DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260120003
引用格式: 郑燕, 叶有芳, 李爱平, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定洛神花酒中 12 种有机酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(9): 182–190.
ZHENG Y, YE YF, LI AIP, *et al*. Simultaneous determination of 12 kinds of organic acids content in *Hibiscus sabdariffa* L. wine by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(9): 182–190. (in Chinese with English abstract).

固相萃取-高效液相色谱法同时测定洛神花酒中 12 种有机酸含量

郑 燕[1], 叶有芳[1], 李爱平[2], 汤丽昌[1*], 陈高健[1], 冯俊富[1], 黄荻舒[1], 朱飞如[1]
(1. 北海市公共检验检测中心, 北海 536000; 2. 桂林义江酒业有限公司, 桂林 541000)

摘 要: 目的 建立固相萃取-高效液相色谱法同时测定洛神花酒中 12 种有机酸(酒石酸、羟基柠檬酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸、没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸和阿魏酸)含量的分析方法。**方法** 采用混合型强阴离子交换(polymeric anion exchange, PAX)固相萃取小柱净化富集。以 0.1%磷酸水溶液和甲醇为流动相进行梯度洗脱, 经过 CAPECELL PAK ADME C_{18} 液相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离, 采用二极管阵列多波长检测。**结果** 12 种有机酸得到有效分离; 且在各质量浓度线性范围内线性关系良好, 相关系数(r)均在 0.9998 以上; 平均加标回收率为 82.78%~101.52%, 相对标准偏差为 0.90%~4.79%; 检出限为 0.00047~0.49392 mg/L, 定量限为 0.00157~1.64640 mg/L。**结论** 该方法操作简便、分离效果好、数据准确、灵敏度高, 适用于洛神花酒中有机酸的定量定性检测。

关键词: 洛神花酒; 高效液相色谱法; 有机酸; 固相萃取

Simultaneous determination of 12 kinds of organic acids content in *Hibiscus sabdariffa* L. wine by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography

ZHENG Yan[1], YE You-Fang[1], LI Ai-Ping[2], TANG Li-Chang[1*], CHEN Gao-Jian[1], FENG Jun-Fu[1], HUANG Di-Shu[1], ZHU Fei-Ru[1]
(1. *Beihai Public Inspection and Testing Centre*, *Beihai* 536000, *China*; 2. *Guilin Yijiang Jiuye Co.*, *Ltd.*, *Guilin* 541000, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the simultaneous determination of 12 kinds of organic acids (tartaric acid, hydroxycitric acid, lactic acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid, gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid and ferulic acid) in *Hibiscus sabdariffa* L. wine by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. **Methods** Mixed-mode strong anion exchange

收稿日期: 2026-01-20
基金项目: 广西科技重点研发计划项目(桂科 AB25069003); 广西壮族自治区市场局自筹课题项目(GSJKJZC2025-16)
第一作者: 郑燕(1992—), 女, 工程师, 主要研究方向为食品、药品质量控制及方法研究开发。E-mail: 614588402@qq.com
***通信作者:** 汤丽昌(1986—), 男, 副主任药师, 主要研究方向为食品、药品质量控制及方法研究开发。E-mail: 363471255@qq.com

polymeric anion exchange (PAX) solid-phase extraction cartridges were used for purification and enrichment. The samples were eluted with 0.1% formic acid in water and methanol as mobile phases and separated on a CAPECELL PAK ADME C_{18} liquid chromatography column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), and a diode array multi-wavelength detection were employed. **Results**　The 12 kinds of organic acids were effectively separated; there was a good linear relationship within the linear range of various mass concentrations, with correlation coefficients (*r*) all above 0.9998; the average spiked recovery rates ranged from 82.78%–101.52%, with relative standard deviations of 0.90%–4.79%. The limits of detection were 0.00047–0.49392 mg/L and the limits of quantitation were 0.00157–1.64640 mg/L. **Conclusion**　This method is simple to operate, good separation effect, accurate data and high sensitivity, making it suitable for the quantitative and qualitative detection of organic acids in *Hibiscus sabdariffa* L. wine.

KEY WORDS: *Hibiscus sabdariffa* L. wine; high performance liquid chromatography; organic acid; solid-phase extraction

0　引　言

洛神花(*Hibiscus sabdariffa* L.)又名玫瑰茄、洛克红、洛神葵、山茄, 是一种药食同源的一年生或多年生的锦葵科木槿属植物[1–2]。其有着较大的药用和食用价值, 被称为“植物界的红宝石”, 富含有机酸类、黄酮类、维生素、多酚、氨基酸类、花青素类、多糖类、矿物质、香气成分等多种活性营养成分[3–5]。这些活性成分赋予了洛神花抗氧化活性、抗菌活性、降血脂活性, 在临床上有着抗肿瘤、降血压、保护肝脏、抗炎和预防心血管疾病等方面的药理作用[6–7]。洞藏洛神花酒是一种将洛神花与洞藏工艺相结合的低度特色酒类, 酒精含量为 8%。以优质米香发酵酒为基底, 加入洛神花干, 经天然溶洞内发酵、储藏等工艺酿造而成, 营养丰富, 具有一定的保健功效, 其主要价值来源于洛神花。

洛神花花萼中含有丰富的有机酸, 包括酒石酸、羟基柠檬酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸、没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸和阿魏酸, 含量可达15%~30%[8]。这些有机酸是洛神花酒的重要风味物质, 起到助香、呈香、减少刺激以及缓冲平衡的作用, 对洛神花酒的口感、风味和品质有着重要的影响。有机酸含量过高会使酒口感生涩, 过低则会使酒平淡乏味。目前, 对洛神花酒的研究多集中于酿造工艺, 而针对其有机酸组分的分析研究相对较少。因此, 建立洛神花酒中有机酸的分析测定方法, 对其产品的开发与品质控制具有重要意义[9–10]。

