

# 离子色谱-质谱联用(IC/MS)法检测 葡萄酒样品中的柠檬酸

周海波, 陈林<sup>†</sup>, 闫永利<sup>\*</sup>

(宁夏出入境检验检疫局, 银川 750001)

**摘要:** **目的** 建立了离子色谱-质谱联用技术测定葡萄酒样品中柠檬酸的分析方法。**方法** 以大容量、强亲水性的 IonPac AS20 型阴离子交换柱为分析柱, EGC 在线产生梯度浓度 KOH 为淋洗液, 淋洗液经捕获柱、抑制器成水后将样品带入质谱检测器。ESI-SIM 监测模式监控柠檬酸根离子( $m/z=191$ ), 并以峰面积进行定量。**结果** 该方法对柠檬酸的检出限( $S/N=3$ )为 17.6  $\mu\text{g/L}$ , 且柠檬酸浓度在 50~1000  $\mu\text{g/L}$  范围内具有良好的线性, 线性相关系数  $r=0.9992$ 。200  $\mu\text{g/L}$  标准溶液重复进样 8 次, 柠檬酸峰面积的相对标准偏差即精密度的 0.77%。运用该方法测定市售 5 种不同品牌葡萄酒样品中柠檬酸的含量, 并对样品加标回收, 得回收率大于 95%。**结论** 该方法可以满足葡萄酒中柠檬酸定量分析的要求, 且有效改善了分析的灵敏度和准确性。

**关键词:** 柠檬酸; 离子色谱串联质谱法; 葡萄酒

## Determination of citric acid in wine samples by ion chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (IC/MS)

ZHOU Hai-Bo, CHEN Lin<sup>†</sup>, YAN Yong-Li<sup>\*</sup>

(Ningxia Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of People's Republic of China, Yinchuan 750001, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a rapid method for determination of citric acid in wine samples by ion chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (IC/ESI-MS) in the negative ESI and selected ion monitor (SIM) mode. **Methods** Citric acid was separated by high capacity and hydroxide selective column IonPac AS20 with KOH eluent generated from EGC. Peak area of citrate ion ( $m/z=191$ ) was monitored for quantifying. **Results** The limit of detection was 17.6  $\mu\text{g/L}$  for citric acid. A linear calibration was obtained over the range from 50 to 1000  $\mu\text{g/L}$  with a correlation coefficient of 0.9992. The relative standard deviation for 8 injections of standard solution (200  $\mu\text{g/L}$ ) was 0.77%. This method was applied to detect the citric acid in different kinds of wine samples which were purchased in market, and the rates of recovery were higher than 95%. **Conclusion** The method could meet the requirements of quantitative analysis of citric acid in wine

基金项目: 宁夏科技支撑计划项目、2013 年度留学人员科技活动项目择优资助项目、宁夏科技厅科技公关项目

**Fund:** Supported by the Ningxia Key Technology Research and Development Program, the Scientific Research Starting Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Human Resources and Social Security of the People's Republic of China and the Ningxia Science and Technology Development Program

<sup>†</sup>共同第一作者

<sup>†</sup>Joint first authors

<sup>\*</sup>通讯作者: 闫永利, 研究员, 主要研究方向为食品检测。E-mail: yanyl@nxcq.gov.cn

**\*Corresponding author:** YAN Yong-Li, Professor, Ningxia Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.135, Xuerong Road, Yinchuan 750001, China. E-mail: yanyl@nxcq.gov.cn

samples, and also could improve the sensitivity and accuracy of the analysis.

**KEY WORDS:** citric acid; IC/ESI-MS; wine

柠檬酸(citric acid)具有温和、清爽的酸味,常被用作食用酸味剂应用于葡萄酒的生产。在有机酸的市场中,柠檬酸的市场占有率超过70%,到目前为止,还没有任何一种可以取代柠檬酸的酸味剂。适量的柠檬酸可以使葡萄酒的口感更好,但柠檬酸摄入量过大会导致人体的酸碱度不平衡,容易引发多种疾病<sup>[1]</sup>。柠檬酸促进体内钙的排泄和沉积,有可能导致低钙血症,并且会增加患十二指肠癌的概率,所以柠檬酸的使用范围,尤其是在葡萄酒中的使用是受到严格限制的<sup>[2-3]</sup>。因此食品中柠檬酸的定性定量分析技术对食品营养与安全有着重要的意义。

