

## 毛细管电泳-质谱联用法测定糖蜜酒精废液中的有机酸\*

徐远金<sup>1,2</sup> 许桂苹<sup>1</sup> 李永库<sup>1</sup>

1(广西大学糖业工程技术研究中心, 南宁, 530004) 2(广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁, 530004)

**摘要** 建立了毛细管电泳-质谱联用法同时测定酒石酸、丙二酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸、戊二酸和谷氨酸的方法。研究了电泳条件和质谱条件对有机酸分离的影响。以 50.0 mmol/L 醋酸铵(用 1.0 mol/L 醋酸调至 pH 4.5)为缓冲溶液, 30% 异丙醇(含 1.0 mmol/L 氨水)作为鞘液, 以保留时间和质荷比对分离出的组分予以定性确证, 用峰面积进行定量。结果表明, 酒石酸、丙二酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸、戊二酸和谷氨酸的线性范围分别为 1.0~100.0, 4.0~200.0, 1.0~100.0, 4.0~200.0, 2.0~160.0, 1.0~80.0 和 1.0~80.0 mg/L; 相对偏差均小于 8.5%; 检出限分别为 0.3, 1.0, 0.3, 1.0, 0.5, 0.3, 0.3 mg/L。该法用于糖蜜酒精废液中有机酸的测定, 结果令人满意。

**关键词** 毛细管电泳-质谱联用, 糖蜜酒精废液, 有机酸

糖蜜酒精废液中含有大量有机酸, 而有机酸会影响酵母液的成分, 甚至部分高浓度的有机酸对酵母液有毒害作用, 影响糖蜜酒精废液的再利用。因此对糖蜜酒精废液中有机酸含量进行测定, 为进一步处理糖蜜酒精废液提供了依据, 对糖蜜酒精废液再利用具有重要意义。

采用气相色谱法进行有机酸分析时, 常因有机酸的沸点较高、不易气化而需要先对其衍生再进行测定, 方法繁琐且影响测定结果的准确性。高效液相色谱法<sup>[1]</sup>和离子色谱法<sup>[2]</sup>是分析有机酸的有效方法, 但糖蜜酒精废液中除了含有大量的低聚糖类、果胶、醇类等有机物外, 还有大量的  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  等无机离子<sup>[3]</sup>, 这就使得采用高效液相色谱法和离子交换色谱法测定糖蜜酒精废液中的有机酸相当困难。有机酸的毛细管电泳(CE)分析始于 1990 年代初<sup>[4]</sup>, 由于 CE 具有柱效高、分离时间短、消耗溶剂少等特点, 已被广泛应用于不同基质样品, 如食品<sup>[5]</sup>、尿液<sup>[6]</sup>、环境<sup>[7]</sup>等样品中有机酸的分析。但 CE 常用的紫外检测器由于受到光路较短的影响, 灵敏度略显不足, 而且只靠保留时间定性, 选择性不高。而质谱(MS)可以提供分子量和结构碎片信息, 具有很高的选择性和灵敏度。CE-MS 在一次分析中可同时得到迁移时间、分子量和碎片特征信息, 为复杂样品的定性、定量分析提供了一种强有力的手段<sup>[8]</sup>。Hagberg<sup>[9]</sup>和 Sawada<sup>[10]</sup>曾用 CE-MS 测定食品中的有机酸。但采用 CE-MS 法同时分析酒石酸、丙二酸、苹果酸、乳酸、

琥珀酸、戊二酸和谷氨酸有机酸的研究尚未见报道。

在 CE-MS 联用法中, 由于受到 CE-MS 接口中的离子化技术的限制, 很多 CE 方法因使用高浓度电解质和硼酸盐、表面活性剂等而不能直接应用到 CE-MS 方法中。CE-MS 中最常使用的缓冲液主要有甲酸、乙酸的铵盐等挥发性物质。文中考察了电泳和质谱条件对有机酸分离的影响, 建立了 CE-MS 联用法同时测定糖蜜酒精废液中的酒石酸等 7 种有机酸的方法。

## 1 实验部分

## 1.1 仪器与试剂

仪器: Agilent HP<sup>3D</sup> CE 毛细管电泳仪和 1100 MSD TRAP SL 质谱仪(通过 CE-MS 喷雾组件连接, 德国); 鞘液通过 Agilent 1100 等梯度泵, 1:100 分流器提供(德国); 未涂层弹性石英毛细管 50  $\mu\text{m}$   $\times$  83 cm(河北锐丰); Orion868 型 pH/ISE 测试仪(美国); SartrouisuME215S 电子天平(德国); Waters Pro Plus 超纯水仪(美国)。

