

应用纪要

一种测定饮料中柠檬酸含量的快速、准确、灵活的LC-PDA方法

Dimple D. Shah

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

柠檬酸常用作添加剂来改善饮料的口感和风味，还可以用作抗氧化剂。本研究使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱、ACQUITY UPLC H-Class系统和ACQUITY UPLC PDA检测器开发了一种柠檬酸分析方法，通过评估峰形、线性和精密度等参数评价该方法的性能。使用开发的方法分析能量和运动饮料样品，使用Empower 3软件报告样品中柠檬酸的定量结果。ACQUITY Premier CSH苯己基柱结合ACQUITY UPLC H-Class系统、ACQUITY UPLC PDA检测器和Empower 3软件，可以定量分析各种饮料中的柠檬酸。

优势

使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱结合ACQUITY UPLC H-Class系统和ACQUITY UPLC PDA检测器分析柠檬酸可以发挥以下优势：

- 提供简单、准确、灵敏的柠檬酸UPLC-PDA分析方法
- 在运动和功能性饮料质控指标分析中使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱改善柠檬酸的峰形和灵敏度，使其满足产品规格，并简化分析流程
- 使用Empower 3 QuickStart界面收集和處理数据

简介

柠檬酸是一种含有三个羧基的弱有机酸，天然存在于许多水果中，尤其是柠檬和酸橙等柑橘类水果中。柠檬酸虽然是天然存在的物质，但在多种饮料中也常用作添加剂来改善口感、风味，还可以用作抗氧化剂¹。质量控制检查旨在确保产品所含成分符合规格，保证口感一致，因此监测饮料中的柠檬酸非常有用。

柠檬酸具有极性特点，使用传统硅胶C₁₈反相色谱柱难以保留。传统反相色谱方法并不总能产生足够的保留性或选择性，这可能会导致柠檬酸与饮料中的其他成分共洗脱，为峰积分带来挑战。许多文献发布的方法建议使用离子色谱(IC)、毛细管电泳(CE)或滴定法来测定柠檬酸^{2,3}，这些方法可能难以实施并且非常耗时，还需要专门的仪器和员工培训。为确保产品一致性，顺利将产品推向市场，亟需一种可靠、简单且准确的方法。

高效液相色谱(HPLC)是一种成熟的常规食品检测工具，它可以在单一平台上进行多项检测，且能够使用自动进样器技术和一系列检测器选项，兼具准确度和灵敏度。使用Empower 3等色谱数据软件，可以自动捕获样品分析信息、进行数据管理、生成样品报告，帮助科学家和实验室管理者轻松找到样品分析信息。

使用HPLC的一项挑战是柠檬酸会与分析流路（包括色谱柱）的表面相互作用，其检测结果和峰形可能会因此受到影响。本技术简报介绍了一种使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱定量分析饮料中柠檬酸的UPLC-PDA方法。

结果与讨论

本研究评价了流动相组成中不同浓度磷酸钠缓冲液和甲酸带来的影响。之前针对各种有机酸（包括柠檬酸）的分析开发了一种不使用缓冲液的方法，该方法在LC-MS检测器中使用甲酸作为水性流动相/有机流动相的添加剂⁴。PDA以三个维度（光强度、时间和波长）检测整个谱图。对于HPLC-PDA方法而言，流动相缓冲液或添加剂与目标检测分析物之间的吸光度差异至关重要。柠檬酸的吸光度(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LC-PDA检测器。使用较低浓度的磷酸钠缓冲液观察到良好的峰形和灵敏度。因此，本研究使用含10 mM磷酸钠缓冲液的水和乙腈溶液开发了用于柠檬酸分析的UPLC-PDA方法。

此外，HPLC方法中使用的流动相添加剂会导致目标分析物峰拖尾和峰面积减小，其主要因素之一是分析物与分析柱表面或液相色谱流路之间的相互作用。分析物通常会与表面发生次级相互作用，结果表现为峰拖尾或峰面积减少。通过钝化液相色谱系统和色谱柱尽量减少分析物与表面之间的相互作用有多种方法，但其中一些钝化方法非常耗时，需要许多溶剂，且流动相中含有的添加剂会导致离子抑制或色谱变化。为解决金属相互作用的问题，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。在之前的研究中，使用ACQUITY Premier色谱柱已观察到柠檬酸的峰形和灵敏度显著改善⁵。本研究使用ACQUITY Premier色谱柱，结合10 mM磷酸钠缓冲液和乙腈溶液的梯度，针对柠檬酸分析开发了UPLC-PDA方法。使用Empower 3软件收集和处理数据。