目前,测定柠檬酸的方法有液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳法、微分电位溶出法、傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared, FT-IR)<sup>[4]</sup>等,每种方法有各自的适用范围与优、缺点。如液相色谱法灵敏度较高,但是样品的预处理操作繁琐,测定周期长、实验成本高、测定完后需要清除残留样品<sup>[2]</sup>。由于不易挥发或热不稳定的酸类在进样之前往往需要进行衍生化反应,导致样品的前处理比较困难且费时,成为气相色谱检测有机酸的瓶颈<sup>[5]</sup>。选择合适的提取分离及分析测定方法,除了要考虑所测食品的组织结构性外,还要考虑食品中其他成分对柠檬酸的干扰。

只用水的免化学试剂离子色谱技术(reagent free ion chromatograph, RFIC)样品用量少,且一般不需做复杂的前处理,进一步节省分析时间和劳力,降低了仪器的使用费用,消除人工配制淋洗液所带来的误差,提高了方法的精密度和重现性<sup>[6]</sup>。可以满足葡萄酒中柠檬酸定量分析的要求,有效地改善了分析的重现性。目前,IC技术应用于苹果汁<sup>[7]</sup>、葡萄酒<sup>[8-9]</sup>、啤酒<sup>[10]</sup>、桑椹原汁<sup>[11]</sup>、菠萝<sup>[12]</sup>等食品用柠檬酸的分析已有诸多报道。然而离子色谱-质谱联用技术解决了传统液相检测器灵敏度和选择性不够的缺点,提供了可靠、精确的相对分子质量及结构信息<sup>[13]</sup>,简化了实验步骤,节省了样品准备时间和分析时间。本实验应用离子色谱-质谱联用技术相建立了对柠檬酸检测方法,结果表明,此法对柠檬酸分离灵敏度高、样品处理简单、效果较好。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

离子色谱仪(美国 Dionex ICS-3000),配有EGC淋洗液自动发生器,电导检测器和 Chromeleon 6.80 色谱工作站; IonPac AS20 型阴离子分析柱(2 mm×50 mm); IonPac AG20 型保护柱(2 mm×50 mm); ASRS 300-2 mm 阴离子抑制器。质谱系统(美国 Dionex MSQ plus),配有电喷雾离子化源(electrospray ionization, ESI)。乙腈,实验用水均为电阻率不低于 18.2 MΩ·cm 的去离子水。

### 1.2 标准溶液的配制

准确称取柠檬酸 0.1 g,置于 100 mL 的容量瓶中,用去离子水定容至刻度线,得到柠檬酸浓度为 1000 mg/L 的标液。用逐级稀释法配置 25、50、100、200、400、800、1000 μg/L 的梯度标准溶液。

### 1.3 色谱/质谱条件

水相流速: 0.35 mL/min; EGC 淋洗液: 采用淋洗液发生器产生的高纯 KOH 溶液;进样量: 25 μL; 柱温: 35 °C; Dwell time: 0.5 s。梯度淋洗条件见表 1。

表 1 梯度淋洗液的条件  
Table 1 Gradient condition for separation

	时间/min	KOH 浓度×10 <sup>-3</sup> /(mol·L <sup>-1</sup> )
	0	2
	21	50
梯度程序	25	50
	25.5	2
	30	2

电喷雾离子化源(ESI),负离子模式,源温度 450 °C;选择离子监测(selected ion monitor, SIM),离子质量数 191,驻留时间 0.4 s,碰撞能量-50 V。

### 1.4 实际样品的处理

5 种宁夏产干红葡萄酒均采购于超市,测定前用去离子水稀释 1000 倍,并在进样测定前用 0.2 μm 的过滤膜过滤处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱质谱条件的优化

本实验采用电导和串联质谱双重检测。IonPac AS20 分析柱是亲水性, 高柱容量离子交换型色谱柱, 对在常规离子交换柱上保留很弱的一价有机酸有较强保留, 峰形较好。但由于在同时进样中有保留强弱不同的多种离子的存在, 采用等浓度淋洗会出现共淋洗或强保留组分无法洗脱现象。故本实验采用了梯度淋洗的方法分离了柠檬酸, 梯度程序如表 1 所示。无机酸和碱会影响质谱检测器的离子喷雾源, 影响目标离子的检测, 因此, 载有样品的淋洗液进入质谱检测器之前需要先用抑制器将 KOH 淋洗液抑制为水。