试剂: 甲醇, 乙腈和异丙醇(色谱纯, Fisher 公司), 氨水, 醋酸和醋酸铵(分析纯, 上海试剂一厂); 海美溴铵(Sigma, 分析纯), 酒石酸, 丙二酸, 苹果酸, 乳酸, 琥珀酸, 戊二酸, 谷氨酸均为分析纯试剂; 所用的水为 18.2 M $\Omega$  超纯水。

## 1.2 标准溶液的配制

准确称取酒石酸, 丙二酸, 苹果酸, 琥珀酸, 戊二酸, 谷氨酸各 25.0 mg, 用水溶解并定容至 25 mL 的容量瓶; 在 25 $^{\circ}\text{C}$  室温下准确移取乳酸 84  $\mu\text{L}$ , 用水溶解并定容至 100 mL 的容量瓶, 得到 1 mg/mL 各酸

第一作者: 博士, 副教授。

\* 广西自然科学基金资助项目(No. 0009010)

收稿日期: 2005-05-17

的储备液。密封置于 4℃ 下保存。实验时用超纯水稀释至所需浓度。

### 1.3 样品的制备

直接取自糖厂酒精车间的糖蜜酒精废液样品,用塑料瓶盛装,于 -18℃ 下冷冻保存。分析前解冻并用水稀释 200 倍,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样。

### 1.4 电泳分离条件

以 50.0 mmol/L 醋酸铵(用 1.0 mol/L 醋酸调至 pH 4.5)为缓冲溶液;缓冲溶液使用前用 0.45 μm 滤膜过滤,并经超声波脱气。分离电压: -12.5 kV,分离温度: 25℃,压力进样 50 mbar×10 s。毛细管柱插入质谱前必须先活化,每天用 0.1 mol/L NaOH 冲洗 30 min,然后分别用水、1.0 mg/L 海美溴铵和缓冲溶液各冲洗 10 min。同一缓冲溶液运行 3~4 次后应更换。

### 1.5 质谱条件

电离源为电喷雾电离源(ESI 源),在 80~155 m/z 范围内进行全离子扫描并选择质荷比(m/z)为 149(酒石酸)、103(丙二酸)、133(苹果酸)、89(乳酸)、117(琥珀酸)、103(戊二酸)和 146(谷氨酸)带负电荷的准分子离子峰峰面积用于定量;毛细管电压为 3.5 kV,喷雾气(N<sub>2</sub>)压力为 15 Pa,干燥气(N<sub>2</sub>): 温度为 325℃,流速为 5.0 L/min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 电泳条件的优化

#### 2.1.1 表面活性剂的种类和浓度对分离的影响

毛细管电泳法常用的表面活性剂 CTAB 对酒石酸等 9 种有机酸均有很好的分离效果<sup>[11]</sup>,但由于 CTAB 不易挥发,影响样品在质谱的电离,大大降低质谱检测灵敏度,不能使用。而海美溴铵作为改性剂,主要优点是它能形成比较牢固的吸附层,不易被缓冲液冲掉<sup>[12]</sup>。因此在毛细管插入质谱前就先用海美溴铵冲毛细管,后用缓冲溶液冲洗 10 min,可大大减少表面活性剂对样品电离的影响。文中考察了不同浓度的海美溴铵对有机酸的迁移时间的影响见图 1。

从图 1 可知,随着海美溴铵浓度的增加,有机酸的迁移时间减少。当海美溴铵浓度大于 2.0 mg/L 时,乳酸、琥珀酸和戊二酸部分重叠。而当海美溴铵浓度等于 1.0 mg/L 时,各酸的分离度和电离强度均较好。

