

超高效液相色谱法测定葡萄汁中单咖啡酰酒石酸的含量

庞海霞^{1,2}, 马鹏程³, 马 丽¹, 张旺喜^{1,*}

(1.湖北工业大学化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430068; 2.中国地质大学材料与化学学院, 湖北 武汉 430074;

3.上海标检产品检测有限公司, 上海 200131)

摘 要: 建立测定葡萄汁饮料中单咖啡酰酒石酸含量的超高效液相色谱法, 对方法学进行了验证。结果表明在0.50~50.00 µg/mL范围内线性关系良好, 方法的批内及批间准确度在97.1%~106.0%, 精确度(RSD)小于4.1%, 基质加标回收率在101.8%~109.0%。用该法测定了市售葡萄汁饮料中咖啡酰酒石酸的含量, 结果准确。

关键词: 单咖啡酰酒石酸; 葡萄汁饮料; 超高效液相色谱; 方法学验证

Determination of Caferic Acid in Grape Juice Drink by Ultra-Performance Liquid Chromatography

PANG Hai-xia^{1,2}, MA Peng-cheng³, MA Li¹, ZHANG Wang-xi^{1,*}

(1. School of Chemical and Environment Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

2. Faculty of Material Science and Chemistry, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China;

3. STC (Shanghai) Co. Ltd., Shanghai 200131, China)

Abstract: A method was proposed and validated for determination of caferic acid in grape juice by ultra-performance liquid chromatography. The results showed that there was good linearity in the range of 0.50–50.00 µg/mL. The inter-batch and intra-batch precision (RSD) were between 97.1% and 106.0%, and the accurate (RSD) was less than 4.1%. The recoveries of caferic acid from spiked samples ranged from 101.8% to 109.0%. The described method was successfully used for determination of caferic acid in commercial grape juice drinks.

Key words: caferic acid; grape juice drink; ultra-performance liquid chromatography; method validation

中图分类号: O657.72

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)10-0135-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201310029

葡萄属葡萄科, 为落叶藤本植物, 果实药食兼用。近几年, 通过众多学者的研究证实了葡萄具有抗毒杀菌、抗氧化减缓衰老、防癌抗癌、抗贫血、降低胃酸利胆、抗动脉粥样硬化、补益和兴奋大脑神经、利尿消肿等功效^[1-4]。葡萄多酚是从葡萄中提取的天然植物多酚类活性物质, 是葡萄中存在的所有酚类物质的总称。按照其酚羟基数目、位置以及结合方式的不同, 可分为黄酮类多酚和非黄酮类多酚, 前者包括花青素(anthocyanins)、儿茶素(catechins)和黄酮醇(flavonols)等, 而后者主要包括羟基苯甲酸(hydroxybenzoic acids)、羟基酸(hydroxycinnamic acids, HCAs)和芪类化合物(stilbenes)等^[5]。它们主要分布在叶片和果皮中, 果肉中的含量较少, 而果汁中除了花色苷外几乎不含有其他的黄酮类, 主要为一些非黄酮类型的酚酸类物质^[6-7]。分析检测酚酸

类化合物的文献报道较多, 主要采用液相色谱的方法, 大多采用较长的梯度洗脱方式分离尽可能多的化合物, 并进行组分结构的确认。如Shui Guanghou等^[8]建立了在90min内分析果汁中10种有机酸及21种酚酸类化合物的方法, 但并没有包含单咖啡酰酒石酸, Isabella等^[9]采用60min的梯度分析鉴定了葡萄中15种酚酸类化合物, Sergio等^[10]在86min内分析鉴定了葡萄酒中48种酚酸类化合物, William等^[11]使用60min的梯度形式测定了市售果汁及饮料中13种酚酸类化合物。

葡萄中含量较高的HCAs主要有单咖啡酰酒石酸, 单香豆酰酒石酸酯, 单阿魏酰酒石酸酯和芥子酸等, 其中单咖啡酰酒石酸是HCAs中主要的一种酚酸类物质, 由一分子咖啡酸和一分子酒石酸酯化形成, 占HCAs总量的80%~90%^[12]。单咖啡酰酒石酸主要存在于葡萄果肉