有机酸检测方法通常有液相色谱-质谱法[11]、离子色谱法[12]、气相色谱-质谱法[13]、毛细管电泳法[14]、紫外分光度法[15]、液相色谱法[16–17]、气相色谱法[18]。液相色谱-质谱法和气相色谱-质谱法对于企业日常生产检测成本较高, 气相色谱法适用于测定挥发性有机酸, 而非挥发性的有机酸的检测需要将其衍生化后才可进行[19]。液相色谱法因检测成本低, 普适性强, 利于在企业中推广, 被广泛应用[20–21]。本研究建立的固相萃取-液相色谱法可同时测定洛神花酒中 12 种有机酸, 为洛神花酒有机酸的质量控制及产品开发提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

3 批穿山岩洞藏洛神花酒(批号: 20241015、20231022、20220925, 桂林义江酒业有限公司)。

L-酒石酸标准品($C_4H_6O_6$, 纯度 98.5%)、柠檬酸标准品($C_6H_8O_7$, 纯度 99.6%)、*L*-(+)乳酸标准品($C_3H_6O_3$, 纯度 95.4%)、甲醇(色谱纯)(上海安谱实验科技股份有限公司); 没食子酸标准品($C_7H_6O_5$, 纯度 91.5%)、原儿茶酸标准品($C_7H_6O_4$, 纯度 97.5%)、绿原酸标准品($C_{16}H_{18}O_9$, 纯度 96.3%)、咖啡酸标准品($C_9H_8O_4$, 纯度 99.7%)、阿魏酸标准品($C_{10}H_{10}O_4$, 纯度 99.6%)(中国食品药品检定研究院); 羟基柠檬酸钾标准品($C_6H_5K_3O_8\cdot H_2O$, 纯度 95%, 上海源叶生物科技有限公司); 琥珀酸标准品($C_4H_6O_4$, 纯度 98.0%, 坛墨质检科技股份有限公司); 富马酸标准品($C_4H_4O_4$, 纯度 99.6%, 北京曼哈格生物科技有限公司); 丁香酸标准品($C_9H_{10}O_5$, 纯度 98%, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 磷酸(色谱纯, 成都市诺尔施科技有限责任公司); 聚醚砜(polyethersulfone, PES)滤膜(0.45 μm, 天津津腾实验设备有限公司); 超纯水由 Milipore 制备。

1.2　仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器, 美国安捷伦科技有限公司); XA205DU 电子天平[*d*=0.01 mg/0.1 mg, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; R-215 平行蒸发仪(瑞士步琦有限公司); TW-SPE 24 固相萃取装置(武汉恒信世纪科技有限公司); CAPECELL PAK C_{18}液相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 日本株式会社大阪曹達); Cleanert 混合型强阴离子固相萃取柱(polymeric anion exchange, PAX) (500 mg/6 mL, 天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　标准溶液的配制

分别称取没食子酸约 15 mg、原儿茶酸和绿原酸约 25 mg (精确至 0.01 mg)于同一 10 mL 容量瓶中, 加水溶解,

定容, 混匀, 得到没食子酸、原儿茶酸、绿原酸混合标准储备溶液。分别称取咖啡酸、丁香酸、阿魏酸约 13 mg 于同一 50 mL 容量瓶中, 加水溶解, 定容, 混匀, 得到咖啡酸、丁香酸、阿魏酸混合标准储备溶液。

分别称取 *L*-酒石酸约 200 mg, 羟基柠檬酸钾(以羟基柠檬酸计)约 800 mg, *L*-(+)乳酸约 250 mg, 柠檬酸、琥珀酸、富马酸约 25 mg, 准确量取没食子酸、原儿茶酸、绿原酸混合标准储备溶液和咖啡酸、丁香酸、阿魏酸混合标准储备溶液各 1 mL, 于同一 50 mL 容量瓶中, 加水溶解, 定容, 混匀, 得到 12 种有机酸混合标准储备溶液。各有机酸质量浓度分别为: *L*-酒石酸 8026.1740 μg/mL、羟基柠檬酸 20070.1510 μg/mL、*L*-(+)乳酸 10067.3712 μg/mL、柠檬酸 1022.2944 μg/mL、琥珀酸 1020.7680 μg/mL、富马酸 1058.9472 μg/mL、没食子酸 55.6686 μg/mL、原儿茶酸 103.2330 μg/mL、绿原酸 104.1196 μg/mL、咖啡酸 10.4565 μg/mL、丁香酸 10.1371 μg/mL、阿魏酸 10.5373 μg/mL。

混合标准系列工作溶液: 准确吸取 12 种有机酸混合标准储备溶液 0.2、0.4、1.0、2.0、4.0 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀, 得到混合标准系列工作溶液 1~5; 另直接取 12 种有机酸混合标准储备溶液作为混合标准工作溶液 6。

1.3.2 样品的前处理

样品充分混匀, 精密量取 10 mL 于 100 mL 鸡心瓶中, 在 55 ℃下旋转浓缩近干, 用 1 mL 水洗涤鸡心瓶。将净化液转移至经过预活化的 PAX 固相萃取柱(使用前依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化)中, 控制流速在约 1 mL/min, 弃去流出液。用 5 mL 水淋洗净化柱, 再用 5 mL 2%磷酸-甲醇溶液洗脱, 控制流速在约 1 mL/min, 收集洗脱液于 50 mL 鸡心瓶中, 洗脱液在 45 ℃下旋转蒸发近干后, 用 1.0 mL 水振荡溶解残渣后经 0.45 μm 聚醚砜滤膜过滤后, 供高效液相色谱仪分析。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: CAPECELL PAK ADME C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 30 ℃, 进样量: 10 μL; 检测波长: 酒石酸、羟基柠檬酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸和富马酸为 210 nm, 没食子酸、原儿茶酸和丁香酸为 280 nm, 绿原酸、咖啡酸和阿魏酸为 320 nm; 流动相 A: 0.1%磷酸水溶液, 流动相 B: 甲醇, 洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of mobile phase