根据柠檬酸的结构特征, 选择电喷雾(ESI)离子源, 在负离子模式下进行质谱分析, 在 100~300 范围内全扫描, 根据柠檬酸的分子量, 确定信号较高的  $m/z = 191$  为定量离子, 采用峰面积外标法定量, 其分子离子为  $[M-H]^-$  型。最后以 SIM 模式对质谱参数包括离子源温度、离子碰撞能量及驻留时间进行优化, 调整至灵敏度最高。经过条件优化, 最终选定的质谱条件见 1.3。

电导检测对于测定简单样品, 具有良好的效果, 而对于复杂基质的样品, 则不能满足灵敏度和准确性的要求, 难以实现对复杂样品中对柠檬酸的测定。质谱检测具有选择性强, 灵敏度高的优势, 运用离子

色谱-质谱联用技术选择离子监测, 可以准确定量 ng/L 浓度的柠檬酸<sup>[14]</sup>。

图 1 和图 2 分别是柠檬酸标准样品电导检测和质谱检测的色谱图, 质谱图出峰时间较电导色谱图出峰时间晚 0.474 min, 从图中可以看出由于实际样品中成分复杂, 选用电导进行检测时, 基体严重干扰了柠檬酸的测定, 灵敏度和准确性大大下降, 而以质谱为检测器时则不存在干扰问题, 并且灵敏度和准确度比电导检测有显著提高。

### 2.2 线性范围、检出限和精密度

将柠檬酸的梯度标准溶液进样, 考察了此方法的线性范围。当柠檬酸浓度在 50~1000  $\mu\text{g/L}$  范围内, 标准曲线线性良好, 线性回归方程为  $Y = 535.62X + 13565.44$ ,  $r = 0.9992$ , 检出限为 17.6  $\mu\text{g/L}$ 。准确度在选定的色谱和质谱条件下, 分别用 200  $\mu\text{g/L}$  标准溶液重复进样 8 次, 计算得柠檬酸含量相对标准偏差即精密度为 0.77%。

### 2.3 样品分析和回收率

用所拟定的实验方法对市售 5 种葡萄酒中柠檬酸含量进行测定。将葡萄酒样品用水稀释 1000 倍后, 再用孔径为 0.2  $\mu\text{m}$  的滤膜进行过滤, 然后直接进样分析。采用标准加入法检验方法的回收率, 葡萄酒加入标样前后得到的质谱检测色谱分离图见图 3 和图 4, 分析结果与方法的回收率见表 2。

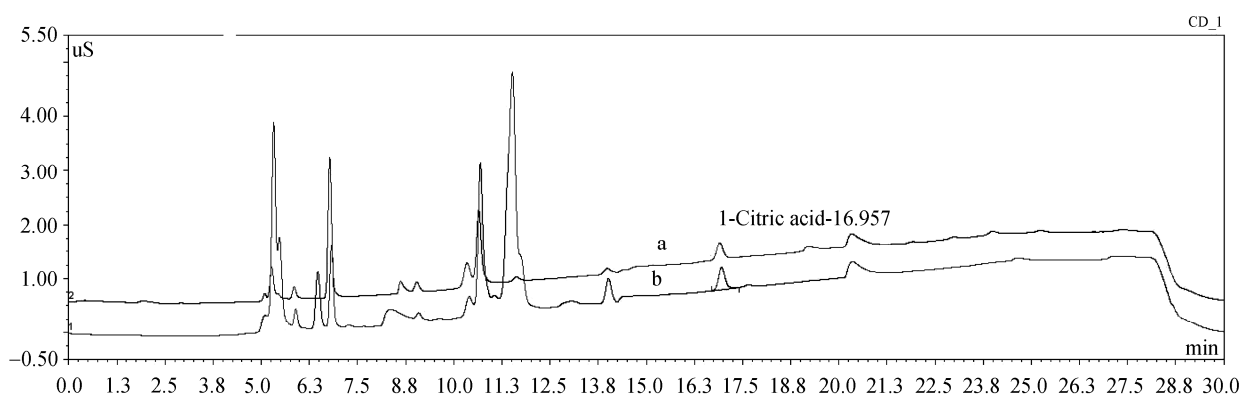


图 1 标准溶液和葡萄酒样品柠檬酸电导检测色谱分离图

Fig. 1 Conductivity detection chromatogram of citric acid in standard solution and wine sample

