

团体标准

T/ NAIA×××-××××

酿酒葡萄及葡萄酒中有机酸的测定 液相色谱-质谱法

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所、宁夏贺兰山东麓葡萄酒产业园区管理委员会、宁夏农林科学院、宁夏食品检测研究院、西北农林科技大学、宁夏化学分析测试协会、宁夏张裕龙谕酒庄有限公司。

本文件主要起草人：陈翔、葛谦、吴燕、闫玥、张静、吕毅、马丹阳、赵丹青、张锋锋、杨斌琨、陈望、张小飞、张伟、牛艳、孙翔宇、刘娜。

本文件为首次发布。

酿酒葡萄及葡萄酒中有机酸的测定 液相色谱-质谱法

1 范围

本文件规定了酿酒葡萄及葡萄酒中有机酸含量的液相色谱-质谱联用测定方法。

本文件适用于酿酒葡萄及葡萄酒中丙二酸、丙酮酸、富马酸、琥珀酸、L-酒石酸、奎宁酸、莽草酸、柠檬酸、DL-苹果酸、L-乳酸含量的测定。

本文件的方法检出限：丙二酸的检出限为 0.091 mg/L，丙酮酸的检出限为 0.021mg/L，富马酸的检出限为 0.0056mg/L，琥珀酸的检出限为 0.0021mg/L，L-酒石酸的检出限为 0.0010mg/L，奎宁酸的检出限为 0.0019mg/L，莽草酸的检出限为 0.00076mg/L，柠檬酸的检出限为 0.0015mg/L，DL-苹果酸的检出限为 0.00049mg/L，L-乳酸的检出限为 0.00032mg/L。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的有机酸经水提取，微孔滤膜过滤，液相色谱-质谱法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，本方法所使用试剂均为分析纯。本方法所用水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

5.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.2 甲酸（HCOOH）：质谱纯。

5.3 乙酸乙酯（C₄H₈O₂）：色谱纯。

5.4 丙二酸（Propanedioic Acid）：CAS 号 141-82-2，纯度≥99.7%；丙酮酸（Pyruvic Acid）：CAS 号 127-17-3，纯度≥97.0%；富马酸（Fumaric Acid）：CAS 号 110-17-8，纯度≥99.5%；琥珀酸（Amber Acid）：CAS 号 110-15-6，纯度≥99.1%；L-酒石酸（L-Tartaric Acid）：CAS 号 87-69-4，纯度≥99.8%；奎宁酸（Quinic Acid）CAS 号 77-95-2，纯度≥98.5%；莽草酸（Shikimic Acid）CAS 号 138-59-0，纯度≥98.7%；柠檬酸（Citric Acid）CAS 号 77-92-9，纯度≥99.8%；DL-苹果酸（DL-Malic Acid）CAS 号 6915-15-7，纯度≥99.8%；L-乳酸（L-Lactic Acid）CAS 号 79-33-4，纯度≥86.9%。

5.5 20 %甲醇溶液：量取 20 mL 甲醇，用水定容至 100 mL。

5.6 有机酸单标储备溶液

分别准确称取（折算纯度）一定质量的有机酸标准品，用 20 %甲醇溶液溶解并分别定容至 10 mL，配制浓度为 10 mg/mL 的单标储备液；将 10 种有机酸单标储备液用 20 %甲醇溶液稀释配制成各梯度的混合标准系列使用液，于-18 ℃贮存于密闭的棕色玻璃瓶中。

5.7 有机酸混合标准工作液

以 20 %甲醇溶液（5.5）作为溶剂，各梯度的混合标准系列工作液。

5.8 0.45 μm 水相（聚醚砜）滤膜。

6 仪器与设备

- 6.1 组织捣碎机。
- 6.2 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪（配 ESI 离子源）。
- 6.3 分析天平：感量为 0.01mg。
- 6.4 电子天平：感量 0.01g。
- 6.5 多管涡旋混合器
- 6.6 台式离心机
- 6.7 超纯水仪。

7 试样的提取

准确称取2.0 g酿酒葡萄样品或2.0g葡萄酒于50 mL离心管中，加入20.0 mL水，1500r/min涡旋提取1min，4000r/min离心5min，过0.45 μm水相滤膜(5.8)，上机待测。

