

团体标准

T/ NAIA×××-××××

葡萄酒中黄烷醇类物质含量的测定 高效液相色谱法

××××-××-××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、西北农林科技大学、宁夏农林科学院。

本文件主要起草人：张静、葛谦、闫玥、吴燕、李娴、孙翔宇、赵子丹、刘霞、杨静、牛艳、陈翔。本文件为首次发布。

葡萄酒中黄烷醇类物质含量的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了葡萄酒中黄烷醇类物质含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于葡萄酒中黄烷醇类物质：表没食子儿茶素、儿茶酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶酸、表儿茶酸没食子酸酯、杨梅素、异鼠李素含量的测定。

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

试料中的黄烷醇类物质用 75%甲醇水溶液提取，涡旋超声，微孔滤膜过滤，高效液相色谱法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯，

5.2 乙酸 (CH₃COOH)：优级纯

5.3 表没食子儿茶素 ((-)-Epigallocatechin, CAS 号 970-74-1)、儿茶酸 (catechin, CAS 号 7295-85-4)、表没食子儿茶素没食子酸酯 ((-)-Epigallocatechin gallate, CAS 号 989-51-5)、表儿茶酸 (Epicatechin, CAS 号 490-46-0)、表儿茶酸没食子酸酯 ((-)-Epicatechin gallate, CAS 号 1257-08-5)、杨梅素 (Myricetin, CAS 号 529-44-2)、异鼠李素 (Isorhamnetin, CAS 号 480-19-3)

5.4 80%甲醇水溶液：量取 80ml 甲醇，用水定容至 100 mL。

5.5 75%甲醇水溶液：量取 75ml 甲醇，用水定容至 100 mL。

5.6 黄烷醇类物质单标储备溶液

分别准确称表没食子儿茶素 ((-)-Epigallocatechin)、儿茶酸 (catechin)、表没食子儿茶素没食子酸酯 ((-)-Epigallocatechin gallate)、表儿茶酸 (Epicatechin)、表儿茶酸没食子酸酯 ((-)-Epicatechin gallate)、杨梅素 (Myricetin)、异鼠李素 (Isorhamnetin) 20 mg，用 80%甲醇水溶液 (5.4) 溶解并分别定容至 10 mL 容量瓶中，即为 2 mg/ml 的单标储备液，

于零下 20 摄氏度下，贮存于密闭的棕色玻璃瓶中，保存有效期为 6 个月。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.7 黄烷醇类物质混合标准工作液

在使用中用 80%甲醇水溶液（5.4）作为溶剂，将单体酚标准储备液进行稀释混合后成为 0.2 mg/ml 混合标准使用液，在零下 20℃条件下，有效期为 6 个月。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

6 仪器与设备

- 6.1 高效液相色谱仪（配紫外检测器）。
- 6.2 旋转蒸发仪。
- 6.3 涡旋仪。
- 6.4 离心机。
- 6.5 超纯水机。
- 6.6 0.45 μm 滤膜，有机相。

7 试样的提取

准确吸取 5.0 ml 葡萄酒样品于 50 ml 试管中，加入 20 ml 75%甲醇水溶液（5.5），旋涡振荡 1 min 后在室温下超声 30 min，经滤膜（6.5）过滤，上机待测。

8 测定

色谱柱：Agilent-ZORBAX SB-C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）或性能相当者。

流动相：A 为 2%乙酸水；B 为乙腈：水（1:1）-0.5%乙酸；梯度洗脱，条件见表 1。

柱温：40 °C。

检测波长：320 nm。

进样体积：10 μL。

表1 梯度洗脱表

时间, min	流速, mL/min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	0.9	90	10
5	0.9	89	11
10	0.9	88	12
20	0.9	62	38
30	0.9	56	44
40	0.9	14	86
40.1	0.9	14	86
45	0.9	90	10
48	0.9	90	10
48.1	0.9	90	10

8.1 标准曲线的制作

分别将 7 种黄烷醇类物质标准储备液稀释成 0.01 mg/ml、0.05 mg/ml、0.1 mg/ml、0.2 mg/ml、0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、2.0 mg/ml 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，峰面积（y）为纵坐标，计算标准曲线或求线性回归方程

8.2 试样测定

做两份试样的平行测定。取 10 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，试样溶液中酚酸响应值均应在定量测定范围之内。

8.3 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

试样中表没食子儿茶素、儿茶酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶酸、表儿茶酸没食子酸酯、杨梅素、异鼠李素的含量以质量分数 ω 计，数值以毫克每升（mg/L）计，按 式(1)计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V_1}{V} \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——样液中表没食子儿茶素、儿茶酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶酸、表儿茶酸没食子酸酯、杨梅素、异鼠李素测定质量浓度，单位为（mg/L）；

V₁ ——样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的体积，单位为升（L）；

n ——系数倍数

测定结果保留三位有效数字。

10 精密度

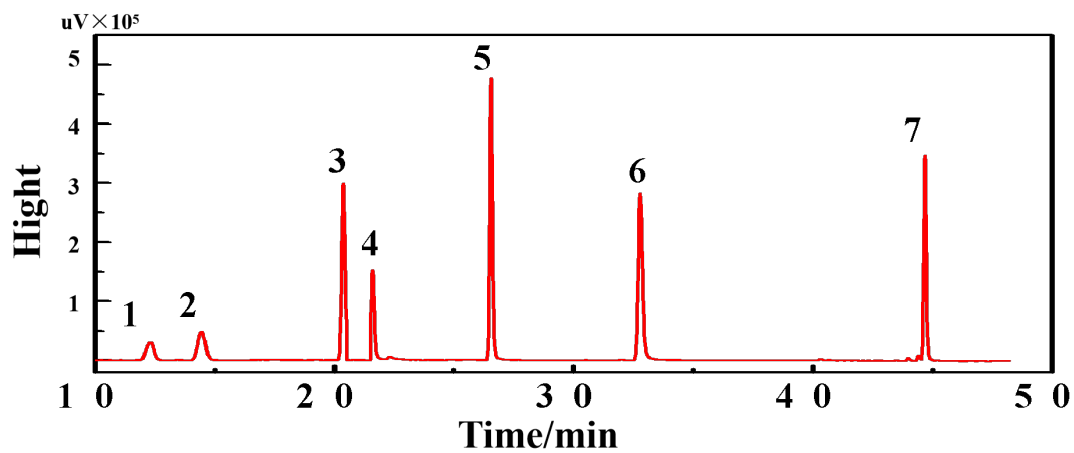
在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 10%。

附录 A

(资料性)

7 种黄烷醇类单体酚混合标准溶液标准色谱图

7 种黄烷醇类单体酚混合标准溶液标准色谱图，见图 A. 1。



标引序号说明：

1——表没食子儿茶素；

2——儿茶酸；

3——表没食子儿茶素没食子酸酯；

4——表儿茶酸；

5——表儿茶酸没食子酸酯；

6——杨梅素；

7——异鼠李素。

图 A. 1 7 种黄烷醇类单体酚混合标准溶液标准色谱图