a: standard solution, b: wine sample

注: a: 标准溶液; b: 葡萄酒样品

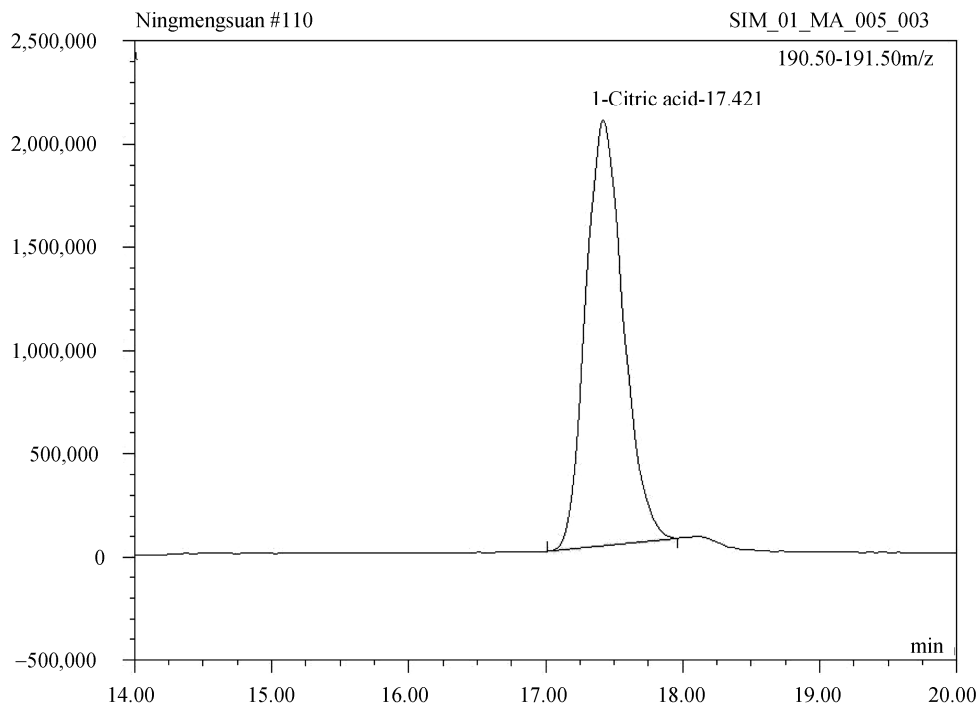


图2 葡萄酒样品柠檬酸质谱检测色谱分离图

Fig. 2 Mass spectrum detection chromatogram of citric acid in wine sample

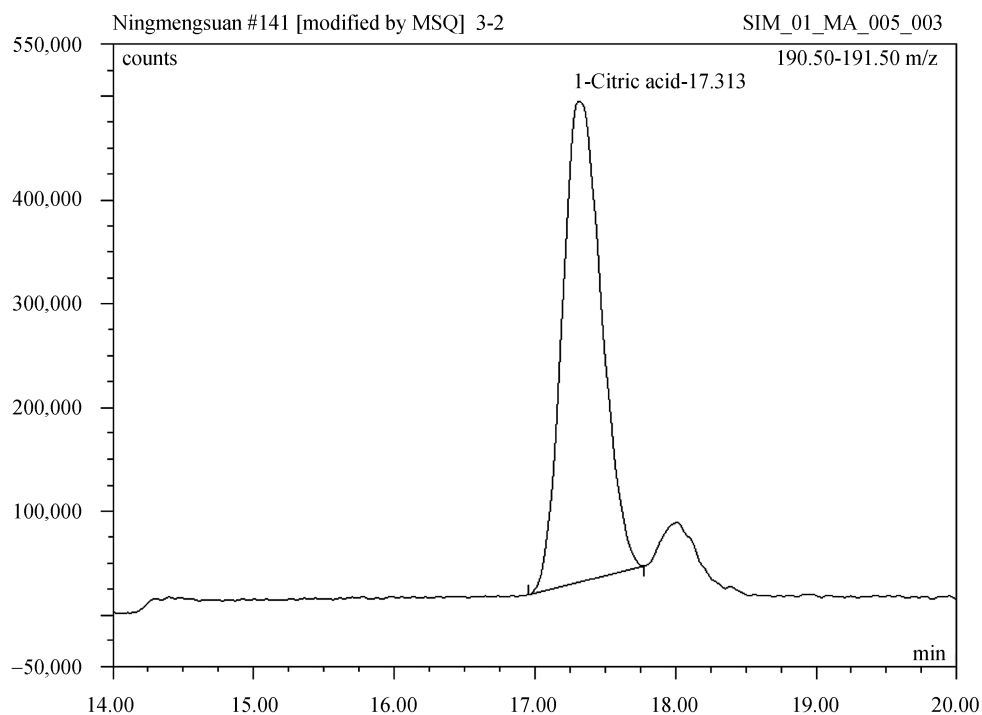


图3 葡萄酒加标前柠檬酸质谱检测色谱分离图

Fig. 3 Mass spectrum chromatogram of citric acid in wine sample before adding standard solution

