ICS 67.160.10
CCS C 151

T/NAIA

团 体 标 准

T/ NAIA 0369—2025

葡萄酒中4种羟基肉桂酸类物质的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 4 Hydroxycinnamic Acid Compounds in Wine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry(LC-MS/MS)

2025-03-10 发布 2025-03-31 实施

宁夏化学分析测试协会 发 布

全国团体标准信息平台

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》规定编写。

本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

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：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监督管理总局重点实验室（枸杞及葡萄酒质量安全））、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：汤丽华、马雪梅、岳苑、郭阳、朱燕燕、吕毅、王琛、王泽岚、吴明、马桂娟、张小飞。

全国团体标准信息平台

葡萄酒中 4 种羟基肉桂酸类物质的测定 高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了葡萄酒中绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸 4 种羟基肉桂酸的高效液相色谱-质谱检测方法。

本文件适用于葡萄酒中绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸 4 种羟基肉桂酸的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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实验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经水涡旋振荡提取，取上清液，经分散固相萃取净化，反相色谱柱分离，以保留时间定性，供高效液相色谱-质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

本方法所用的试剂，除另有规定外，均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。
5.1.2 甲醇：色谱纯。
5.1.3 甲酸：色谱纯。
5.1.4 0.1%甲酸水溶液：取甲酸（5.1.3）1.0 mL，用水定容到 1000mL，摇匀。
5.1.5 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸（5.1.3）1.0 mL，用乙腈（5.1.1）定容到 1000mL，摇匀。
5.1.6 十八烷基键合硅胶吸附剂（C_{18}）粉末：粒径 50μm。

5.2 标准品

标准品：咖啡酸（Caffeic acid，CAS 号 331-39-5，$C_9H_8O_4$），纯度≥95%；对香豆酸（p-Coumaric acid，CAS 号 501-98-4，$C_9H_8O_3$），纯度≥95%；绿原酸（Chlorogenic acid，CAS 号 327-97-9，$C_{16}H_{18}O_9$），，纯度≥95%；阿魏酸（Ferulic adid，CAS 号 1135-24-6，$C_{10}H_{10}O_4$），纯度≥95%。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 标准储备液（1.0mg/mL）：分别准确称取绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸标准品 10mg（准确至 0.1mg）于 10mL 容量瓶中，用甲醇（5.1.2）溶解并定容至刻度，4℃保存。
5.3.2 混合标准中间液（100μg/mL）：分别准确吸取绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸标准储备液（5.3.1）各 1.0mL 于 10mL 容量瓶中，用水定容，4℃保存。
5.3.3 混合标准使用液：分别准确吸取混合标准储备液（5.3.2）适量，纯水配制成浓度为 20.0ng/mL~500.0ng/mL 的标准工作液，临用现配。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源(ESI)。
6.2 分析天平：感量 0.1mg。
6.3 涡旋混合器。
6.4 离心机：转速不低于 8000r/min。
6.5 超声波发生器。
6.6 水相微孔滤膜，孔径 0.22μm，或性能相当者。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取代表性样品 2 瓶摇匀，冷藏保存。

7.2 试样的提取

吸取 5.0mL 试样于 50mL 离心管中，加入 10.0mL 水，涡旋振荡提取 10min。取 2mL 提取液加入含有 100mg C_{18} 粉末（5.1.6）的离心管中，涡旋 5min，8000r/min 离心 5min，取上清液经 0.22μm 微孔滤膜（6.6）过滤，上机待测。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件

a）色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱，2.1 mm×100 mm，粒径 1.8μm 或性能相当者。
b）柱温：30℃。
c）流动相：A：0.1%甲酸水溶液，B：0.1%甲酸乙腈溶液；梯度洗脱见表 1。
d）流速：0.30mL/min。
e）进样量：10μL。

表 1　流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流速/（mL/min）	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.30	85	15
1.00	0.30	85	15
5.00	0.30	45	55
7.00	0.30	15	85
8.00	0.30	85	15
10.00	0.30	85	15

7.3.2 质谱参考条件

a）离子源：电喷雾离子源（ESI）。
b）扫描方式：负离子扫描。
c）检测方式：多反应监测（MRM）。
d）离子源温度：325℃。
e）毛细管电压：3.0kV。
f）脱溶剂气流量：800L/h。
g）脱溶剂气温度：500℃。
h）碰撞气流速：0.15mL/min。
i）锥孔气流速：150L/h。
j）定性离子对、定量离子对、碰撞能量等参数参见附录 A。

