

## 莽草酸

(决议 Oeno 33/2004)

### 1 介绍

莽草酸(3,4,5-三羟甲基-1-环己烯-1-羧酸)由奎宁酸脱水生物法合成,可以作苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和植物生物碱的前体,是一种经常在水果中发现的小型羧酸。

经过国际联合比对实验确认,本方法可有效应用于分析葡萄酒样品中天然存在的 10 mg/L~150 mg/L 莽草酸。该方法经过实验室间使用 HPLC、GC/FID 和 GC/MS 方法进行比对,进一步确认了其真实性。

### 2 范围

本文介绍了采用高效液相色谱法测定莽草酸含量在 1 mg/L~300 mg/L 范围内的红葡萄酒、桃红葡萄酒和白葡萄酒(包括气泡葡萄酒和特种葡萄酒)。此方法用于气泡葡萄酒检验时,样品应先进行脱气处理(建议超声法)。

### 3 原理

无需前处理,使用有联用柱的高效液相色谱对葡萄酒样品中的莽草酸直接进行测定。第一步,葡萄酒中的有机酸被  $C_{18}$  反相柱预分离,然后在 65℃ 下用阳离子交换柱进行进一步分离。使用轻微酸化的水作为洗脱液,莽草酸可以从基线中显露出来,葡萄酒基质无干扰。因为环己烯双键共轭作用,莽草酸具有强烈的吸收,可以使用紫外检测器在 210 nm 波长处进行检测。

### 4 试剂和材料

- 4.1 莽草酸,纯度至少为 98%。
- 4.2 0.5 mol/L 硫酸。
- 4.3 双蒸水。
- 4.4 洗脱液的制备(0.01 mol/L 硫酸溶液):吸取 20 mL 0.5 mol/L 的硫酸溶液转移至 1 000 mL 的容量瓶中,加入约 900 mL 双蒸水,摇匀后定容,使用 0.45  $\mu$ m 滤膜进行过滤,脱气。
- 4.5 标准储备溶液的制备(500 mg/L 莽草酸):准确称量 50 mg 莽草酸,完全转移至 100 mL 容量瓶中,加入大约 90 mL 双蒸水,摇匀后定容。-18℃ 下该储备液可以存放数月。
- 4.6 标准工作溶液的制备:用双蒸水将 500 mg/L 的储备液稀释至 5 个标准工作溶液,分别为 5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L。标准工作溶液现配现用。

### 5 仪器

#### 5.1 高效液相色谱系统

- 5.1.1 具有六向进样阀,5  $\mu$ L 进样器或其他装置的高效液相色谱仪。

- 5.1.2 泵系统,可形成精确、稳定的流速。
- 5.1.3 柱加热系统,可以使 300 mm 柱加热至 65℃。
- 5.1.4 UV-VIS 检测器,可在 210 nm 波长下检测。
- 5.1.5 积分仪或其他数据采集装置。

## 5.2 HPLC 不锈钢柱

### 5.2.1 保护柱

建议在分析柱之前装一个适当的前柱。

### 5.2.2 分析柱系统

#### 5.2.2.1 反相柱

材料:不锈钢。内径:4 mm~4.6 mm。长度:200 mm~250 mm。

固定相:球状 C<sub>18</sub>反相材料,颗粒直径 5 μm\*。

#### 5.2.2.2 阳离子交换柱(可加热至 65℃)

材料:不锈钢。内径:4 mm~7.8 mm。长度:300 mm。

固定相:磺酸化立体二乙烯苯胶体型树脂(S-DVB),氢包裹,交联度为 8%\*\*。

## 6 样品

干净的样品可直接装入样品瓶,无需前处理直接上机。若样品浑浊可用 0.45 μm 滤膜过滤后,舍弃最初滤出液,上机。

## 7 步骤

### 7.1 HPLC 的操作条件

用全环状进样系统将 5 μL 葡萄酒注入色谱仪。

流速:0.4 mL/min(如果阳离子交换柱的内径是 4 mm);

0.6 mL/min(如果阳离子交换柱的内径是 7.8 mm)。

流动相:0.01 mol/L 硫酸溶液。

阳离子交换柱温度:65℃。

运行时间:40 min。

平衡时间:20 min(保证葡萄酒基质中的所有物质均被洗脱)。

检测器波长:210 nm。

进样体积:5 μL。

注:因为不同柱子的分离特性不同,且不同 HPLC 装置的死体积不同,莽草酸峰的保留时间可能会存在一定差异。莽草酸可以通过计算与酒石酸峰的相对保留值来进行鉴别。尝试不同的 C<sub>18</sub>反相柱和阳离子交换柱,计算出相对保留值为 1.33(±0.2)。

### 7.2 检测限

根据 OIV 协议计算本方法的检测限为 1 mg/L。

\* Lichrospher™ 100 RP-18, Hypersil™-ODS 或 Omnichrom™ YMC-ODS-A 等可作为参考的商业化固相柱。

\*\* Aminex™ HPX 87-H 或 Rezex™ ROA-Organic Acid 等可作为参考的商业化固相柱。

## 8 计算

用工作标准溶液(4.6)做一个5点标准曲线。

按外标法,可以通过对比待测液和工作曲线中莽草酸峰保留时间的峰面积进行莽草酸的定量。莽草酸的浓度以 mg/L 表述,结果保留1位小数。

## 9 精密度

本方法由19间国际实验室参与协同比对实验研究进行验证。研究包括红葡萄酒和白葡萄酒共5个不同样品。样品中莽草酸的浓度范围为10 mg/L~120 mg/L(见附录C)。