ACQUITY UPLC PDA检测器的谱图分析范围为190~500 nm，在该谱图范围中，可以从分析物显示最大吸光度的PDA数据中提取色谱图，所以本次分析选择波长210 nm。因此，选择210 nm作为PDA通道。图1显示了UPLC-PDA上200 ppm柠檬酸的色谱性能和溶剂标准品校准曲线。用水连续稀释制得12.5 ppm~600 ppm的溶剂标准品，重复进样三次。采用1/X加权，柠檬酸分析在整个校准品范围内的线性高于0.999，残差小于5%。

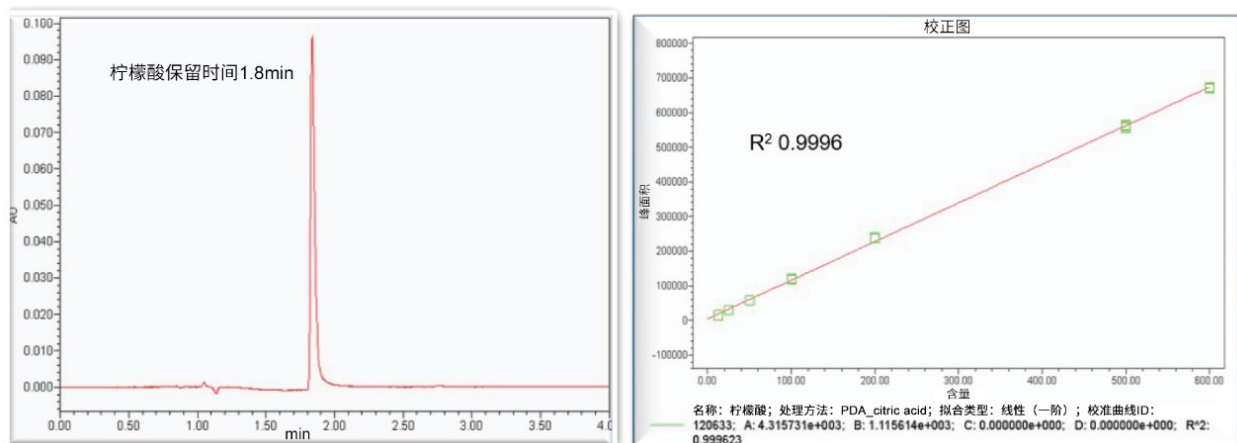


图1.使用ACQUITY Premier色谱柱和LC-PDA方法分析柠檬酸获得的色谱性能和溶剂标准品校准曲线。标准品的浓度为200 ppm，在PDA上的210 nm通道进行观察。

使用该方法分析从当地杂货店购买的功能和运动饮料样品。两种样品的成分标签上都标明含有柠檬酸。将两种样品使用HPLC级水稀释十倍，并在进样前使用Acrodisc针式过滤器(13 mm 0.2 μ m PVDF)过滤。图2和图3分别显示了运动饮料和功能饮料样品的色谱图和七次重复进样的数据汇总。从图2和图3可以看出，柠檬酸（保留时间1.8分钟）峰在色谱柱上得到充分保留，并且与基质干扰物和其他成分完全分离。两种样品的保留时间、峰面积和计算含量的%RSD均小于0.6%。两种样品均显示出良好的柠檬酸峰形，USP拖尾因子小于2.2。报告样品中柠檬酸的含量时需要考虑稀释因子。为了计算样品中柠檬酸的含量，将稀释因子添加到Empower软件中。Empower软件会根据溶剂标准品曲线定量样品，并使用稀释因子自动计算样品中柠檬酸的含量，同时生成报告。自动计算含量并生成报告减少了人工操作、计算任务以及错误。

以下报告显示了运动饮料和功能饮料中柠檬酸的计算含量。在运动饮料和功能饮料中检测到柠檬酸的含量分别为1706 ppm (1.7 g/L)和6687 ppm (6.6 g/L)。

