

团体标准

T/ NAIA×××-××××

葡萄中酚酸类化合物含量的测定 高效液相色谱法

Determination of phenolic acid compounds in grape

High Performance Liquid Chromatography

2025-××-××发布

2025-××-××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、宁夏回族自治区农产品质量安全中心、上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所、宁夏食品检测研究院、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：杨静、牛艳、赵越、王晓菁、张锋锋、吴燕、苟春林、王彩艳、刘霞、宋玮、陈翔、开建荣、张学玲、张小飞。

本文件为首次发布。

葡萄中酚酸类化合物含量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了葡萄中酚酸类化合物的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于葡萄中没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、4-羟基苯甲酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和异阿魏酸的高效液相色谱测定。

本文件的方法定量限：方法定量限均为 0.1 mg/kg。

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

本文件没有需要规定的术语和定义。

4 原理

试样中的酚酸类化合物用乙酸乙酯+乙醚（ $V+V=50+50$ ）提取，振荡提取，微孔滤膜过滤，用高效液相色谱仪检测和确证，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有规定外，所有试剂均为分析纯，水符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

5.2 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.3 甲酸（ CH_2O_2 ）：色谱纯。

5.4 乙酸乙酸（ $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ）：分析纯。

5.5 乙醚（ $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$ ）：分析纯。

5.6 没食子酸（gallic acid, CAS 号 149-91-7）、原儿茶酸（protocatechuic acid, CAS 号 99-50-3）、绿原酸（chlorogenic acid, CAS 号 327-97-9）、4-羟基苯甲酸（p-hydroxybenzoic acid, CAS 号 99-96-7）、咖啡酸（caffeic acid, CAS 号 331-39-5）、丁香酸

(syringate, CAS 号 530-57-4)、对香豆酸 (p-coumaric acid, CAS 号 501-98-4)、阿魏酸 (ferulic acid, CAS 号 1135-24-6)、异阿魏酸 (ferulic acid, CAS 号 537-98-4)。

5.7 标准溶液配制

5.7.1 标准储备溶液：分别准确称取适量的没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、4-羟基苯甲酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和异阿魏酸标准品（精确至 0.01 mg），用甲醇溶解，分别配制成 1000 mg/L 的标准储备溶液，-18 °C 下保存。

5.7.2 混合标准中间溶液：根据需要分别取酚酸类化合物的标准储备液，用甲醇稀释成 10 mg/L 标准中间溶液，-18 °C 下保存。

5.7.3 标准工作溶液（0.01 mg/L~30 mg/L）：吸取一定量的混合标准中间溶液于容量瓶中，用甲醇定容至刻度。

5.8 0.1%甲酸溶液（体积分数）：量取 1mL 甲酸，用水定容至 1000mL。

5.9 滤膜：0.22 μm，有机相。

5.10 离心管：50 mL，塑料。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.0001 g。

6.3 组织捣碎机：12000 r/min。

6.4 恒温振荡器：400 r/min。

6.5 离心机：4000 r/min。

6.6 旋转蒸发仪。

6.7 涡旋混合器。

7 分析步骤

7.1 试样的制备

葡萄样品于-18 °C冷冻冰箱中保存。试验时将葡萄样品取出，用高速组织捣碎机打浆，置于样品瓶中，-18 °C冷冻备用。

7.2 试样的提取

称取试样 5g（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管，加入 20 mL 乙酸乙酯，充分振摇混匀，振荡提取 10 min，放入离心机，4000 r/min 离心 5 min。将上清液旋转浓缩近干，用 2 mL 甲醇定容，过 0.22 μm 滤膜，待测定。

7.3 色谱参考

a) 色谱柱：C18 柱，250 mm×4.6 mm (i.d)，5 μm，或性能相当者；

b) 柱温：30 °C；

- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 波长：280 nm；
- e) 流动相：A 相为 0.1%甲酸溶液（5.8），B 相为乙腈，梯度洗脱条件见表 1；
- f) 进样量：10.0 μ L。