8 测定

8.1 液相色谱-质谱参考条件

色谱柱：迪马 Spursil C18色谱柱（150mm×2.1mm，3 μm）或性能相当者。

流动相：A为0.1 %甲酸水溶液；B为乙腈；梯度洗脱条件见表1。

柱温：30 ℃。

进样体积：1.0 μL。

流速：0.4 mL/min。

质谱条件：ESI 离子源，喷雾电压 2500v，鞘气 35Arb，辅气 10Arb，离子传输管温度：300℃，雾化温度：350℃；扫描模式：负离子模式，选择反应离子监测（SRM），质谱定性定量离子信息见表 2。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
14	70	30

15	70	30
16	90	10
18	90	10
19	95	5
20	95	5

表2 有机酸质谱离子信息表

序号	中文名	英文名	保留时间	离子对 I	碰撞能量 V	离子对 II	碰撞能量 V
1	丙二酸	Propanedioic Acid	1.03	103.0/41.1	26.9	103.0/59.1	8.5
2	丙酮酸	Pyruvic Acid	0.96	86.9/43.0	7.7	86.9/69.1	5.2
3	富马酸	Fumaric Acid	1.53	115.0/27.2	11.4	115.0/71.1	6.5
4	琥珀酸	Amber Acid	1.57	117.0/73.1	10.5	117.0/99.0	9.2
5	L-酒石酸	L-Tartaric Acid	0.86	149.0/73.1	16.0	149.0/87.0	12.4
6	奎宁酸	Quinic Acid	0.85	191.0/85.0	21.4	191.0/93.0	21.8
7	莽草酸	Shikimic Acid	0.97	173.0/93.1	13.5	173.0/111.1	9.7
8	柠檬酸	Citric Acid	1.23	190.9/87.0	16.8	190.9/111.1	11.2
9	DL-苹果酸	DL-Malic Acid	1.00	133.0/71.0	14.2	133.0/114.9	9.9
10	L-乳酸	L-Lactic Acid	1.22	89.0/43.1	11.1	89.0/45.1	11.2

8.2 标准曲线的绘制

取有机酸混合标准使用液（5.7）适量，以20%甲醇溶液为溶剂，分别将各梯度的系列标准溶液，按 8.1 进行测定（色谱图参见附录 A）。以标准溶液质量浓度（x）为横坐标，相应的峰面积（y）为纵坐标，计算标准曲线或求线性回归方程。

8.3 试样的测定

做两份试样平行测定。取 1.0 μL 试样溶液和相应的标准工作溶液顺序进样，以保留时间定性，以色谱峰面积积分值定量，依据标准曲线回归方程计算试样中 10 种有机酸的浓度。响应值应在标准曲线范围内，超过线性范围则应稀释后再进样分析。

8.4 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行操作。

9 结果计算和表达

试样中丙二酸、丙酮酸、富马酸、琥珀酸、L-酒石酸、奎宁酸、莽草酸、柠檬酸、DL-苹果酸、L-乳酸的含量以质量分数 ω 计，数值以毫克每升 (mg/L) 计，按式 (1) 计算：

式中：

ρ —— 标准曲线计算的样液中 10 种有机酸的质量浓度，单位为 (mg/L)；

V —— 样品溶液最终定容体积，单位为毫升 (mL)；

m —— 试样的质量，单位为克 (g)；

测定结果保留三位有效数字。

10 精密度

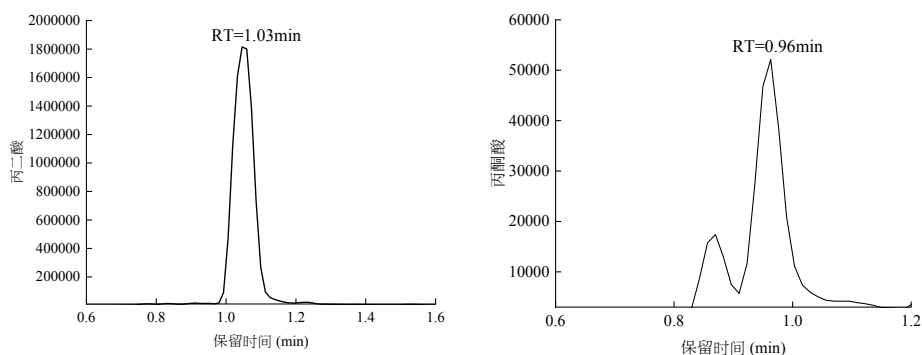
在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 10%。