时间/min	A/%	B/%
0	96	4
20	96	4
30	50	50
40	50	50
50	10	90
55	96	4
60	96	4

1.4 数据处理

用 Agilent 1260 高效液相色谱仪自带的化学工作站系统自动采集数据并根据保留时间定性, 制作的标准曲线测定含量结合峰面积归一法定量分析。数据结果分析使用 WPS Office 2019 软件进行计算。

2 结果与分析

2.1 方法优化

2.1.1 色谱柱的选择

在对色谱柱进行选择时, 综合考察了两种不同型号的色谱柱, 分别为 CAPECELL PAK C_{18} TYPE MG (4.6 mm×250 mm, 5 μm)和 CAPECELL PAK ADME C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。结果表明, 采用 CAPECELL PAK C_{18} TYPE MG 色谱柱时, 前 10 min 流出峰的各有机酸组分峰形及分离效果不佳。其中, 酒石酸色谱峰受溶剂峰干扰, 分离度为 1.21; 羟基柠檬酸色谱峰与相邻杂质峰分离度为 1.33, 均未达到分离度不低于 1.5 的要求; 柠檬酸色谱峰明显拖尾现象, 理论塔板数仅为 3615, 低于理论塔板数不低于 5000 的实验要求。在相同色谱条件下采用 CAPECELL PAK ADME C_{18} 色谱柱时, 各有机酸组分之间的分离度和理论塔板数均满足实验要求, 12 种有机酸的分离度均大于 1.5, 且理论塔板数均大于 5000。因此, 最终选用 CAPECELL PAK ADME C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm)作为本研究的分析色谱柱。

2.1.2 流动相、流动相 pH 及梯度洗脱条件的优化

根据现有文献报道, 有机酸的检测所采用的流动相体系多样, 主要有 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液-甲醇的等度洗脱[22], 10 mmo/L 甲酸铵-5%甲醇的等度洗脱[23], 0.2%磷酸水-乙腈的梯度洗脱[24–25], 0.5%甲酸水溶液-甲醇的梯度洗脱[26], 0.10%磷酸水溶液-50%乙腈的梯度洗脱[27]和 0.1 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇的梯度洗脱[28]等。

磷酸水溶液 pH 较低, 可抑制有机酸的电离, 使有机酸以分子形式存在, 增强有机酸在 C_{18} 柱上的反相保留, 在流动相中添加适量的甲醇可有效改善峰形, 有利于各有机酸组分的分离。同时, 磷酸不含金属离子, 不会与色谱柱固定相发生相互作用, 能有效保护 C_{18} 色谱柱, 延长色谱柱使用寿命。

综合上述信息, 0.1 mol/L 磷酸水溶液-甲醇体系因适用性广、分离效果良好效果而被多数研究采用[29–30]; 且 GB 5009.157—2016《食品安全国家标准 食品中有机酸的测定》亦采用了该流动相体系。结合实验稳定性与色谱柱保护需求, 本研究最终选用 0.1%磷酸水溶液-甲醇作为流动相。

对 0.1%磷酸水溶液的 pH 进行考察, 依次调节其 pH 为 2.0、2.2、2.6、2.8、3.0, 并结合优化 0.1%磷酸水溶液

与甲醇的体积比(99:1、98:2、97:3、96:4、95:5)开展梯度洗脱实验。结果表明, 甲醇比例较高时, 有机酸各组分无法实现完全分离, 分离度不能满足实验要求; 甲醇比例较低时, 分析时间较长, 检测效率较低。当 0.1%磷酸水溶液 pH 为 2.2 时, 各有机酸组分分离效果良好且峰形对称, 理论塔板数均不低于 5000, 分离度均大于 1.5, 色图谱见图 1。因此, 本研究最终选用 pH 为 2.2 的 0.1%磷酸水溶液作为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 体积比为 96:4, 具体色谱条件详见表 1。

2.1.3　检测波长的选择

采用二极管阵列检测器, 在 190~400 nm 波长范围内对各有机酸单体标准溶液进行扫描, 以确定各组分的最大吸收波长。为确保各组分具有足够的灵敏度, 并尽可能减少其他杂峰的干扰, 同时参考 GB 5009.157—2016、NY/T 2795—2015《苹果中主要酚类物质的测定高效液相色谱法》及文献[31–33], 经综合考虑后确定, 酒石酸、羟基柠檬酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸的检测波长选定为 210 nm; 没食子酸、原儿茶酸和丁香酸的检测波长选定为 280 nm; 绿原酸、咖啡酸和阿魏酸的检测波长选定为 320 nm。