收稿日期: 2012-05-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51173039)

作者简介: 庞海霞(1974—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为精细化学品的合成及分析。E-mail: 178030189@qq.com

*通信作者: 张旺喜(1974—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为精细化学品的合成。E-mail: 812095288@qq.com

中,在葡萄生长和成熟过程中转移至果汁中,因此葡萄果汁中含量较高,测定其含量对研究葡萄汁及其饮料的营养价值非常重要。国内还未见单咖啡酰酒石酸含量检测的报道,本实验建立测定葡萄汁饮料中单咖啡酰酒石酸含量的超高效液相色谱法,该法分析时间短,分离效果好,准确度和精确度好,不仅可用于葡萄汁饮料的分析,还可以测定葡萄其他产品如新鲜葡萄汁,葡萄酒及葡萄干等产品中单咖啡酰酒石酸的含量。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葡萄汁饮料样品 市售。

单咖啡酰酒石酸对照品、甲酸(色谱纯) 美国Sigma公司;乙腈(色谱纯) 美国Merck公司;水为Mill-pore自制的超纯水。

1.2 仪器与设备

ACQUITY超高效液相色谱系统(PDA光电二极管阵列检测器、Masslynx软件) 美国Waters公司;AG285型电子天平 瑞士Mettler-toledo公司;超纯水仪 美国Milli-pore公司;5810R型冷冻离心机 德国Eppendorf公司;KQ-250B型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;水相针式过滤器及50mL聚丙烯离心管 上海安谱科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3(2.1mm×150mm, 1.8μm);流动相A为含0.1%(V/V)甲酸的水,流动相B为含0.1%(V/V)甲酸的乙腈;梯度洗脱程序:0~3min: 5% B; 3~15min: 5~20% B; 15~16min: 20~98% B; 16~20min: 98~98% B; 20~21min: 98~5% B; 21~23min: 5~5% B;流速0.3mL/min;检测波长325nm;柱温35℃;进样量2μL。

1.3.2 对照品标准溶液的制备

精确称取单咖啡酰酒石酸对照品约5mg,加水约5mL,配成质量浓度为1.00mg/mL的母液。取适量上述母液,加水稀释,配制质量浓度为0.50、1.00、2.50、5.00、10.00、25.00、50.00μg/mL的对照品标准工作溶液。

1.3.3 对照品质量控制溶液的制备

取1.3.2节配制的单咖啡酰酒石酸对照品母液,加水稀释,配制质量浓度为2.00、10.00、20.00μg/mL的对照品质量控制溶液。

1.3.4 供试品溶液的制备

取适量葡萄汁饮料样品于50mL聚丙烯离心管中,在4000r/min离心10min,上清液用0.45μm水相针式过滤器过滤,取1mL滤液供液相色谱分析。

1.3.5 样品的测定

将上述制备的对照品标准溶液,对照品质量控制溶液及供试品溶液按照1.3.1节的色谱条件进行分析,外标法定量。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

在1.3.1节的色谱条件下,采用PDA光电二极管阵列检测器,在200~400nm进行紫外吸收波长扫描,结果如图1所示。单咖啡酰酒石酸在328nm有最大吸收,实验中采用325nm为其检测波长。在超高效液相色谱系统中使用1.8μm颗粒填料的色谱柱,系统压力比常规液相色谱要大。实验比较采用甲醇和乙腈作为有机溶剂流动相,用甲醇做流动相时,系统压力明显增大,同时在相同梯度条件下单咖啡酰酒石酸的保留时间增加,因此实验中采用乙腈作为流动相。为了减小系统压力,设定色谱柱温度为35℃。单咖啡酰酒石酸为酸性物质,在流动相中添加甲酸作为调节剂,得到较好的色谱保留及色谱峰型。葡萄汁饮料样品组成成分复杂,采用较长的色谱柱有利于提高色谱分辨率及与干扰组分的分离。实验中采用150mm长的色谱柱及较缓的梯度洗脱方式,单咖啡酰酒石酸与其他组分得到了较好的分离,在选定的色谱条件下无其他组分干扰,测的单咖啡酰酒石酸含量较为准确。