#### 2.1.2 缓冲溶液 pH 值对分离的影响

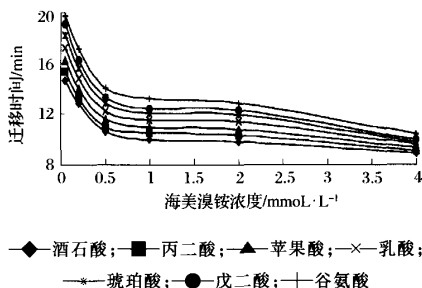


图 1 海美溴铵的浓度对迁移时间的影响

缓冲溶液的 pH 值是影响毛细管电泳分离的关键因素,pH 的改变将引起电渗流(EOF)、峰形及分离度的变化。文中在 pH 为 3.5~5.5 的范围内考察了缓冲溶液的 pH 值对分离情况的影响,结果表明,迁移时间随着 pH 的增加而减少,但 pH 值小于或大于 4.5 时,都有部分酸分不开。当 pH=4.5 时,各酸的分离效果均较好。

#### 2.1.3 缓冲溶液种类和浓度对分离的影响

由于质谱中使用的缓冲溶液必须易挥发,难挥发盐的缓冲溶液,如磷酸盐等要尽量避免在质谱中使用,因为它们容易堵塞喷雾口,污染喷雾室,影响样品的电离。文中选择了易挥发性的铵盐如甲酸铵和乙酸铵作为缓冲溶液,实验中发现,乙酸铵的分离效果比甲酸铵好。不同浓度的乙酸铵缓冲溶液对分离度的影响也不同,有机酸的迁移时间随缓冲溶液浓度增加而加长,从而改善分离度。但是缓冲溶液浓度太大,会产生焦耳热效应,引起区带增宽和分析时间延长;同时各酸的电离强度也降低。综合考虑以上因素,缓冲溶液的浓度为 50.0 mmol/L 时,样品分离效果和电离强度较好。

### 2.2 质谱条件的优化

#### 2.2.1 鞘液的组成对样品电离的影响

鞘液的组成对样品在 ESI 源中的电离效果有很大的影响。乙腈、异丙醇、甲醇和水是最为常用的鞘液,因为它们有显著的质子自递作用,挥发性较好,不易形成溶剂加合物。甲酸、乙酸、醋酸铵和氨水是常用的鞘液添加剂。选择适当的溶剂比例或添加适当浓度的添加剂能大大促进样品电离,相反可能会产生很强的背景,甚至严重抑制样品的电离。

#### 2.2.2 鞘液中有机试剂的含量对样品电离的影响

文中考察了乙腈、异丙醇和甲醇对样品电离的影响。乙腈和甲醇均产生很强的背景噪音,样品电离强度较低;而异丙醇的背景噪音较低,样品的电离强度

大。图2中给出了不同含量的异丙醇与样品离子强度的关系。

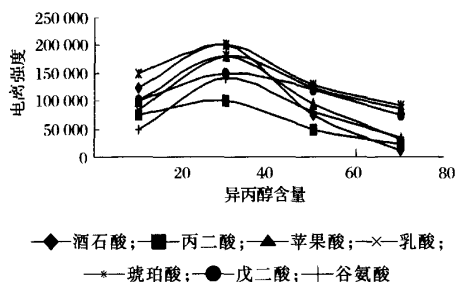


图2 鞘液中异丙醇的含量对电离的影响

从图2可看出,异丙醇含量为30%时样品电离强度较高。

### 2.2.3 添加物的浓度对样品电离的影响

在30%的异丙醇里分别添加1.0 mmol/L的甲酸、醋酸铵和氨水,实验结果显示,添加氨水时样品电离强度最高。不同浓度的添加物对样品电离强度也不同,图3显示了氨水的浓度对离子强度的影响。