2.1.4　固相萃取柱的选择

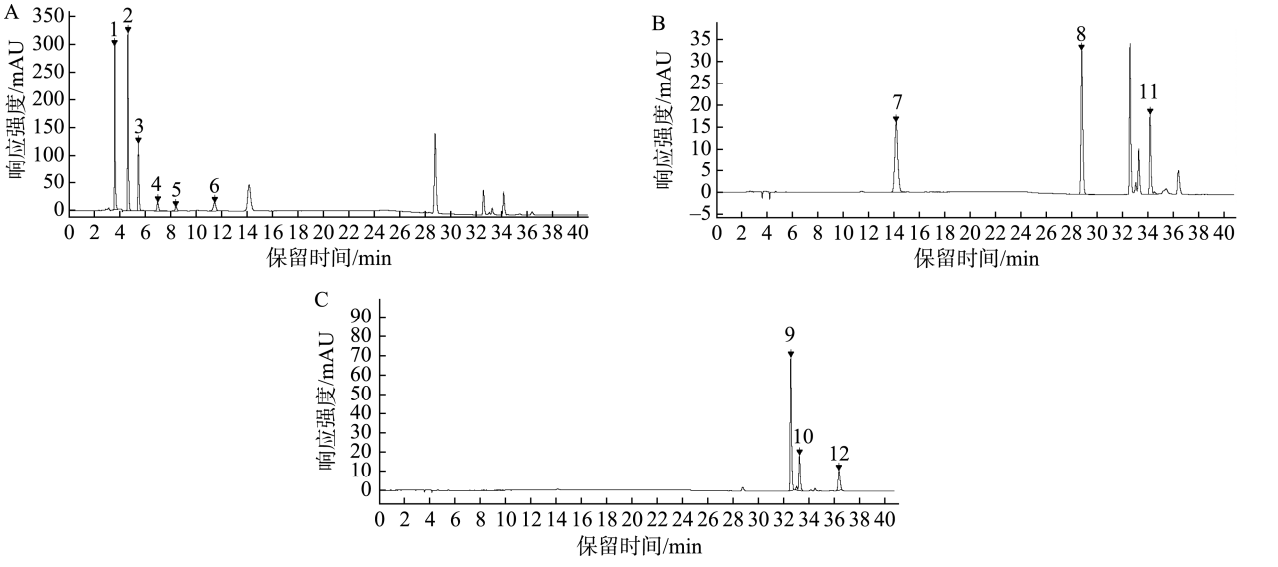
本研究分别考察 Waters Oasis 混合型强阴离子交换固相萃取小柱(mixed mode strong anion exchange, MAX)、Cleanert PAX 固相萃取小柱、Copure®强阴离子交换固相萃取小柱(strong anion exchange, SAX)以及 Copure® SAX 与 Cleanert C_{18} 固相萃取小柱串联, 这 4 种固相萃取净化方案对洛神花酒的净化富集效果[34–35]。强阴离子交换柱 Copure® SAX 净化效果好, 富集有机酸效果不佳, 仅能富集 12 min 前出峰的组分(酒石酸、羟基柠檬酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸), 12 min 后出峰的有机酸(没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸、阿魏酸)未被富集, 无法满足本研究的检测要求; Copure®SAX 与 Cleanert C_{18} 串联联用可结合两种柱子的优势, 实现 12 种有机酸的同步富集, 但同时也吸附了较多的基质干扰组分, 色谱图中杂质峰响应较高, 且前处理成本增加; 混合型强阴离子交换柱 Waters Oasis MAX 可富集 12 种有机酸, 但加标回收率偏低, 达不到实验要求; 混合型强阴离子交换柱 Cleanert PAX 净化和富集效果均较优, 可同时富集 12 种有机酸且回收率满足检验要求。综合比较, 本研究最终选用 Cleanert PAX 固相萃取小柱用于洛神花酒样品进行净化富集。

2.2　线性范围和灵敏度

在 1.3.3 的色谱条件下, 对混合标准系列工作溶液 1~6 进行测定, 混合标准工作溶液色谱图见图 1。以 3 倍信噪比计算检出限, 以 10 倍信噪比计算定量限。回归方程、相关系数、线性范围、检出限及定量限见表 2, 结果显示 12 种有机酸在各自的质量浓度范围内, 线性关系良好, 相关系数(r)均在 0.9998 以上, 检出限和定量限均小于 GB 5009.157—2016 中给出的值, 灵敏度高。

2.3　精密度、重复性及稳定性实验

用混合标准工作溶液 3, 在 1.3.3 项色谱条件下连续进样 6 次, 记录 12 种有机酸的峰面积, 计算峰面积的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs), 考察仪器精密度。准确量取同一份洛神花酒供试品(批号: 20241015) 10 mL, 按照 1.3.2 项下的方法平行制备 6 份供试品溶液, 在 1.3.3 项色谱条件下进行检测, 记录 12 种有机酸的峰面积,



注: A. 210 nm; B. 280 nm; C. 320 nm; 1. 酒石酸; 2. 羟基柠檬酸; 3. 乳酸; 4. 柠檬酸; 5. 琥珀酸; 6. 富马酸; 7. 没食子酸; 8. 原儿茶酸; 9. 绿原酸; 10. 咖啡酸; 11. 丁香酸; 12. 阿魏酸。下图同。

图 1　12 种有机酸混合标准工作溶液色谱图

Fig.1　Chromatogram of 12 kinds of organic acid mixed standard working solutions

表 2 12 种有机酸的回归方程、线性范围、相关系数(*r*)、检出限及定量限

Table 2 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients (*r*), limits of detection and limits of quantitation of 12 kinds of organic acids

有机酸种类	回归方程	相关系数(*r*)	线性范围/(mg/L)	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)
酒石酸	*Y*=0.7712*X*–23.428	0.9998	160.5235~8026.1740	0.08689	0.28965
羟基柠檬酸	*Y*=0.4317*X*+14.083	0.9999	401.4030~20070.1510	0.20994	0.69980
乳酸	*Y*=0.3785*X*+3.368	0.9999	201.3474~10067.3712	0.27810	0.92701
柠檬酸	*Y*=0.6770*X*+0.2230	0.9999	20.4459~1022.2944	0.22718	0.75726
琥珀酸	*Y*=0.3321*X*+0.4675	0.9999	20.4154~1020.7680	0.49392	1.64640
富马酸	*Y*=1.0028*X*+0.0236	0.9999	21.1789~1058.9472	0.23708	0.79026
没食子酸	*Y*=24.2692*X*–2.1811	0.9999	1.1134~55.6686	0.00304	0.01015
原儿茶酸	*Y*=15.7079*X*+1.4204	0.9999	2.0647~103.2330	0.00255	0.00850
绿原酸	*Y*=22.6490*X*–0.7138	0.9999	2.0824~104.1196	0.00168	0.00559
咖啡酸	*Y*=69.2852*X*–0.3930	0.9999	0.2091~10.4565	0.00066	0.00220
丁香酸	*Y*=69.5811*X*+0.6262	0.9999	0.2027~10.1371	0.00047	0.00157
阿魏酸	*Y*=57.7453*X*–0.1448	0.9999	0.2107~10.5337	0.00114	0.00379

