0	0.9998	88.1~101.3
3	没食子酸	$Y = 2.414882X + 0.008589830$	0.1~5.0	0.9997	89.7~103.1
4	2, 5- 二羟基苯甲酸	$Y = 5.347782X + 0.1199270$	0.1~5.0	0.9997	85.7~102.3
5	己二酸	$Y = 1.228473X + 0.09740034$	0.1~5.0	0.9998	83.9~106.6
6	绿原酸	$Y = 16.29375X + 0.4574784$	0.1~5.0	0.9997	84.3~102.3
7	对羟基苯甲酸	$Y = 6.018663X + 0.8700836$	0.1~5.0	0.9999	89.9~101.6
8	3, 4- 二羟基苯甲酸	$Y = 7.164654X + 0.5263946$	0.1~5.0	0.9998	93.4~106.1
9	香草酸	$Y = 0.1889791X + 0.01446077$	0.1~5.0	0.9998	82.3~100.9
10	咖啡酸	$Y = 9.329006X + 0.05497650$	0.1~5.0	0.9998	82.7~92.3
11	丁香酸	$Y = 0.7861065X + 0.05062444$	0.1~5.0	0.9995	83.6~102.4
12	对香豆酸	$Y = 9.492578X + 1.127865$	0.1~5.0	0.9999	85.9~110.1
13	阿魏酸	$Y = 1.705056X + 0.007933236$	0.1~5.0	0.9997	88.6~102.3
14	水杨酸	$Y = 4.681195X + 0.8071207$	0.1~5.0	0.9999	89.9~114.1

2.2 精密度实验

取低、中、高三个浓度的标准溶液，连续进样 6 次，仪器精密度实验考察结果详见表 4。该结果表明，各物质保留时间的 RSD 在 0.01%~0.30% 的范围，峰面积的 RSD 在 0.46%~5.02% 的范围，以上数据表明仪器的精密度良好。

表 4 精密度实验测试结果 (n=6)

序号	化合物名称	RSD% (0.2 µg/mL)		RSD% (0.5 µg/mL)		RSD% (1.0 µg/mL)	
		保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	富马酸	0.30	3.38	0.22	2.12	0.14	3.18
2	反式-乌头酸	0.22	1.84	0.18	2.60	0.14	1.14
3	没食子酸	0.28	1.78	0.07	2.73	0.14	1.13
4	2, 5- 二羟基苯甲酸	0.05	1.34	0.05	1.63	0.04	0.99
5	己二酸	0.03	1.29	0.05	2.36	0.03	1.81
6	绿原酸	0.01	0.87	0.03	0.46	0.03	1.04
7	对羟基苯甲酸	0.02	1.75	0.05	2.83	0.03	1.58
8	3, 4- 二羟基苯甲酸	0.02	1.45	0.05	1.11	0.03	0.68
9	香草酸	0.04	2.62	0.05	2.65	0.04	3.38
10	咖啡酸	0.02	2.20	0.04	1.15	0.03	1.24
11	丁香酸	0.03	5.01	0.05	5.02	0.03	1.91
12	对香豆酸	0.01	1.71	0.03	1.23	0.02	1.37
13	阿魏酸	0.01	2.16	0.02	1.41	0.02	1.22
14	水杨酸	0.02	2.39	0.03	1.33	0.02	1.68

2.3 样品加标回收率实验

取食品样品，按照 1.4 步骤制备样品和样品加标，在低中高三个加标浓度的水平下，进行回收率实验，结果详见表 5，各样品平行测定 2 次。该测定结果显示，干样品的低中高三个浓度梯度的加标回收率分别在 85.9%~97.6%、83.9%~101.2%、83.4%~101.9% 之间，鲜样品的低中高三个浓度梯度的加标回收率分别在 84.6%~94.9%、84.8%~102.1%、85.9%~103.8% 之间，均满足该检测方法的条件要求。