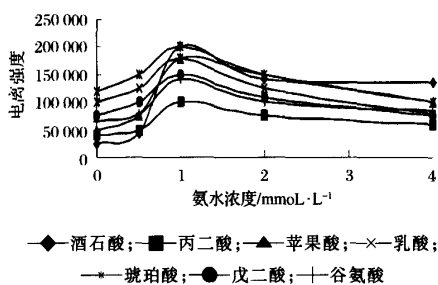


图3 鞘液中氨水的浓度对电离的影响

从图3可见,当氨水浓度为1.0 mmol/L时,有利于样品从液滴中逸出,从而得到较好的电离效果。

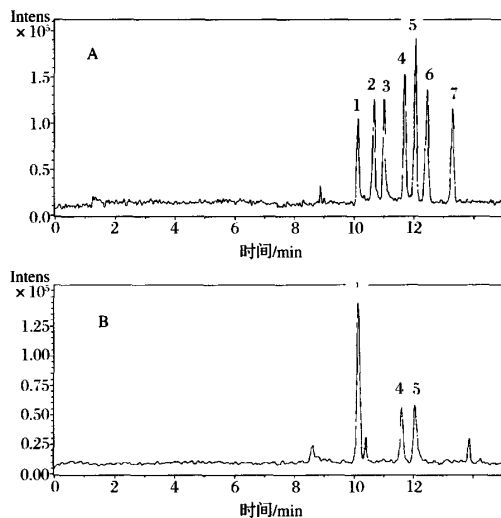
### 2.2.4 鞘液的流速对样品电离的影响

文中考察了不同鞘液流速(0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ )对样品电离的影响。当流速从0.3  $\mu\text{L}/\text{min}$ 升到0.6  $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,样品的电离强度随着流速增加而升高;当流速大于0.8  $\mu\text{L}/\text{min}$ 时样品电离强度反而降低,因鞘液的流速太大,对样品有稀释作用。因此选择鞘液的流速为0.6  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

### 2.3 组分的分离与定性结果的确认

通过优化毛细管电泳条件和质谱条件,在14 min内可得到分离度很好的色谱图,如标准品图4(A)、样品图4(B)和质谱图(见图5)。

将样品中的各组峰色谱峰保留时间和质谱图与标准品的加以比较确认,鉴定出样品中含有酒石



1. 酒石酸; 2. 丙二酸; 3. 苹果酸; 4. 乳酸;  
5. 琥珀酸; 6. 戊二酸; 7. 谷氨酸

图4 标准品(A)和样品(B)的总离子流图

酸、乳酸和琥珀酸。由于样品中检测到的酒石酸、乳酸和琥珀酸的质谱图和标准品的一致,在此省略了样品的质谱图。

### 2.4 线性关系及检出限

配制一系列不同浓度的酒石酸,丙二酸,苹果酸,乳酸,琥珀酸,戊二酸,谷氨酸标准品混合溶液。按最优化的实验条件进行测定,以酒石酸,丙二酸,苹果酸,乳酸,琥珀酸,戊二酸,谷氨酸的分子离子峰的峰面积对浓度( $\text{mg}/\text{L}$ )进行线性回归,以峰面积外标法定量,得到分析物回归方程及相关系数见表1。以信噪比等于3为标准,测得各物质的检出限见表1。

表1 7种酸的线性关系和检出限

化合物	回归方程	线性范围 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	相关系数	检出限 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
酒石酸	$Y = 36523X - 1562.2$	1.0~100.0	0.996 0	0.3
丙二酸	$Y = 9184.1X + 25537$	4.0~200.0	0.998 4	1.0
苹果酸	$Y = 35348X + 54513$	1.0~100.0	0.998 0	0.3
乳酸	$Y = 9997.9X + 51264$	4.0~200.0	0.998 1	1.0
琥珀酸	$Y = 27249X - 10277$	2.0~160.0	0.997 7	0.5
戊二酸	$Y = 43275X + 16102$	1.0~80.0	0.998 5	0.3
谷氨酸	$Y = 41479X + 32807$	1.0~80.0	0.998 4	0.3

### 2.5 精密度和回收率实验

将同一样品分别取2份,其中1份作为本底,另1份准确加入一定量7种有机酸标准溶液,按“样品的制备”的方法处理成待测溶液,在优化的实验条件下,对每份样品平行测定5次,按照外标法定量并计算其回收率,结果见表2。