计算峰面积的 RSDs, 考察方法重复性。准确量取同一份洛神花酒供试品(批号: 20241015) 10 mL, 在 1.3.2 项下的方法制备供试品溶液, 在 1.3.3 项色谱条件下, 分别于 0、6、12、18、24、48 h 进样测定, 记录峰面积并计算 RSDs, 考察供试品溶液的稳定性。结果见表 3, 仪器精密度、方法重复性和样品稳定性 RSDs 均小于 2.00%, 表明该方法精密度、方法重复性良好, 供试品溶液放置 48 h 之内稳定性良好。

2.4 加标回收实验

准确量取同一批洛神花酒供试品(批号: 20241015) 10 mL, 共 3 份, 每份分别精密加入混合标准工作溶液 3 各 1 mL, 在 1.3.2 项下的方法制备供试品溶液, 在 1.3.3 项色谱条件下进行检测, 计算加标回收率。结果见表 4, 12 种有机酸的平均加标回收率为 82.78%~101.52%, RSDs 均小于 5.00%, 符合国家标准规定要求。

表 3 12 种有机酸的精密度、重复性、稳定性实验结果(*n*=6)

Table 3 Precision, reproducibility and stability test results of 12 kinds of organic acids (*n*=6)

有机酸种类	精密度实验 RSDs/%	重复性实验 RSDs/%	稳定性实验 RSDs/%
酒石酸	0.13	0.28	0.96
羟基柠檬酸	0.17	1.29	1.98
乳酸	0.14	0.32	1.07
柠檬酸	0.67	0.16	0.79
琥珀酸	1.10	1.34	1.41
富马酸	0.45	0.40	1.18
没食子酸	0.36	0.19	0.68
原儿茶酸	0.33	1.02	1.76
绿原酸	0.17	1.29	1.61
咖啡酸	0.51	1.32	1.19
丁香酸	0.67	0.72	1.42
阿魏酸	0.64	0.47	1.48

表 4 12 种有机酸的回收率和 RSDs (*n*=3)

Table 4 Recoveries and RSDs of the 12 kinds of organic acids (*n*=3)

有机酸种类	样品含量/(mg/L)	加入量/μg	测得量/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%	RSDs/%
酒石酸	94.1167	802.6174	1749.401	100.71	98.77	2.24
			1737.627	99.24		
			1714.533	96.36		
羟基柠檬酸	424.7225	2007.0151	6107.846	92.71	91.38	1.46
			6081.670	91.40		
			6054.174	90.03		
乳酸	136.3572	1006.7371	2393.136	102.27	101.52	0.90
			2388.328	101.79		
			2375.382	100.50		
柠檬酸	30.1916	102.2294	407.248	103.03	101.32	1.50
			404.914	100.75		
			404.309	100.16		

表 4(续)

有机酸种类	样品含量/(mg/L)	加入量/μg	测得量/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%	RSDs/%
琥珀酸	16.5801	102.0768	268.902	101.00	98.10	2.66
			265.199	97.38		
			263.723	95.93		
富马酸	36.8295	105.8947	468.295	94.43	91.06	3.98
			465.194	91.51		
			460.667	87.23		
没食子酸	1.2725	5.5669	18.086	96.30	94.43	2.37
			18.015	95.03		
			17.844	91.95		
原儿茶酸	1.9094	10.3233	28.854	94.54	91.92	2.69
			28.549	91.59		
			28.346	89.62		
绿原酸	2.3995	10.4120	33.389	90.22	87.11	3.83
			33.108	87.52		
			32.699	83.60		
咖啡酸	0.3039	1.0457	3.944	86.54	83.58	3.73
			3.916	83.87		
			3.879	80.30		
丁香酸	0.1967	1.0137	2.852	87.30	83.36	4.79
			2.813	83.46		
			2.772	79.31		
阿魏酸	0.1686	1.0534	2.589	85.72	82.78	3.35
			2.554	82.40		
			2.531	80.22		

2.5　实际样品含量检测

分别准确量取 3 个批次的洛神花酒供试品 10 mL, 按照 1.3.2 项下的方法平行制备供试品溶液, 在 1.3.3 项色谱条件下进行检测, 样品批号 20241015 溶液的色谱图见图 2, 3 个批次测量结果见表 5。结果显示, 羟基柠檬酸含量最高, 乳酸、酒石酸含量次之, 阿魏酸含量最低。随着贮藏时间延长, 样中羟基柠檬酸、富马酸、没食子酸、原儿茶酸、绿原酸和丁香酸含量均呈下降趋势。该变化规律推测与物质自身稳定性有关, 或有机酸与酒体中醇类物质发生酯化反应, 进而造成含量降低。