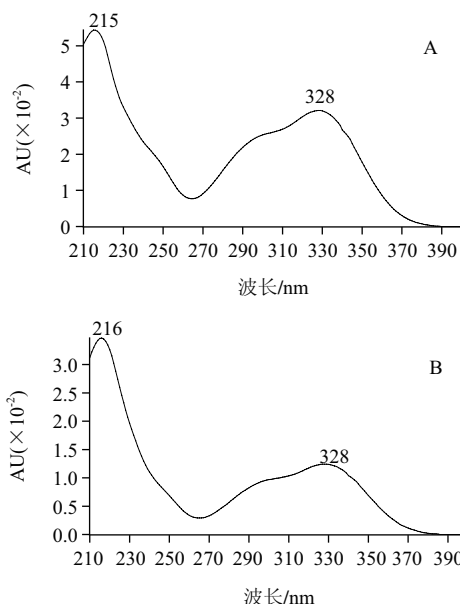


图1 葡萄汁饮料中单咖啡酰酒石酸(A)和对照品(B)在200~400nm的紫外吸收谱图

Fig.1 UV spectra of caffeic acid standard and grape juice drink sample

2.2 线性关系的考察

对1.3.2节制备的对照品标准工作溶液,按照1.3.1节

的色谱条件分析3个批次。以单咖啡酰酒石酸质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 结果见表1。单咖啡酰酒石酸在0.50~50.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系, 3批的 R^2 均大于0.9999。

表1 线性关系
Table 1 Linear relationship

批次	回归方程	R^2
1 [#]	$y=347.98x-35.079$	1
2 [#]	$y=336.2x+22.542$	1
3 [#]	$y=346.72x-40.621$	1

2.3 准确度和精密度的考察

对1.3.3节制备的对照品质量控制溶液, 按照1.3.1节的色谱条件进行分析, 各添加量分3批重复测定3次, 结果见表2。批内及批间准确度分别用测定的平均值与理论添加值相比, 用百分数表示, 结果为批内准确度在97.1%~106.0%之间, 批间准确度在100.4%~102.2%之间。批内及批间精密度分别用批内及批间测定的相对标准偏差表示, 结果为批内精密度在0.2%~3.5%之间, 批间精密度在1.9%~4.1%之间。

表2 准确度和精密度
Table 2 Accuracy and precision of the developed method

项目	低添加量(2 $\mu\text{g/mL}$)	中添加量(10 $\mu\text{g/mL}$)	高添加量(20 $\mu\text{g/mL}$)
批次1 [#]	2.11	10.12	19.38
	2.14	10.14	19.50
	2.11	10.15	20.21
批内平均值($n=3$)	2.12	10.14	19.70
批内准确度/%	106.0	101.4	98.5
批内精密度/%	0.8	0.2	2.3
批次2 [#]	1.99	9.77	20.28
	1.94	9.67	20.09
	1.90	10.31	20.05
批内平均值($n=3$)	1.94	9.92	20.14
批内准确度/%	97.1	99.2	100.7
批内精密度/%	2.3	3.5	0.6
批次3 [#]	2.09	10.04	20.44
	2.04	10.07	20.46
	2.08	10.08	20.31
批内平均值($n=3$)	2.07	10.07	20.40
批内准确度/%	103.4	100.7	102.0
批内精密度/%	1.3	0.2	0.4
批间平均值($n=9$)	2.04	10.04	20.08
批间准确度/%	102.2	100.4	100.4
批间精密度/%	4.1	2.0	1.9

2.4 稳定性的考察

对1.3.3节制备的对照品质量控制溶液, 分别于室温下放置0、24h后按照1.3.1节的色谱条件进行分析, 各添加量重复测定3次, 取其平均值与理论值相比, 测得室温放置24h后样品的准确性在97.1%~100.7%之间, 表明对照品溶液室温放置24h是稳定的。