重现性和再现性的标准差与莽草酸的浓度关系(见附录B),实际方法精密度参数可依下列公式计算:

$$S_r = 0.0146 \times x + 0.2716$$

$$S_R = 0.0286 \times x + 1.4883$$

其中, $x$ 为莽草酸的浓度(mg/L)。

例如,莽草酸浓度为50 mg/L,此时:

$$S_r = \pm 1.0 \text{ mg/L}$$

$$S_R = \pm 2.92 \text{ mg/L}$$

## 10 附录

附录A为莽草酸与其他有机酸分离的典型色谱图。

附录B为莽草酸浓度与重现性标准差、再现性标准差的关系。

附录C为实验室间协同比对实验研究结果的统计数据。

## 参考文献

- [1] Römpp Lexikon Chemie-Version 2.0, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag 1999.
- [2] Wallrauch S., Flüssiges Obst3, 107-113(1999).
- [3] 44<sup>th</sup> Session SCMA, 23-26 march 2004, Comparison of HPLC-, GC- and GC-MS-Determination of Shikimic Acid in Wine, FV 1193.

### 附录 A 葡萄酒中有机酸的色谱图

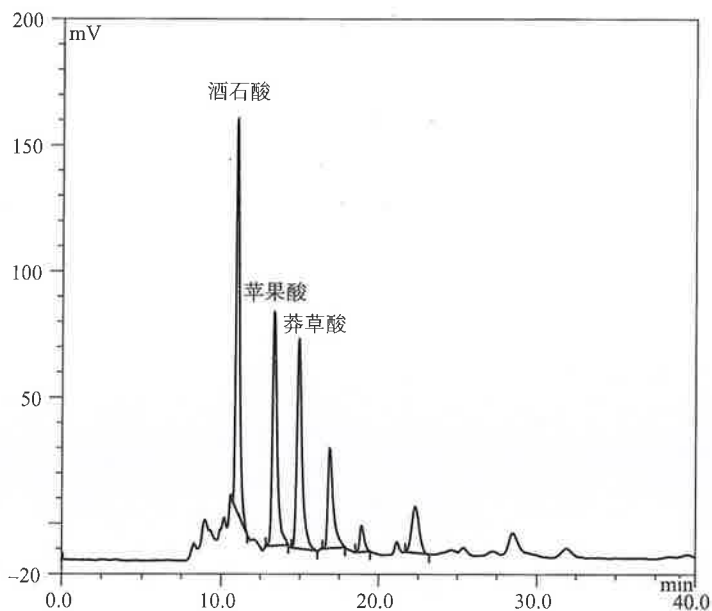


图 A.1

### 附录 B 莽草酸浓度与重现性和再现性标准差关系

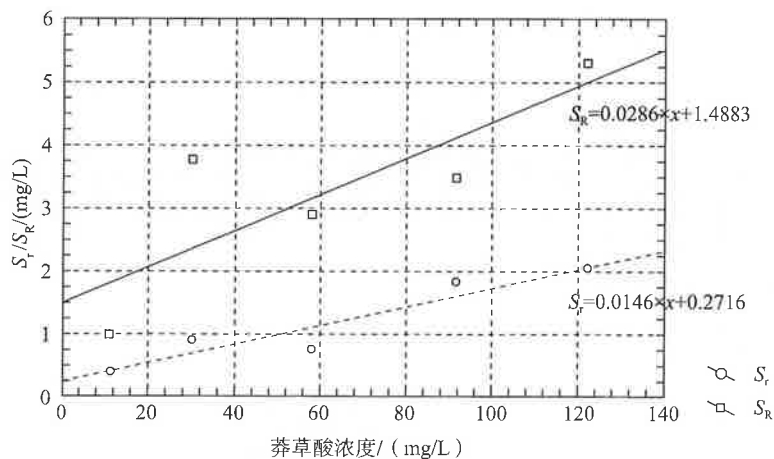


图 A.2

## 附录 C

### 方法准确度参数表

表 C.1

样品编号	A	B	C	D	E
参加比对实验室数量	19	19	19	19	19
接受实验结果的实验室数量	17	18	17	18	18
平均值	58.15	30.05	11.17	122.17	91.20
$S_r^2$	0.545 88	0.846 94	0.193 53	4.324 17	2.673 06
$S_r$	0.738 84	0.920 30	0.439 92	2.079 46	1.634 95
RSD <sub>r</sub> /%	1.27	3.06	3.93	1.70	1.79
$r$	2.07	2.58	1.23	5.82	4.58
$S_L^2$	8.452 21	13.270 78	0.730 13	24.627 37	8.555 08
$S_R^2$	8.998 09	14.117 73	0.923 66	28.951 54	11.228 14
$S_R$	2.999 68	3.757 36	0.961 07	5.380 66	3.350 84
RSD <sub>R</sub> /%	5.16	12.50	8.60	4.40	3.67
$R$	8.40	10.52	2.69	15.07	9.38

$S_r^2$ ——重复性方差。  
 $S_r$ ——重复性标准差。  
RSD<sub>r</sub>——重复性相对标准差,%。  
 $r$ ——重复性限。  
 $S_L^2$ ——实验室间方差。  
 $S_R^2$ ——再现性方差。  
 $S_R$ ——再现性标准差。  
RSD<sub>R</sub>——再现性相对标准差,%。  
 $R$ ——再现性限。