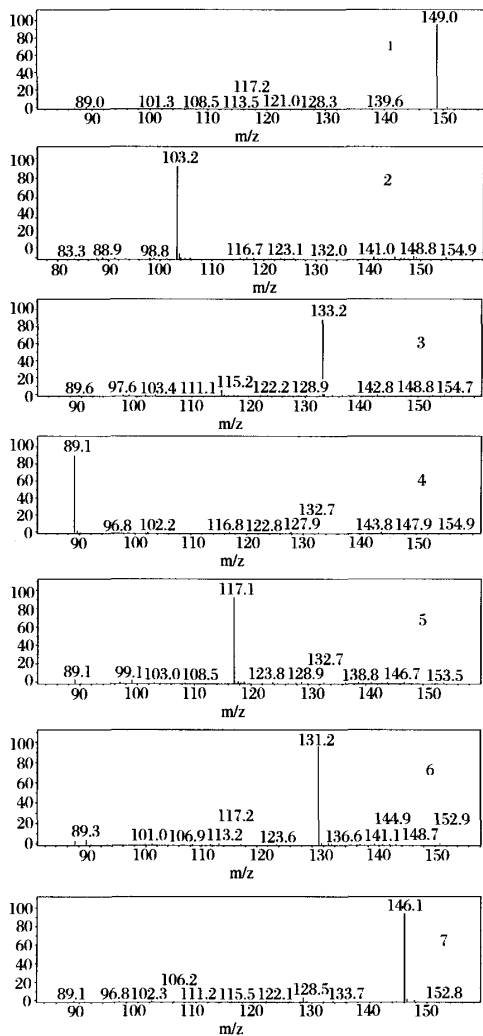


图5 图4(A)中各峰的全扫描质谱图  
1. 酒石酸; 2. 丙二酸; 3. 苹果酸; 4. 乳酸;  
5. 琥珀酸; 6. 戊二酸; 7. 谷氨酸

表2 样品加标回收率(n=5)

化合物	原始值 /mg·L <sup>-1</sup>	加入值 /mg·L <sup>-1</sup>	测得值 /mg·L <sup>-1</sup>	回收率 /%	RSD /%
酒石酸	20.8	20.0	39.8	95	6.2
丙二酸	0	20.0	19.5	98	8.5
苹果酸	0	10.0	9.3	93	6.8
乳酸	33.2	30.0	63.8	102	7.2
琥珀酸	5.7	10.0	15.0	93	8.5
戊二酸	0	10.0	9.6	96	7.6
谷氨酸	0	10.0	9.0	90	6.5

2.6 样品分析

按优化的实验方法,对不同糖厂的糖蜜酒精废液的有机酸进行测定,结果见表3。

表3 CE-MS法测定样品中有机酸的分析结果

样品	酒石酸/mg·L <sup>-1</sup>	琥珀酸/mg·L <sup>-1</sup>	乳酸/mg·L <sup>-1</sup>
1	4160.0	1140.0	6640.0
2	3820.0	1120.0	9500.0
3	2540.0	1480.0	6240.0
4	—	2780.0	2080.0
5	—	2840.0	2160.0
6	—	2040.0	4600.0

3 结论

文中建立了一种同时测定丙二酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸、戊二酸和谷氨酸的毛细管电泳-质谱联用法。该方法不需衍生,前处理简单,快速、准确,可直接用于糖蜜酒精废液中有有机酸测定,解决了不能用高效液相色谱和离子色谱直接测定糖蜜酒精废液中小分子有机酸的问题。

参考文献

1 杨毅,李崎,陈蕴,等. 反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定啤酒中有机酸[J]. 食品与发酵工业,2003,29(8):6~12  
2 郝志峰,刘鹏岩,傅承光. 离子排斥色谱法测定马齿苋中低分子羧酸[J]. 色谱,1996,14(1):50~52  
3 金其荣,金丰收. 糖蜜酒精废液综合利用与治理[J]. 酿酒,2002,29(1):58~59  
4 Kenney B F. Determination of organic acids in foods samples by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr, 1991, 546:423~430  
5 Soga T, Ross G A. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 1999, 837:231~239  
6 Barbas C, Garcia A, Miguel L, et al. Evaluation of filter paper collection of urine samples for detection and measurement of organic acidurias by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr B, 2002,780:72~82  
7 Levart A, Gueek M, Pihlar B, et al. Determination of organic acids in air by capillary electrophoresis and ion-exclusion chromatography[J]. Chromatographia (suppl), 2000, 51: S321~S324  
8 Henion J, Cai J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. J Chromatogr, 1995, 703: 667~692  
9 Hagberg J. Analysis of low-molecular-mass organic acids using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003, 998: 127~133  
10 Sawada H, Nogami C. Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry using uncoated fused-silica capillaries and alkaline buffer solution for the analysis of small

- carboxylic acids[J]. Anal Chim Acta, 2004, 507:191~198
- 11 徐远金, 许桂苹. 胶束电动毛细管色谱-间接紫外检测法分离和测定糖蜜酒精废液中的有机酸[J]. 色谱, (清样代刊, 稿件号 20050206)
- 12 Terabe S, Iamura T. Effect of polymer ion concentration on migration velocities in ion-exchange electrokinetic chromatography[J]. J Chromatogr, 1990, 515:667~676