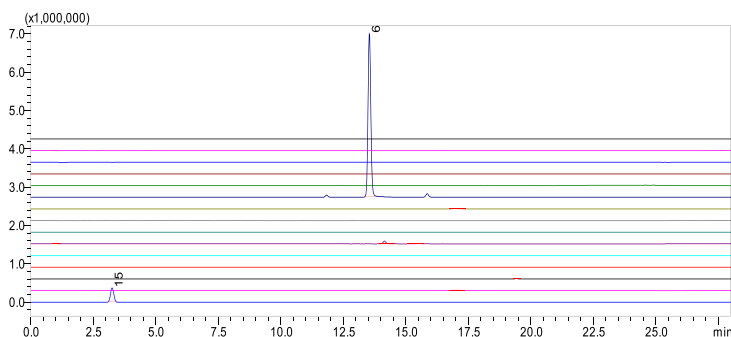


图 4 金银花样品谱图

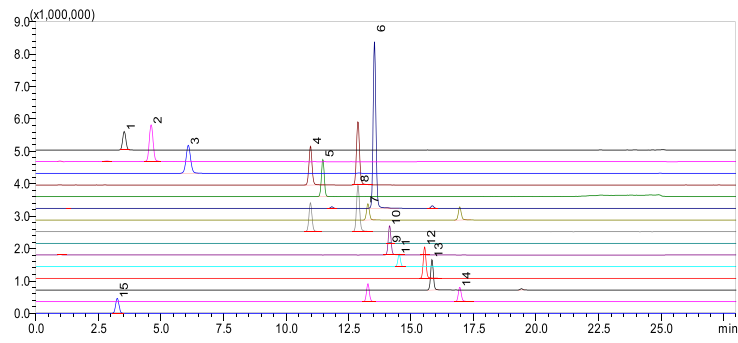


图5 金银花加标 160 µg/g 样品图谱

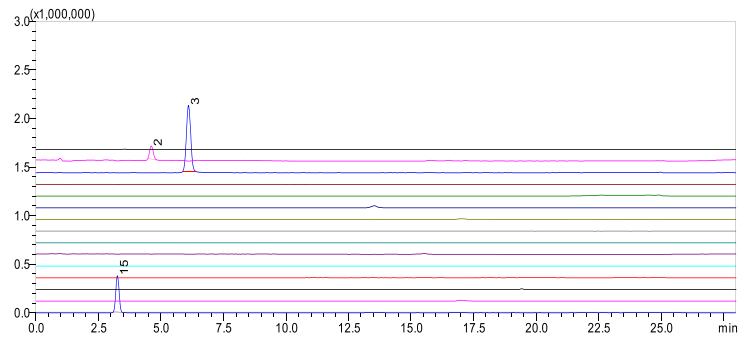


图6 橙子样品谱图

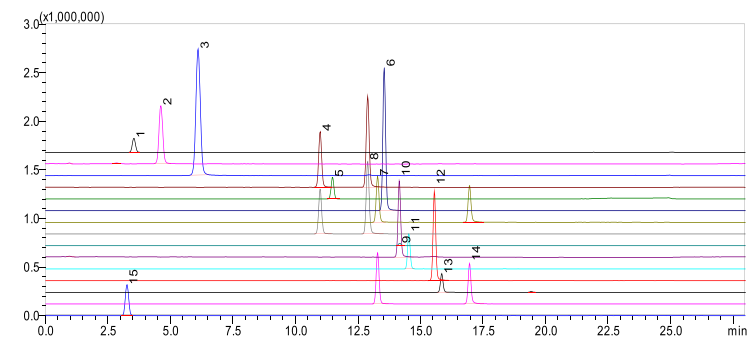


图7 橙子加标 24 µg/g 样品图谱

- (1. 富马酸 2. 反式-乌头酸 3. 没食子酸 4. 2, 5-二羟基苯甲酸 5. 己二酸 6. 绿原酸 7. 对羟基苯甲酸 8. 3, 4-二羟基苯甲酸 9. 香草酸 10. 咖啡酸 11. 丁香酸 12. 对香豆酸 13. 阿魏酸 14. 水杨酸 15. 氘代琥珀酸 (ISTD))

表 5 样品及加标回收率实验结果 (n=2)