7.4 定性测定

经确证分析被测物色谱峰保留时间与标准物质相一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，所选择的离子均出现。同时所选择离子的丰度比与标准物质相关离子的相对丰度一致，相似度在允许偏差之内（见表 2），则可判定样品中存在对应的被测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	＞50%	＞20%至 50%	＞10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.5 定量测定

根据样液中被测物含量情况，选定浓度相近的混合标准工作溶液，混合标准工作溶液和待测样液中被测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。混合标准工作溶液与样液等体积进样测定。标准溶液及样液均按 7.3.1 和 7.3.2 规定的条件进行测定，如果样液中与标准溶液相同的保留时间有峰出现，则对其进行确证。绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸的定量离子对典型色谱图参见附录 B，采用标准曲线外标法定量。

7.6 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

8 结果计算

试样中绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{C \times V}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

式中：
X ——样本中各化合物含量，单位为毫克每升（mg/L）；
C ——测定试样浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
V ——试样总体积，单位为毫升（mL）；
m ——试样质量，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

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

10 其他

绿原酸、对香豆酸、咖啡酸、阿魏酸的定量限均为 0.06mg/L。

全国团体标准信息平台

附录 A
（资料性）
绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸的质谱参数

表 A.1　绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸的质谱参数

被测物名称	母离子(m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压（V）	碰撞能量（eV）
绿原酸	353.1	191.0*	67	26
		161.0	67	38
对香豆酸	162.9	119.1*	77	19
		93.0	77	40
咖啡酸	179.0	135.0*	30	15
		107.0	30	30
阿魏酸	193.0	134.0*	61	20
		178.0	61	18

注：*为定量离子

全国团体标准信息平台

附录 B
（资料性）
绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸定量离子对典型色谱图

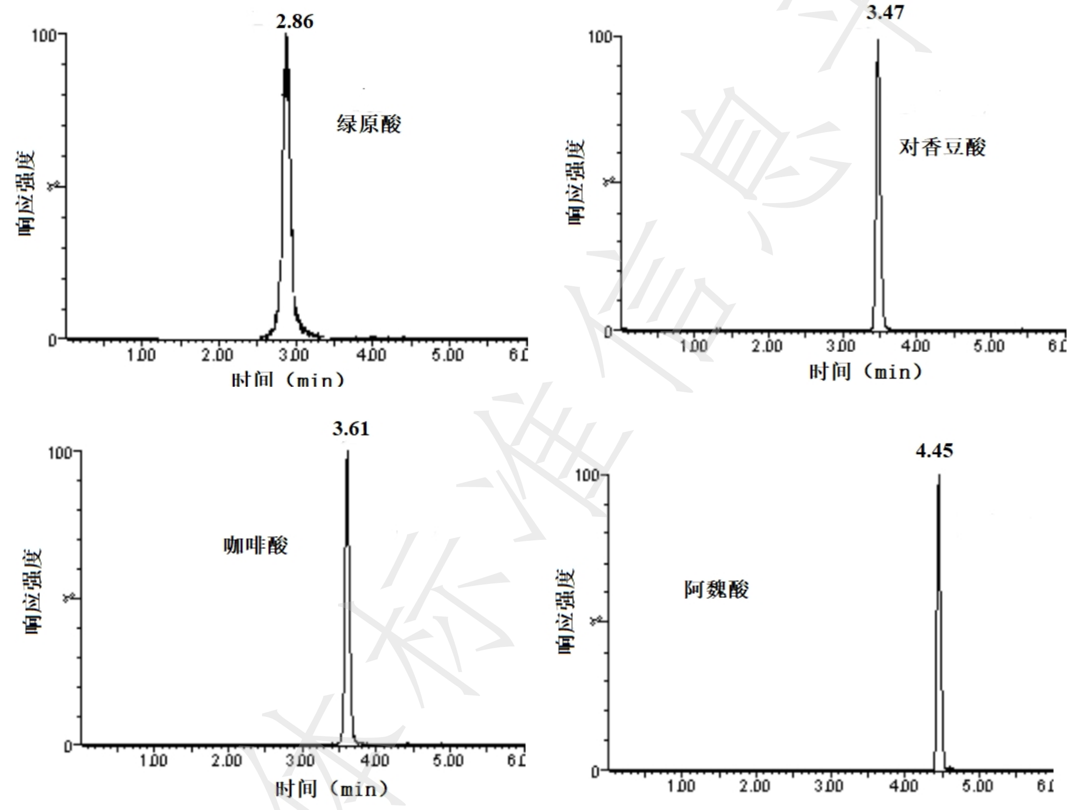

图 B.1　绿原酸、对香豆酸、咖啡酸和阿魏酸定量离子对典型色谱图