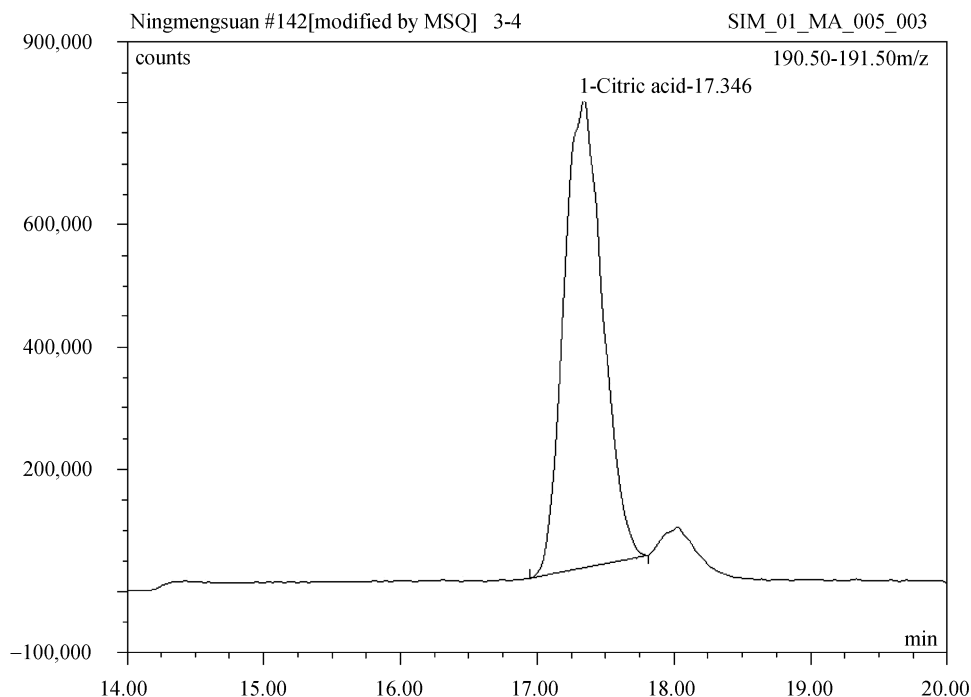


图 4 葡萄酒加标后柠檬酸质谱检测色谱分离图

Fig. 4 Mass spectrum chromatogram of citric acid in wine sample after adding standard solution

表 2 样品分析及回收率

Table 2 Results and recoveries of citric acid in wine samples

葡萄酒样品	样品测定值 $/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	加入量 $/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	加标后测定值 $/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率 /%	标准偏差 /%	样品中柠檬酸含量 $/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
一	129.25	200	321.02	97.5	1.76	129.25
二	267.51	200	490.78	95.26	3.61	267.51
三	286.51	200	502.91	96.74	2.12	286.51
四	502.28	200	685.56	102.44	1.93	502.28
五	652.33	200	882.97	103.59	4.22	652.33

### 3 结 论

本文采用离子色谱-质谱联用检测葡萄酒中的柠檬酸, 前处理过程简单、且无需使用有机溶剂。也是由于该过程的未采用有机溶剂, 就会导致在离子色谱电导检测时, 基质峰干扰较大, 而配合质谱检测的应用, 可以有效避免由于紧靠保留时间来判断引入的不确定性, 降低检测限, 增加检测的灵敏度和准确性。

采用离子色谱-质谱联用法, 以 IonPac AS20 型阴离子分析柱为分离柱, 水相流速  $0.35 \text{ mL/min}$ , 柱温

$35 \text{ }^\circ\text{C}$ , KOH 梯度淋洗, 分析了葡萄酒中柠檬酸, 其含量和峰面积之间呈良好的线性关系, 精密度为  $0.77\%$ , 加标回收率大于  $95\%$ , 是一种简便、快速、准确的方法, 适用于葡萄酒中柠檬酸的定性、定量分析。

### 参考文献

- [1] 孙倩倩, 姜子涛, 李荣, 等. 钛胶反相高效液相色谱法测定饮料中的柠檬酸[J]. 中国酿造, 2012, 7: 151-155.  
Sun QQ, Jiang ZT, Li R, *et al.* Titania-based reverse-phase high performance liquid chromatographic method for determination of citric acid in beverage [J]. China Brew, 2012, 7: 151-155.