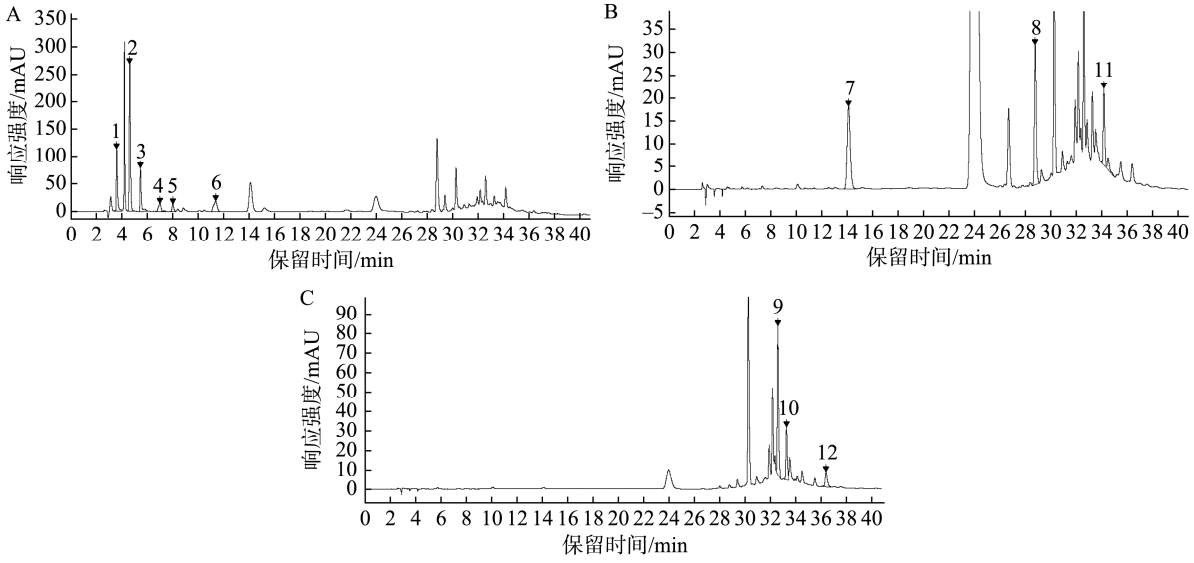


图 2　样品溶液色谱图

Fig.2　Chromatogram of the sample solution

表 5 洛神花酒中 12 种有机酸成分的含量(mg/L)
Table 5 Content of 12 kinds of organic acid components in *Hibiscus sabdariffa* L. wine (mg/L)

有机酸种类	20241015	20231022	20220925
酒石酸	94.1167	109.1426	87.4725
羟基柠檬酸	424.7225	243.4647	134.2175
乳酸	136.3572	154.0085	112.0137
柠檬酸	30.1916	25.4604	28.4368
琥珀酸	16.5801	27.2004	20.5518
富马酸	36.8295	32.8836	28.3842
没食子酸	1.2725	1.0906	0.6349
原儿茶酸	1.9094	1.6327	1.2460
绿原酸	2.3995	2.0852	0.7516
咖啡酸	0.3039	0.3456	0.1894
丁香酸	0.1967	0.1835	0.1565
阿魏酸	0.1686	0.0819	0.1347

3 讨论与结论

3.1 方法的局限性分析

本研究的样本数量有限，对洛神花酒有机酸组分动态变化规律的数据支撑尚不充分。方法中非极性有机酸组分的分离净化不够彻底，存在杂峰干扰，净化方法有待进一步优化。洛神花酒中有机酸组分丰富多样，本研究仅定性定量 12 种，部分未知色谱峰尚未完成结构鉴定，这将是后续研究的重点方向。

3.2 结 论

有机酸是洛神花酒中酸度的主要来源，也是影响酒体风味的重要物质。适宜含量的有机酸可使酒体丰满，清爽柔和，含量过低、过高或者比例失衡均会破坏酒体风味的协调性。洛神花酒中的酸度主要由酒石酸、羟基柠檬酸、柠檬酸、乳酸和琥珀酸构成。其中，酒石酸风味清爽、口感稳定；羟基柠檬酸含量较高，酸味柔和；乳酸口感柔和，略带乳香和轻微酸味；柠檬酸酸味清爽；琥珀酸口感醇厚。上述有机酸共同缓和了洛神花酒原有尖酸口感。此外，酒石酸、富马酸、没食子酸、原儿茶酸、绿原酸和阿魏酸对酒液中的化学组分和色泽具有稳定作用，有助于提升酒体稳定性与新鲜度。丁香酸、咖啡酸和阿魏酸可赋予酒体特殊香气，增强风味层次感。

不同批次、不同产地原材料生产出的洛神花酒之间除了具有共同的风味特征外，还形成了质量的差异性和层次性，表现为组分含量的差异。同时，由于有机酸不稳定特性，受储存条件和储存时间的影响，也会产生含量的差异化，表现为含量与储存时间成负相关变化。

目前国家标准及文献报道[16–17,19]的对洛神花酒中有机酸的检测方法，检测组分种类较少，不能覆盖洛神花酒中丰富的有机酸；且多采用检测波长为单波长，涉及有不同检测波长的组分时需要分开检测，耗时长，效率不高；国家标准中有机酸的检出限和定量限限值较高，灵敏度较低。对于这些问题，本研究建立了固相萃取柱-高效液相色谱法同时检测酒石酸、羟基柠檬酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸、没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸和阿魏酸 12 种有机酸的方法，并对前处理固相萃取柱的选择，及仪器条件包括检测波长的选择、流动相选择、色谱柱的选择进行了优化。

本研究采用固相萃取技术对样品进行净化与富集处理，能够有效去除洛神花酒中色素、糖类等基质干扰杂质，增强目标物抗干扰能力。结合多波长检测方式，可实现 12 种有机酸组分的快速、高效分离。经过方法学验证 12 种有机酸在各自浓度线性范围内线性关系良好，所测结果准确，检出限和定量限限值均低于国家标准，检测准确度较高。3 批次样品中羟基柠檬酸含量最高，乳酸、酒石酸含量次之，阿魏酸含量最低。本方法前处理简单，操作便捷，灵敏度高，为洛神花酒生产加工和风味控制提供一定的技术支持，为后续的产品开发应用奠定研究基础，进而扩大应用范围，将方法应用于更多食品基质的检测，提高检验效率，降低检验成本。

参考文献

[1] 陈容, 彭学著, 孔兴欣, 等. 玫瑰茄提取物中羟基柠檬酸的含量测定[J]. 山东化工, 2021, 50(20): 116–118.
CHEN R, PENG XZ, KONG XX, *et al*. Determination of hydroxycitric acid content in *Hibiscus sabdariffa* L. extract [J]. Shandong Chemical Industry, 2021, 50(20): 116–118.

