

# 团体标准

T/ NAIA×××-××××

## 葡萄酒中对羟基肉桂酸类物质含量的测定 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、宁夏农林科学院、西北农林科技大学、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：葛谦、李彩虹、王劲松、马婷婷、张锋锋、牛艳、孙翔宇、苏龙、赵丹青、张伟、吴燕、赵子丹、张艳、王晓菁、张小飞。

本文件为首次发布。

# 葡萄酒中对羟基肉桂酸类物质含量的测定 高效液相色谱法

## 1 范围

本文件规定了葡萄酒中对羟基肉桂酸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对羟基肉桂酸类物质：香豆酸、反式-单阿魏酰酒石酸酯、咖啡酸、对香豆酸、4-羟基肉桂酸、阿魏酸、3-羟基肉桂酸、芥子酸、异阿魏酸含量的测定。

## 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

试料中的对羟基肉桂酸类物质用乙酸乙酯溶剂萃取，浓缩至干，甲醇定容，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 中规定的一级水。

5.1 甲醇 (CH<sub>3</sub>OH)：色谱纯。

5.2 乙酸 (CH<sub>3</sub>COOH)：优级纯。

5.3 乙酸乙酯 (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)：色谱纯。

5.4 香豆酸 (Coumalic Acid, CAS 号 500-05-0, 纯度 ≥ 98.7%)、反式-单阿魏酰酒石酸酯 (trans-Fertaric acid, CAS 号 74282-22-7, 纯度 ≥ 96.35%)、咖啡酸 (Caffeic acid, CAS 号 331-39-5, 纯度 ≥ 98%)、对香豆酸 (p-Coumaric acid, CAS 号 501-98-4, 纯度 ≥ 98%)、4-羟基肉桂酸 (4-Hydroxycinnamic acid, CAS 号 4501-31-9, 纯度 ≥ 97%)、3-羟基肉桂酸 (3-Hydroxycinnamic acid, CAS 号 14755-02-3, 纯度 ≥ 96.5%)、阿魏酸 (Ferulic acid, CAS 号 1135-24-6, 纯度 ≥ 99%)、芥子酸 (Sinapic acid, CAS 号 530-59-6, 纯度 ≥ 99%)、异阿魏酸 (trans-Fertaric acid, CAS 号 25522-33-2, 纯度 ≥ 95%)。

5.5 80%甲醇水溶液：量取 80 mL 甲醇，用水定容至 100 mL。

5.6 20%甲醇水溶液：量取 20 mL 甲醇，用水定容至 100 mL。

5.7 对羟基肉桂酸单标储备溶液

分别准确称取香豆酸(Coumalic Acid)250 mg, 反式-单阿魏酰酒石酸酯(trans-Fertaric acid) 10 mg, 咖啡酸(Caffeic acid) 100 mg, 对香豆酸(p-Coumaric acid) 20 mg, 4-羟基肉桂酸(4-Hydroxycinnamic acid) 25 mg, 3-羟基肉桂酸(3-Hydroxycinnamic acid) 500 mg, 阿魏酸(Ferulic acid) 100 mg, 芥子酸(Sinapic acid) 100 mg, 异阿魏酸(trans-Fertaric acid) 100 mg, 用80%甲醇水溶液(5.5)溶解并分别定容至10 mL容量瓶中, 即为25 mg/mL, 1 mg/mL, 10 mg/mL, 2 mg/mL, 2.5 mg/mL, 50 mg/mL, 10 mg/mL, 10 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL的单标储备液, 于-20 °C下, 贮存于密闭的棕色玻璃瓶中, 保存有效期为6个月。

## 5.8 对羟基肉桂酸混合标准工作液

以80%甲醇溶液(5.5)作为溶剂, 将单体酚分别稀释成2 mg/mL的标准溶液, 再将其稀释配制成0.2 mg/mL混合标准工作液, 在-20 °C条件下, 有效期为6个月。