## Determination of Organic Acids in Cane Vinsasse by Capillary Electrophoresis-mass Spectrometry

Xu Yuanjin<sup>1,2</sup> Xu Guiping<sup>1</sup> Li Yongku<sup>1</sup>

1(Engineering Center For Sugar Cane and Cane Sugar, Guangxi University, Nanning, 530004, China)

2(Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning, 530004, China)

**ABSTRACT** A HPCE-MS method for analyzing tartaric, malonic, malic, lactic, succinic, glutaric and glutamic acid in cane vinsasse was established. The influence of both electrophoretic parameters and mass spectrometric parameters on separation of organic acids was investigated. The running buffer was composed of 50.0 mmol/L ammonium acetate (pH was adjusted to 4.5 with 1.0 mmol/L acetic acid). The best sensitivity was obtained with the sheath liquid (1.0 mmol/L ammonia in water/isopropanol (70/30, v/v) solution). The organic acids were identified by retention time and  $m/z$  and quantified by peak area. The results demonstrated that the linear ranges were 1.0~100.0, 4.0~200.0, 1.0~100.0, 4.0~200.0, 2.0~160.0, 1.0~80.0, 1.0~80.0 mg/L, with detection limits of 0.3, 1.0, 0.3, 1.0, 0.5, 0.3, 0.3 mg/L for tartaric, malonic, malic, lactic, succinic, glutaric and glutamic acid, respectively. The method was applied to determine the organic acids of cane vinsasse with satisfactory results.

**Key words** capillary electrophoresis-mass spectrometry, cane vinsasse, organic acid

### 市场动态

#### 长效酸乳在中国市场前景广阔

德国 KS 公司亚太技术销售经理日前在内蒙古自治区呼和浩特市表示,常温下最长可保证 6 个月不变质的长效酸乳有望在中国寻找到广阔的市场。

所谓长效酸乳即经热处理后再经过无菌包装的发酵酸乳,其最大的特点是在常温状态下可保存 100~180d,而口感及味道与常规酸乳基本相同。当中国市场销售的酸乳大多标注着“需 2~6℃ 冷藏存放”、“保质期 21 天”的说明时,来自长效酸乳发源地德国 KS 公司亚太技术销售经理表示,十分看好长效酸乳在中国市场的发展前景。

除满足因社会竞争日益激烈,生活节奏不断加快而渴望一次性尽可能多地储备生活所需的消费群体外,在地域广阔的中国,长效酸乳同时可以凭借其保质期长的优势深入地理位置偏远、交通运输不便的山村。

对力图开拓全国大市场的中国乳品企业而言,生产长效酸乳意味着无需耗费财力在全国各地建立生产基地,也无需千方百计以保证拥有完善的物流冷链,企业所需要的只是添加一台无菌包装机。

在中国,保存时间相对较长的超高温杀菌乳,已超过保存时间相对较短的巴氏杀菌乳,成为液态乳市场的“大赢家”。2004 年,超高温乳销量第一,酸乳超过巴氏乳排名第二。一旦有规模地打入市场,长效酸乳应当有能力与常规酸乳竞争一番。

据介绍,以西班牙为代表的南欧是长效酸乳的传统产地及市场,而西班牙的长效酸乳不仅打入了中东、南美以及东南亚的市场,同时已经开始进入中国市场。另外,在长效酸乳生产大国俄罗斯,也已经有两个厂家将目光瞄准了中国。

#### 2005 年上半年我国乳品出口金额逾 3 000 万美元

2005 年 1 到 6 月,我国乳品出口金额为 3257.30 万美元,比去年同期增长了 33.7%;出口数量合计 30 572.17t,比去年同期增长 12.59%。

据中国乳制品工业协会理事长宋昆冈介绍,与去年同期相比,我国乳制品的出口金额增幅远大于出口数量增幅,充分说明我国乳制品出口正由低价位的局面向高价、高档次转变,出口效益增长明显。

2005 年上半年,我国乳品出口市场主要集中在香港特区,出口金额为 1829.47 万美元,占出口总金额的 56.17%;其次是台湾地区,出口金额占总金额的 21.06%;第 3 为缅甸,出口比重为 12.68%;第 4、第 5 位的为澳门特区和日本,出口金额占总金额的比重分别为 1.81% 和 1.75%。