[2] 李洪祥, 姜保平, 肖伟, 等. 玫瑰茄近十年的研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(4): 587–593, 598.
LI HX, JIANG BP, XIAO W, *et al*. A comprehensive review on *Hibiscus sabdariffa* L. [J]. Modern Chinese Medicine, 2017, 19(4): 587–593, 598.

[3] 李玉珠. 玫瑰茄酒的研制及其活性成分变化分析[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
LI YZ. Development of roselle wine and the change of its active components [D]. Chongqing: Southwest University, 2018.

[4] 郝晓庆, 刘玳瑶, 宋东宇, 等. 洛神花的营养活性成分及其综合利用研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(8): 307–314.
HAO XQ, LIU DY, SONG DY, *et al*. Research progress on nutritional active components and application of *Hibiscus sabdariffa* L. flower [J]. China Food Additives, 2023, 34(8): 307–314.

[5] 代建菊, 袁理春, 罗会英, 等. 洛神花-山楂复合果酱的工艺研究[J]. 中国农学通报, 2022, 38(28): 123–128.
DAI JJ, YUAM LC, LUO HY, *et al*. Technical study on roselle-hawthorn compound jam [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(28): 123–128.

[6] 陈沁雯, 于亚辉, 刘斌雄, 等. 玫瑰茄花萼的生物活性及开发利用研究

进展[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(6): 49–53.
CHEN QW, YU YH, LIU BX, *et al*. Research progress on pharmacological effects of roselle calyx and its development and utilization [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(6): 49–53.

[7] 李玉珠, 杜木英, 何瑞, 等. 玫瑰茄花萼生理活性成分及其开发利用研究进展[J]. 中国调味品, 2017, 42(6): 170–174.
LI YZ, DU MY, HE R, *et al*. Research progress on physiological active components and utilization of roselle calyces [J]. China Condiment, 2017, 42(6): 170–174.

[8] 王喻淇, 梅晓丹, 李洁, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap 的发酵玫瑰茄化学成分筛查和研究[J]. 质谱学报, 2019, 40(1): 50–59.
WANG YQ, MEI XD, LI J, *et al*. Identification of chemical constituents in fermented *Hibiscus sabdariffa* L. by UHPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometer [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2019, 40(1): 50–59.

[9] 宗凌丽, 孙小杰, 应月, 等. 全自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定果酒中14种有机酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(10): 270–278.
ZONG LL, SUN XJ, YING Y, *et al*. Determination of 14 kinds of organic acids in fruit wine by automated solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(10): 270–278.

[10] 郝俊光, 柯锋, 梁振荣, 等. 液相法测定米香型白酒发酵液中 18 种有机酸[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 283–290.
HAO JG, KE F, LIANG ZR, *et al*.Determination of 18 organic acids in rice flavored liquor fermentation broth by high pressure liquid chromatography [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 283–290.

[11] 刘兰花, 孙智伟, 刘长庆, 等. 液相色谱-高分辨质谱法检测果蔬脆片中 9 种有机酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 264–272.
LIU LH, SUN ZW, LIU CQ, *et al*. Determination of 9 kinds of organic acids in fruit and vegetable crisps by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 264–272.

[12] 唐静, 迟铭, 王珊, 等. 离子色谱法同时测定贝叶经样品中 3 种有机酸的含量[J]. 复旦学报(自然科学版), 2026, 65(1): 127–132.
TANG J, CHI M, WANG S, *et al*. Simultaneous determination of three organic acids in palm-leaf manuscripts by ion chromatography [J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2026, 65(1): 127–132.

[13] 付秋娟, 郝贤伟, 杜咏梅, 等. 烤烟上部烟叶中非挥发性有机酸及高级脂肪酸与烟叶内在品质的关系[J]. 烟草科技, 2024, 57(9): 24–32.
FU QJ, HAO XW, DU YM, *et al*. Relationship between non-volatile organic acids, higher fatty acids and lintrinsic quality of upper flue-cured tobacco leaves [J]. Tobacco Science & Technology, 2024, 57(9): 24–32.

[14] 汪慧敏, 孙森, 屈锋. 毛细管电泳法同时分析水、乳、膏类化妆品中 5 种有机酸[J]. 色谱, 2019, 37(7): 773–777.
WANG HM, SUN M, QU F. Simultaneous analysis of five organic acids in aqueous, lotion, and cream cosmetics by capillary electrophoresis [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(7): 773–777.

[15] 贾学忠. 紫外光谱法测定金银花提取物中有机酸的含量[J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9(21): 92–94.
JIA XZ. Determination of organic acid in honeysuckle extract by ultraviolet spectrophotometry [J]. China Health Standard Management, 2018, 9(21): 92–94.

[16] 舒楠, 路文鹏, 杨义明, 等. 基于 HPLC 法同时检测山葡萄酒中 6 种有机酸含量[J]. 中国酿造, 2025, 44(11): 266–271.
SHU N, LU WP, YANG YM, *et al*. Simultaneous determination of 6 organic acids in vitis amurensis wine by HPLC [J]. China Brewing, 2025, 44(11): 266–271.

[17] 路宏昌, 李婷婷, 刘盼, 等. 高效液相色谱法同时测定酒泉手工醋中的 11 种有机酸[J]. 食品科技, 2025, 50(7): 314–320.
LU HC, LI TT, LIU P, *et al*. Simultaneous determination of 11 organic acids in Jiuquan handmade vinegar by high performance liquid chromatography [J]. Food Science and Technology, 2025, 50(7): 314–320.

[18] 刘瑞红, 潘立宁, 王晓瑜, 等. 气相色谱测定烟草中非挥发有机酸方法改进[J]. 化学分析计量, 2022, 31(12): 22–28.
LIU RH, PAN LN, WANG XY, *et al*. Improvement of the analysis method for non-volatile organic acids in tobacco by gas chromatography [J]. Chemicalanalysis and Meterage, 2022, 31(12): 22–28.