## 6 仪器与设备

- 6.1 高效液相色谱仪(配紫外检测器)。
- 6.2 旋转蒸发器。
- 6.3 超纯水机。
- 6.4 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20.0 mL乙酸乙酯, 转移至分液漏斗中, 静置分层后分液, 收集上层有机相, 下层水相再次置于分液漏斗中萃取, 重复上述操作3次。合并有机相并转入蒸馏瓶中, 经旋转蒸发器蒸发至干。残渣溶于2.5 mL20%甲醇水溶液(5.6)中, 经滤膜(6.4)过滤, 上机待测。

## 8 测定

### 8.1 液相色谱参考条件

色谱柱: Agilent-ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6mm×250mm, 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 流动相梯度洗脱条件

时间, min	流速, mL/min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	0.8	90	10
5	0.8	88	12
15	0.8	87	13
18	0.8	84	16
21	0.8	80	20

26	0.8	70	30
36	0.8	55	45
36.1	0.8	55	45
38	0.8	90	10
43	0.8	90	10

## 8.2 标准曲线的制作

分别将 9 种对羟基肉桂酸类单体酚的标准储备液稀释成 0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0mg/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，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。

## 8.4 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

试样中香豆酸、反式-单阿魏酰酒石酸酯、咖啡酸、对香豆酸、4-羟基肉桂酸、阿魏酸、3-羟基肉桂酸、芥子酸、异阿魏酸的含量以质量分数 ω 计，数值以毫克每毫升（mg/mL）计，按式(1)计算：

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

式中：

ρ —— 样液中香豆酸、反式-单阿魏酰酒石酸酯、咖啡酸、对香豆酸、4-羟基肉桂酸、阿魏酸、3-羟基肉桂酸、芥子酸、异阿魏酸测定质量浓度，单位为（mg/L）；

V<sub>1</sub> —— 样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V —— 试样的体积，单位为克（ml）；

n —— 系数倍数；

测定结果保留三位有效数字。

## 10 精密度

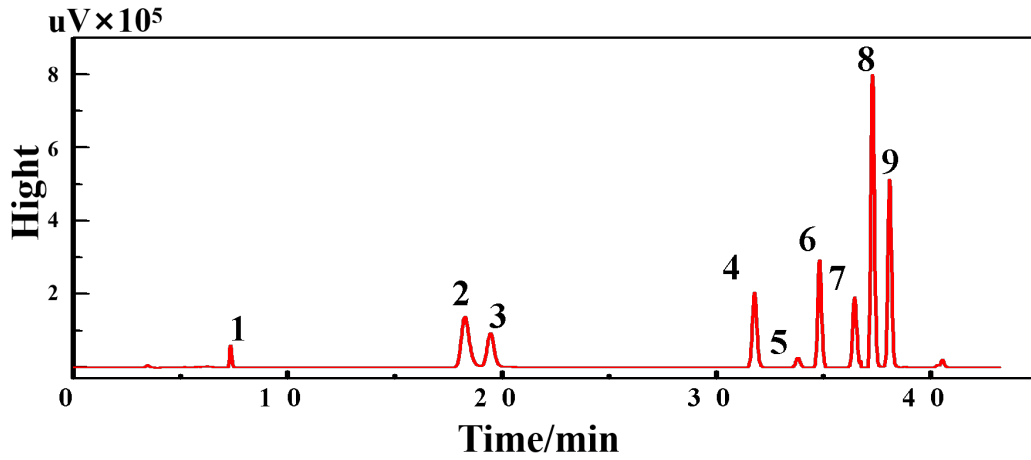
在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 10%。

## 附录 A

(资料性)

### 9 种对羟基肉桂酸类单体酚混合标准溶液色谱图

9 种对羟基肉桂酸类单体酚混合标准溶液色谱图，见图 A. 1。



标引序号说明：

- 1——香豆酸；
- 2——反式-单阿魏酰酒石酸酯；
- 3——咖啡酸；
- 4——对香豆酸；
- 5——4-羟基肉桂酸；
- 6——阿魏酸；
- 7——3-羟基肉桂酸；
- 8——芥子酸；
- 9——异阿魏酸。

图 A. 1 9 种对羟基肉桂酸类单体酚混合标准溶液色谱图