

团体标准

T/ NAIA×××-××××

葡萄酒中对羟基苯甲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。

本文件主要起草人：葛谦、李彩虹、孙翔宇、路洁、王晓菁、苟春林、单巧玲、赵银宝、王晓静、石欣。

本文件为首次发布。

葡萄酒中对羟基苯甲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苯甲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苯甲酸类物质：没食子酸、原儿茶酸、龙胆酸、香草酸、丁香酸、原儿茶酸甲酯、香草酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、香草酸乙酯含量的测定。

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

试料中的对羟基苯甲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规定的一级水。

5.1 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯，

5.2 乙酸 (CH₃COOH)：优级纯

5.3 乙酸乙酯 (C₄H₈O₂)：色谱纯

5.4 没食子酸(Gallic Acid, CAS 号 149-91-7)、原儿茶酸(Protocatechuic Acid, CAS 号 99-50-3)、龙胆酸(2,5-Dihydroxybenzoic Acid, CAS 号 490-79-9)、香草酸(Vanillic Acid, CAS 号 121-34-6)、丁香酸(Syringic Acid, CAS 号 530-57-4)、原儿茶酸甲酯(Methyl 3,4-dihydroxybenzoate, CAS 号 2150-43-8)、香草酸甲酯(Methyl Vanillate, CAS 号 3943-74-6)、对羟基苯甲酸乙酯(Ethyl 4-hydroxybenzoate, CAS 号 120-47-8)、香草酸乙酯(Vanillic acid ethylester, CAS 号 617-05-0)。

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 对羟基苯甲酸单标储备溶液

分别准确称取没食子酸 (Gallic Acid) 250 mg、原儿茶酸 (Protocatechuic Acid) 250 mg、龙胆酸 (2,5-Dihydroxybenzoic Acid) 250 mg、香草酸 (Vanillic Acid) 20 mg、丁香酸 (Syringic Acid) 20 mg、原儿茶酸甲酯 (Methyl 3,4-dihydroxybenzoate) 100 mg、香草酸甲酯 (Methyl

Vanillate) 100 mg、香草酸乙酯 (Vanilicacidethylester) 100 mg、对羟基苯甲酸乙酯 (Ethyl 4-hydroxybenzoate) 500 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, 25 mg/mL, 25 mg/mL, 2 mg/mL, 2 mg/mL, 10 mg/mL, 10 mg/mL, 10 mg/mL, 50 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。

5.8 对羟基苯甲酸混合标准工作液

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 旋转蒸发仪。

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, 经旋转蒸发仪蒸发至干。残渣溶于 2.5 mL 20% 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 (4.6 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	0.8	90	10
1	0.8	89	11
15	0.8	84	16
20	0.8	45	55
30	0.8	40	60
30.1	0.8	40	60
45	0.8	90	10
47	0.8	90	10
47.1	0.8	90	10

8.2 标准曲线的制作

分别将 9 种对羟基苯甲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、2.0 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

8.3 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

试样中没食子酸、原儿茶酸、龙胆酸、香草酸、丁香酸、原儿茶酸甲酯、香草酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、香草酸乙酯的含量以质量分数 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 ——样液中没食子酸、原儿茶酸、龙胆酸、香草酸、丁香酸、原儿茶酸甲酯、香草酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、香草酸乙酯测定质量浓度，单位为（mg/L）；

V_1 ——样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V ——试样的体积，单位为毫升（mL）；

n ——系数倍数；

测定结果保留三位有效数字。

10 精密度

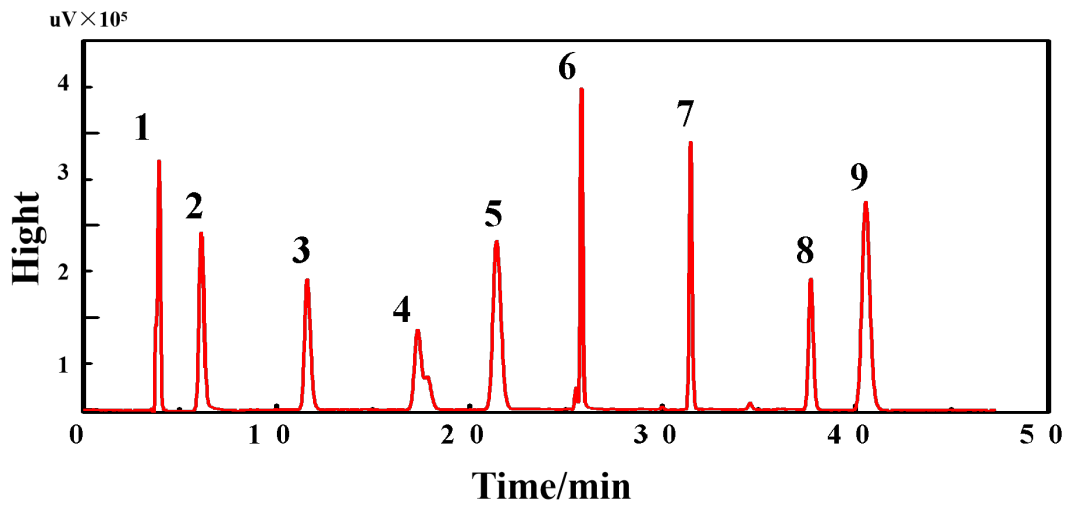
在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 10%。

附录 A

(资料性)

9 种对羟基苯甲酸类单体酚混合溶液标准色谱图

9 种对羟基苯甲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——样液中没食子酸；
- 2——原儿茶酸；
- 3——龙胆酸；
- 4——香草酸；
- 5——丁香酸；
- 6——原儿茶酸甲酯；
- 7——香草酸甲酯；
- 8——对羟基苯甲酸乙酯；
- 9——香草酸乙酯。

图 A.1 9 种对羟基苯甲酸类单体酚混合标准溶液色谱图