2.5 重复性的考察

对1.3.3节制备的质量浓度为0.50 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品标准工作溶液样品, 按照1.3.1节的色谱条件进行分析, 重复测定6次, RSD为2.5%, 表明测定方法具有良好的重复性。

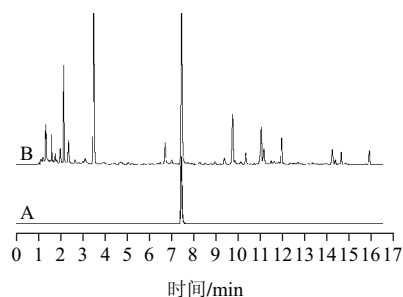
2.6 基质加标回收率的考察

取1.3.2节配制的单咖啡酰酒石酸对照品母液, 加水稀释, 配制质量浓度为100.00 $\mu\text{g/mL}$ 的工作溶液, 取适量按照添加量2.00、10.00、20.00 $\mu\text{g/mL}$ 添加于葡萄汁样品, 并按照1.3.4节处理样品, 再按照1.3.1节的色谱条件进行分析, 葡萄汁基质样品及添加单咖啡酰酒石酸各添加量的葡萄汁样品重复测定3次, 结果见表3, 基质加标回收率在101.8%~109.0%之间。

表3 基质加标回收率实验
Table 3 Recovery of caferic acid spiked matrix

项目	低添加量(2.00 $\mu\text{g/mL}$)	中添加量(10.00 $\mu\text{g/mL}$)	高添加量(20.00 $\mu\text{g/mL}$)
葡萄汁基质	1.53	1.53	1.53
样品/ $\mu\text{g/mL}$	1.50	1.50	1.50
平均值($n=3$)	1.52	1.52	1.52
基质加标	3.50	11.54	21.60
样品/ $\mu\text{g/mL}$	3.47	11.55	21.71
平均值($n=3$)	3.52	11.52	21.72
回收率/%	109.0	102.2	101.8

2.7 样品测定



A.单咖啡酰酒石酸对照品; B.葡萄汁饮料样品。

图2 单咖啡酰酒石酸对照品及葡萄汁饮料样品的液相色谱谱图
Fig.2 Chromatograms of caferic acid standard and grape juice drink sample

取1.3.4节处理的市售葡萄汁饮料样品, 按照1.3.1节的色谱条件进行分析。液相色谱谱图如图2所示, 图中同时给出了单咖啡酰酒石酸对照品溶液的谱图。单咖啡酰酒石酸的保留时间为7.45min, 从图2可以看出, 葡萄汁饮料样品成分非常复杂, 但是在保留时间为7.45min处没有其他干扰峰, 因此初步认定该峰为单咖啡酰酒石酸。为了进一步确认, 采用PDA紫外检测器在200~400nm波长范围内进行扫描, 提取该峰的紫外吸收光谱图, 并与单咖啡酰酒石酸对照品的紫外吸收光谱图进行比较, 如图1所示, 两者的紫外吸收谱图一致, 进一步证实葡萄汁饮料样品中保留时间为7.45min的色谱峰为单咖啡酰酒石酸。