表 1 流动相及其梯度条件（ V_A+V_B ）

时间 (min)	流 速 (mL/ min)	V_A (%)	V_B (%)
0.00	1.0	90	10
20.00	1.0	80	20
25.00	1.0	80	20
26.00	1.0	80	20
27.00	1.0	90	10
30.00	1.0	90	10

7.4 标准曲线的绘制

用甲醇将酚酸类化合物标准贮备溶液逐级稀释得到浓度为 0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、5.0 mg/L、10 mg/L、30 mg/L 的标准工作溶液，依次由低到高进样检测，质量浓度 X （mg/L）为横坐标，以相应的峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归，得到标准曲线回归方程。

7.5 测定

取标准工作溶液和样品定容液（7.2）进行测定，以色谱峰保留时间定性，以标样色谱峰峰面积和样品溶液峰峰面积比较定量。同时做空白实验。

8 结果计算和表达

试样中没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、4-羟基苯甲酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和异阿魏酸的含量以质量分数 ω 计，数值以毫克每千克（mg/kg）计，按式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V \times V_1}{m \times V_2} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- ω —— 试样中被测物残留量的数值，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- ρ —— 试样溶液中被测物的含量，单位为毫克每升（mg/L）；
- V —— 试样中加入的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；
- V_f —— 试样的最终定容体积，单位为毫升（mL）；
- m —— 试样质量的数值，单位为克（g）；
- V_2 —— 提取液分取体积，单位为毫升（mL）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 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%。

10 色谱图

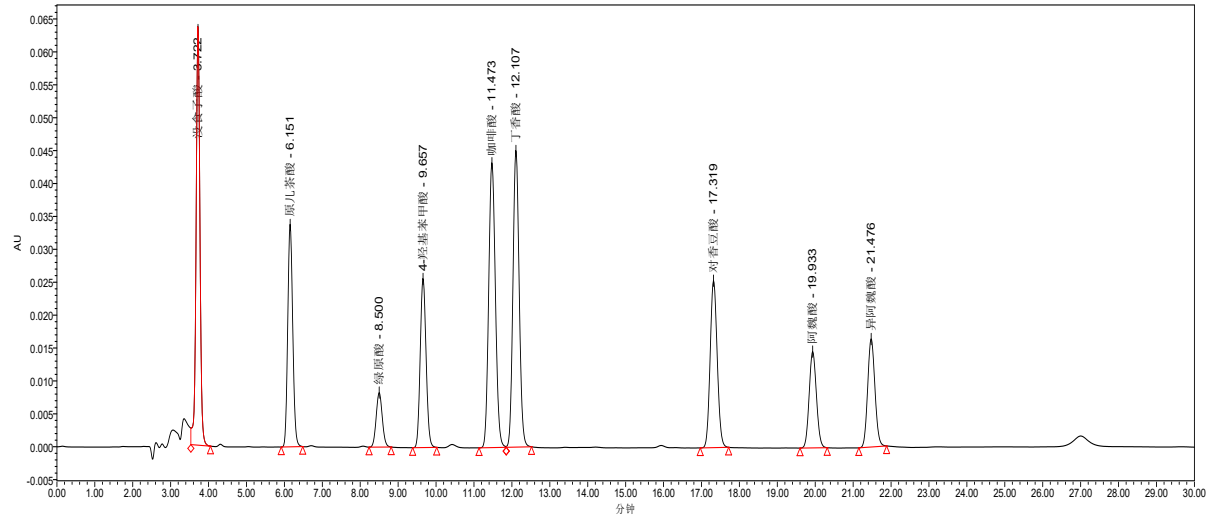
酚酸类化合物色谱图参见图 A。

附录 A

(资料性)

酚酸类化合物标准溶液色谱图

酚酸类化合物标准溶液色谱图。



图A 酚酸类化合物标准溶液色谱图（1 mg/L）