附录 A

(资料性)

10 种有机酸标准溶液选择反应监测 (SRM) 质量色谱图

10 种有机酸混合标准溶液色谱图，见图 A. 1。



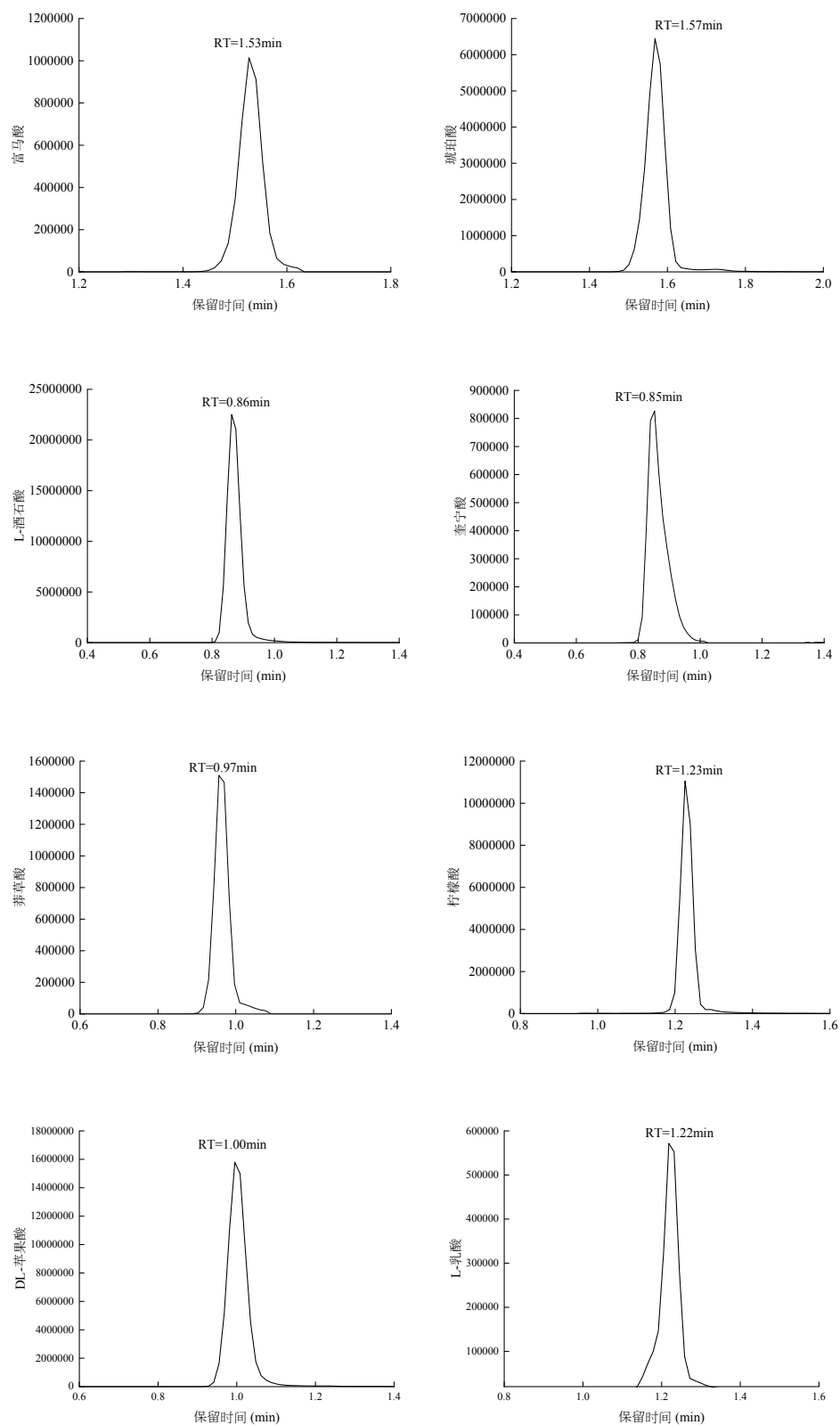


图 A. 1 10 种有机酸标准溶液选择反应监测 (SRM) 质量色谱图