- [2] 杜家菊, 赵建飞. 食品中柠檬酸检测方法的研究进展[J]. 山东理工大学学报: 自然科学版, 2009, 23(5): 98-103.  
Du JJ, Zhao JF. A review on determination methods of citric acid in food [J]. J Shandong Univ Tech, 2009, 23(5): 98-103.
- [3] 樊惠民, 余实, 谭远方. 食品中柠檬酸的检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(4): 205-208.  
Pan HM, Yu S, Tan YF. Detection of citric acid in food [J]. J Food Safe Qual, 2011, 2(4): 205-208.
- [4] Regmi U, Palma M, Barroso CG, *et al.* Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometric techniques [J]. Anal Chim Acta, 2012, 732(30): 137-144.
- [5] 唐长波, 岳田利. 色谱法分析食品中的有机酸[J]. 食品科技, 2006, 10: 249-251.  
Tang CB, Yue TL. Chromatographic analysis of organic acids in foods [J]. Food Sci Technol, 2006, 10: 249-251.
- [6] 高志亮, 李志煌, 范群艳, 等. 离子色谱法测定燕窝中的多聚磷酸盐[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(5): 490-494.  
Gao ZL, Li ZH, Fan QY, *et al.* Determination of polyphosphates in bird's nest by ion chromatography [J]. J Food Safe Qual, 2012, 3(5): 490-494.
- [7] 原小寓, 吴伟, 于泓. 有机酸的非抑制型离子排斥色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(1): 76-78.  
Yuan XY, Wu W, Yu H. Determination of organic acids by ion-exclusion chromatography with non-suppressed conductivity detection [J]. J Instrum Anal, 2008, 27(1): 76-78.
- [8] 徐继明. 单柱离子排斥色谱法测定葡萄酒中的多种有机酸[J]. 淮阴师范学院学报, 2005, 4(2): 124-126.  
Xu JM. Separation and Determination of organic acids in red wine by single ion-exclusion chromatography with conductometric detection [J]. J Huaiyin Teach Coll, 2005, 4(2): 124-126.
- [9] 吴飞燕, 贾之慎, 朱岩. 离子色谱电导检测法测定酒中的有机酸和无机阴离子[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2006, 33(3): 312-315.  
Wu FY, Jia ZS, Zhu Y. Determination of organic acid and inorganic anion by suppressed electric conductance ion chromatography [J]. J Zhejiang Univ, 2006, 33(3): 312-315.
- [10] 姚浔平, 李小平, 陈晓红, 等. 离子排斥色谱法测定啤酒和饮料中有机酸研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(5): 801-803.  
Yao XP, Li XP, Chen XH, *et al.* Study on determination of organic acids in beer and beverages by ionic exclusion chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(5): 801-803.
- [11] 陈智毅, 陈卫东, 徐玉娟, 等. 离子排斥色谱法测定桑椹原汁有机酸的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 296-298.  
Chen ZY, Chen WD, Xu YJ, *et al.* Determination of organic acids in mulberry raw juice by ion exclusion chromatography [J]. Food Sci, 2007, 28(3): 296-298.
- [12] 王海蓝, 李雪萍, 陈维信. 离子色谱法测定贮藏期间菠萝果实的有机酸变化[J]. 热带作物学报, 2010, 31(10): 1720-1725.  
Wang HL, Li XP, Chen WX. Determination of organic acid components in pineapple during storage by ion chromatography [J]. Chin J Trop Crops, 2010, 31(10): 1720-1725.
- [13] Murad IH, Kazuhiko T, Hiroshi T, *et al.* Qualitative analysis of some carboxylic acids by ion-exclusion chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection [J]. J Chromat, 2002, 956(1-2): 201-208.
- [14] 张萍, 史亚利, 王亚鞅, 等. 离子色谱-质谱联用技术测定污泥样品中的痕量高氯酸盐[J]. 分析化学, 2007, 35(1): 131-134.  
Zhang P, Shi YL, Wang YH, *et al.* Determination of trace level perchlorate in sludge samples by ion chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2007, 35(1): 131-134.

(责任编辑: 赵静)

## 作者简介



周海波, 博士, 主要研究方向为食品安全与检测技术。  
E-mail: zhouhb@nxciq.gov.cn



陈林, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测。  
E-mail: chenl@nxciq.gov.cn



闫永利, 研究员, 主要研究方向为食品检测。  
E-mail: yanyl@nxciq.gov.cn