序号	化合物名称	金银花样品含量 平均值 (μg/g)	金银花样品平均加标回收率 (%)			橙子样品含 量平均值 (μg/g)	橙子样品平均加标回收率 (%)		
			80 μg/g	160 μg/g	320 μg/g		12 μg/g	24 μg/g	48 μg/g
1	富马酸	N.D.	88.3	87.6	84.2	N.D.	91.6	90.3	89.3
2	反式-乌头酸	N.D.	89.6	84.8	85.7	5.0	88.6	93.4	92.7
3	没食子酸	N.D.	85.9	86.7	86.0	22.5	94.9	102.1	98.3
4	2, 5- 二羟基苯甲酸	N.D.	92.3	90.1	101.9	N.D.	92.2	93.8	85.9
5	己二酸	N.D.	86.9	88.9	83.4	N.D.	90.7	91.3	89.9
6	绿原酸	348.0	89.4	101.2	92.4	N.D.	87.4	86.6	88.8
7	对羟基苯甲酸	N.D.	93.4	90.1	90.1	N.D.	84.6	85.9	89.8
8	3, 4- 二羟基苯甲酸	N.D.	97.6	93.6	93.2	N.D.	91.3	92.5	90.6
9	香草酸	N.D.	88.9	84.6	86.7	N.D.	89.4	92.9	90.7
10	咖啡酸	N.D.	90.2	90.8	88.9	N.D.	90.6	91.4	103.8
11	丁香酸	N.D.	93.7	91.3	100.3	N.D.	86.4	84.8	89.7
12	对香豆酸	N.D.	89.4	86.7	88.1	N.D.	90.8	93.8	87.9
13	阿魏酸	N.D.	88.6	83.9	89.3	N.D.	90.7	90.3	89.3
14	水杨酸	N.D.	94.3	91.5	93.4	N.D.	89.9	87.7	88.0

N.D.: 表示未检出。

备注: 干样品加标量: 低、中、高浓度加标分别为 80 μg/g、160 μg/g、320 μg/g;

鲜样品加标量: 低、中、高浓度加标分别为 12 μg/g、24 μg/g、48 μg/g。

2.4 灵敏度实验

将最低浓度为 0.1 μg/mL 的 14 种有机酸混合标准溶液, 按 1.2 中的分析条件进行上机测定。通过软件计算分别得到检出限和定量限; 14 种有机酸成分的检出限和定量限情况详见表 6。在上述条件下, 14 种有机酸物质的 LOD 为 0.0003~0.010 μg/mL, LOQ 为 0.001~0.033 μg/mL, (干样 LOQ 为 0.17~5.50 μg/g; 鲜样 LOQ 为 0.03~0.83 μg/g), 测试结果表明仪器灵敏度良好, 满足 GB/T 40179—2021/GB/T 40179-2021 《植物中有机酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法》标准中测定低限的要求。

表 6 检出限和定量限

序号	化合物名称	检出限 (μg/mL)	定量限 (μg/mL)	干样 (μg/g)	鲜样 (μg/g)
1	富马酸	0.005	0.016	2.67	0.40
2	反式-乌头酸	0.002	0.008	1.33	0.20
3	没食子酸	0.001	0.004	0.67	0.10
4	2, 5- 二羟基苯甲酸	0.001	0.004	0.67	0.10
5	己二酸	0.005	0.018	3.00	0.45
6	绿原酸	0.001	0.004	0.67	0.10
7	对羟基苯甲酸	0.0003	0.001	0.17	0.03
8	3, 4- 二羟基苯甲酸	0.001	0.004	0.67	0.10
9	香草酸	0.010	0.033	5.50	0.83
10	咖啡酸	0.002	0.008	1.33	0.20
11	丁香酸	0.005	0.015	2.50	0.38
12	对香豆酸	0.001	0.004	0.67	0.10

13	阿魏酸	0.002	0.007	1.17	0.18
14	水杨酸	0.001	0.004	0.67	0.10

■ 结论

本实验使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，参照 GB/T 40179—2021/GB/T 40179-2021《植物中有机酸的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》标准，建立了植物源性食品中 14 种有机酸含量的分析检测方法。该检测方法中 14 种有机酸物质在 0.1~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性良好，相关系数 R 均大于 0.999；精密度实验中，14 种有机酸物质保留时间的 RSD 在 0.01%~0.30% 的范围，峰面积的 RSD 在 0.46%~5.02% 的范围，仪器精密度良好；在食品样品加标的情况下（干样加标量分别为：80 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、160 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和 320 $\mu\text{g}/\text{g}$ ；鲜样加标量分别为：12 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、24 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和 48 $\mu\text{g}/\text{g}$ ），样品的综合加标回收率分布在 83.4%~103.8% 的范围之间，能够满足标准要求；14 种有机酸物质的 LOD 为 0.0003~0.010 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，LOQ 为 0.001~0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，（干样 LOQ 为 0.17~5.50 $\mu\text{g}/\text{g}$ ；鲜样 LOQ 为 0.03~0.83 $\mu\text{g}/\text{g}$ ），测试结果表明仪器灵敏度良好，均能够满足标准要求。岛津 LCMS-8045 液质联用仪具有分析速度快、稳定性良好、结果准确度高等特点，能够满足 GB/T 40179-2021《植物中有机酸的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》的方法需求，也适用于多种相关行业的质量控制及分析检验工作。

岛津应用云