[19] 徐冬梅, 郭占魁, 李金娟. 高效液相色谱法测定饮料中 6 种有机酸[J]. 饮料工业, 2023, 26(5): 36–40.
XU DM, GUO ZK, LI JJ. Determination of six organic acids in beverages by high performance liquid chromatography [J]. Beverage Industry, 2023, 26(5): 36–40.

[20] 罗东旭, 王速谋. 高效液相色谱法测定果汁中有机酸及糖类成分[J]. 现代食品, 2025(16): 177–179.
LUO DX, WANG SM. Determination of organic acids and sugars in fruit juices by HPLC [J]. Modern Food, 2025(16): 177–179.

[21] 易宗伟, 蔡文超, 余培荣, 等. 高效液相色谱法测定酱香型白酒中四种有机酸[J]. 中国酿造, 2025, 44(6): 281–286.
YI ZW, CAI WC, YU PR, *et al*. Determination of four organic acids in sauce-flavor Baijiu by HPLC [J]. China Brewing, 2025, 44(6): 281–286.

[22] 胡燕. 高效液相色谱法测定茶叶中 12 种有机酸的研究[J]. 中国茶叶, 2025, 47(10): 96–102.
HU Y. Study on the determination of 12 organic acids in tea by high performance liquid chromatography [J]. China Tea, 2025, 47(10): 96–102.

[23] 鲁长海, 曾军, 吴加秀, 等. 反相高效液相色谱法测定米酒中 4 种有机酸含量[J]. 现代食品, 2023, 29(23): 184–188.
LU CH, ZENG J, WU JX, *et al*. Determination of four organic acids in rice wine by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Modern Food, 2023, 29(23): 184–188.

[24] 刘春丽, 陈汉峰, 杨静, 等. 高效液相色谱法同时测定固体饮料中没食子酸、芦丁、鞣花酸和槲皮素的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(24): 63–70.
LIU CL, CHEN HF, YANG J, *et al*. Simultaneous determination of gallic acid, rutin, ellagic acid and quercetin content in solid drinks by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(24): 63–70.

[25] 刘雯, 覃慧杰, 何婷, 等. UPLC 法同时测定外感风痧颗粒中 14 种成分的含量[J]. 中成药, 2024, 46(5): 1425–1429.
LIU W, QIN HJ, HE T, *et al*. Simultaneous content determination of fourteen comstituents in Waigan Fengsha granules by UPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2024, 46(5): 1425–1429.

[26] 段和祥, 陈希, 鄢雷娜, 等. HPLC-DAD 法同时测定清心莲子饮中 7 种有机酸类成分的含量[J]. 药品评价, 2025, 22(2): 140–144.
DUAN HX, CHEN X, YAN LN, *et al*. Simultaneous determination of seven organic acids in Qingxin Lianzi decoction by HPLC-DAD [J]. Drug Evaluation, 2025, 22(2): 140–144.

[27] 张传, 金小青, 赵岳星. 基于新型立体结构的色谱固定相的高效液相色谱法检测分离 7 种有机酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(1): 167–172.
ZHANG C, JIN XQ, ZHAO YX. Simultaneous determination of gallic acid, rutin, ellagic acid and quercetin content in solid drinks by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(1): 167–172.

[28] 王丽丽, 杨军国, 林清霞, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器法测定茶叶中 10 种有机酸含量[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2019, 45(1): 47–53.
WANG LL, YANG JG, LIN QX, *et al*. Determination of 10 organic acids contents in tea using high performance liquid chromatographydiode array detector [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2019, 45(1): 47–53.

[29] 雷艳, 廖雯意, 叶帆. 高效液相色谱法同时测定果醋饮品中7种有机酸的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5857–5861.
LEI Y, LIAO WY, YE F. Simultaneous determination of 7 organic acids in fruit vinegar drinks by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(17): 5857–5861.

[30] 李彩林, 杨志国, 王华瑞, 等. 高效液相色谱法测定红香酥梨中 6 种有机酸含量[J]. 山西农业科学, 2019, 47(12): 2103–2106, 2138.
LI CL, YANG ZG, WANG HR, *et al*. Determination of six organic acids contents in red fragrant pear by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(12): 2103–2106, 2138.

[31] 李兰英, 许丽, 丁敏, 等. HPLC 检测功能食品中羟基柠檬酸主成份和两种非法添加药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(1): 10–16.
LI LY, XU L, DING M, *et al*. HPLC analysis of the active component and two illegally added compounds in hydroxycitric acid functional food [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2012, 3(1): 10–16.

[32] 李倩, 李小东, 杨子怡, 等. 高效液相色谱法同时测定发芽黑小麦中 11 种酚酸化合物[J]. 食品与生物技术学报, 2025, 44(10): 64–73.
LI Q, LI XD, YANG ZY, *et al*. Establishment of a HPLC method for simultaneous determination of 11 phenolic acids in germinated black wheat [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2025, 44(10): 64–73.

[33] 庞文娟, 秦海钰, 董斌, 等. 高效液相色谱法同时测定菊花决明子茶中 8 种有效成分的含量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(17): 166–171.
PANG WJ, QIN HY, DONG B, *et al*. Simultaneous determination of 8 kinds of active components in chrysanthemum and cassia seed tea by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(17): 166–171.

[34] 陈其钊, 陈嘉敏, 陈红香, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定红糖中有机酸[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(11): 173–178.
CHEN QZ, CHEN JM, CHEN HX, *et al*. Determination of organic acids content in brown sugar by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Food Research and Development, 2020, 41(11): 173–178.

[35] 郑明欣, 李亚瑜, 刘尊奇, 等. HPLC 法同时测定谷氨酸发酵尾液中 8 种有机酸的含量[J]. 现代化工, 2025, 45(3): 260–266.
ZHENG MX, LI YY, LIU ZQ, *et al*. Simultaneous determination of eight organic acids in glutamic acid fermentation tailings by HPLC method [J]. Modern Chemical Industry, 2025, 45(3): 260–266.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)