实验测定市售葡萄汁饮料样品中单咖啡酰酒石酸的含量见表4。可见不同品牌的葡萄汁饮料样品，其单咖啡酰酒石酸含量各不相同，差异比较大。对葡萄种类相同的饮料，果汁含量越高，单咖啡酰酒石酸含量也越高。另外，对表4测定的样品结果初步分析可以看出，单咖啡酰酒石酸含量与葡萄的品种有关，如品牌2[#]红葡萄饮料比品牌3[#]紫玉葡萄及品牌4[#]水晶葡萄饮料的含量高，相比而言，品牌4[#]水晶葡萄饮料及未知葡萄种类的品牌6[#]中单咖啡酰酒石酸的含量非常低，均低于最低定量限0.50μg/mL。因为某些品牌的葡萄汁饮料没有标示葡萄的种类，因此不能根据葡萄的品种进一步比较，如品牌5[#]虽然标签标示100%果汁，但单咖啡酰酒石酸含量反而比果汁含量10%的品牌2[#]低。其次，不同品牌葡萄汁饮料的单咖啡酰酒石酸含量有差异，可能和葡萄浓缩汁或饮料的生产工艺有关，如Feryal等^[13]在研究生产工艺对葡萄干中酚酸类化合物含量的影响时，发现冷冻后的葡萄汁中单咖啡酰酒石酸含量比新鲜葡萄汁降低了80%；同时还与葡萄的生长条件、气候等因素有关^[14]。

表4 市售葡萄汁饮料中单咖啡酰酒石酸的含量
Table 4 Cafferteric acid contents in commercial grape juice drinks

品牌	单咖啡酰酒石酸含量/(μg/mL)	标签标示葡萄种类	标签标示果汁含量
1 [#]	3.19	未知	>10%
2 [#]	6.02	红葡萄	>10%
3 [#]	3.52	紫玉葡萄	>10%
4 [#]	<0.5	水晶葡萄	>10%
5 [#]	5.81	未知	100%
6 [#]	<0.5	未知	>10%

3 结 论

本实验建立了测定葡萄汁饮料中单咖啡酰酒石酸含量的超高效液相色谱法。方法学确证表明在0.50~50.00μg/mL范围内线性关系良好，批内及批间准确度在97.1%~106.0%，精密度(RSD)不大于4.1%，基质加

标回收率在101.8%~109.0%，单咖啡酰酒石酸的工作溶液在室温条件下24h内稳定。通过方法学的验证考察，说明所建立的方法是准确、可靠的，可用于葡萄汁饮料样品中单咖啡酰酒石酸含量的测定。

参考文献：

[1] GARY W, ARIANNA C. Polyphenol content and health benefits of raisins[J]. Nutrition Research, 2010, 30(8): 511-519.

[2] EMANUELE B, MASSIMO M, ANDREA G, et al. Phenolic composition and quality of white d. o. c. wines from Marche (Italy)[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 563(1/2): 93-100.

[3] 唐传核, 彭志英. 葡萄多酚类化合物以及生理功能[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2000(2): 12-15.

[4] 李丹, 田莹. 葡萄汁抗氧化作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1429-1431.

[5] JORGE G, FERNANDA B. Wine and grape polyphenols-a chemical perspective[J]. Food Research International, 2011, 44(10): 3134-3148.

[6] 刘文忠, 奚德智, 刘欠欠, 等. 葡萄多酚的保健作用及其在酿酒葡萄成熟度判定中的应用[J]. 中国酿造, 2008(11): 1-6.

[7] FRACASSETTI D, LAWRENCE N, TREDOUX A G, et al. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method[J]. Food Chemistry, 2011, 128(4): 1136-1142.

[8] SHUI Guanghou, LAI Pengleong. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 977(1): 89-96.

[9] ISABELLA N, CRISTIANO B, ANTONELLA R, et al. Identification and quantification of phenolic compounds in grapes by HPLC-PDA-ESI-MS on a semimicro separation scale[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(19): 8801-8808.

[10] SERGIO G A, ESTEBAN G R, ISIDRO H G. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20(7): 618-626.

[11] WILLIAM M, SERENA C M, ALAN C. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(8): 3148-3157.

[12] BRANKA M, IRMA T, ANDREJA S, et al. Determination of polyphenols in white grape berries cv. rebula[J]. Acta Chim Slov, 2006, 53(1): 58-64.

[13] FERYAL K, ROBERT W D, RONALD E W. Polyphenolic composition of raisins[J]. Agric Food Chem, 2000, 48(11): 5343-5350.

[14] MORENO-ARRIBAS M V, POLO M C. Wine chemistry and biochemistry[M]. New York: Springet-Velag New York Inc., 2009.