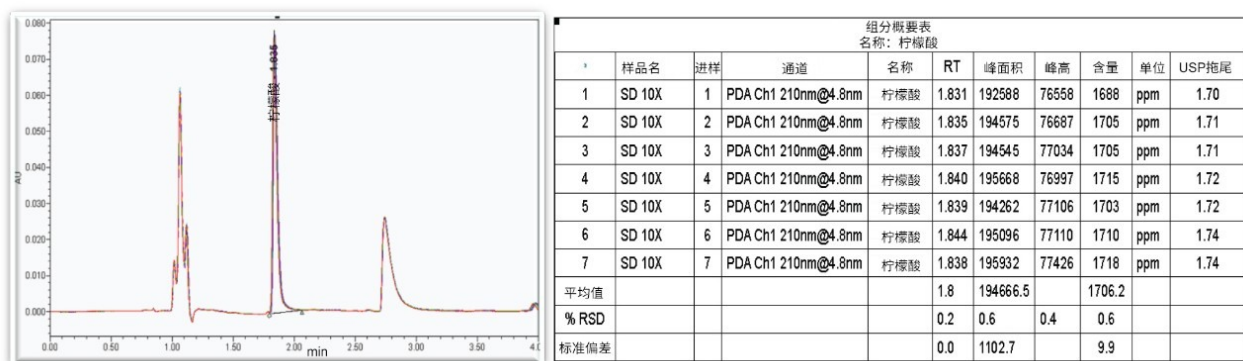


图2.含有柠檬酸的运动饮料七次进样的叠加色谱图。Empower汇总表中报告了峰面积、保留时间和计算含量。此处报告了平均值、%RSD和标准偏差。

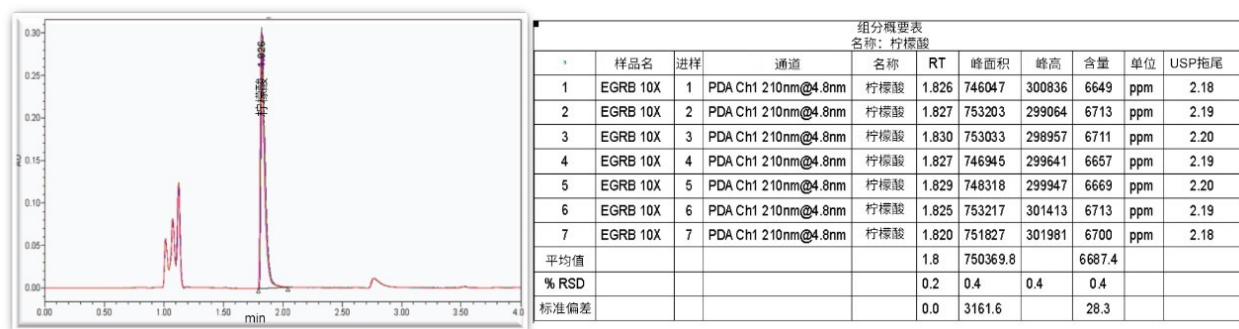


图3.含有柠檬酸的功能饮料七次进样的叠加色谱图。Empower汇总表中报告了峰面积、保留时间和计算含量。此处报告了平均值、%RSD和标准偏差。

结论

ACQUITY Premier色谱柱减少了分析物与表面之间的相互作用，提供了可接受的峰形和灵敏度。使用开发的UPLC-PDA方法分析运动和功能饮料在保留时间、峰形和峰面积方面显示出良好的重复性。Empower 3软件可自动计算样品中柠檬酸的含量。UPLC-PDA分析方法结合简单的数据解析软件可以提高样品通量，适用于运动和功能饮料中柠檬酸的质量控制。

参考资料

1. Determination of Citric Acid in Fruit Juices Using HPLC: Katie Weikle, Department of Chemistry, Concordia College, 901 8th St S, Moorhead, MN 56562.
2. Sass-Kiss, A.; Toth-Markus, M.; Sass, M. Chemical Composition of Citrus Fruits (Orange, Lemon, and Grapefruit) with Respect to Quality Control of Juice Products. *Nutraceutical Beverages*, 2004, 871, 24–34.
3. G.Saccani.; S.Gherardi.; A.Trifirò.; C.Soresi Bordini.; M.Calza.; C.Freddi. [Use of Ion Chromatography for the Measurement of Organic Acids in Fruit Juices.](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967395002063) <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967395002063>>
4. Dimple Shah, Kerri Smith, Jinchuan Yang, Peter Hancock.使用 ACQUITY H-Class Plus UPLC 和 QDa 质谱检测器分析各种饮料中的 14 种有机酸。
5. 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, 720006727ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/tca-cycle-analytes-by-mixed-mode-chromatography-mass-spectrometry.html>> , 2020年修订.

特色产品

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

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007290ZH, 2021年6月

