

葡萄酒中 14 种单体酚的高效液相色谱测定

韩国民¹, 陈 锋¹, 侯 敏¹, 王 华^{1,2,*}

(1.西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100; 2.陕西省葡萄与葡萄酒工程研究技术中心, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 建立一种新的、同时测定葡萄酒中 14 种单体酚含量的高效液相色谱法。采用 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6mm × 250mm, 5 μm), 乙腈-冰醋酸-水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0mL/min, 柱温 30℃, 检测波长 280nm。测定 6 种不同地区、不同年份的赤霞珠干红葡萄酒中 14 种单体酚的含量。结果表明, 不同地区相同品种葡萄酒中没食子酸、儿茶素、表儿茶素 3 种单体酚含量均较高, 但 14 种单体酚含量各不相同, 同地区不同年份的赤霞珠葡萄酒单体酚含量亦有差别, 葡萄酒中几种主要单体酚随时间的变化含量均有降低, 同时伴随着部分单体酚含量的增加。

关键词: 高效液相色谱; 葡萄酒; 单体酚

Determination of 14 Mono-phenols in Dry Red Wines by HPLC

HAN Guo-min¹, CHEN Feng¹, HOU Min¹, WANG Hua^{1,2,*}

(1. College of Enology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling 712100, China)

Abstract: The contents of 14 mono-phenols in six *Cabernet Sauvignon* dry red wines with different aging times or different geographical origins of grape were determined using a HPLC method. The chromatographic separation was performed on a ZORBAX SB-C₁₈ column at 30 °C with an acetonitrile/acetic acid/water mixture as a mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min and the detection wavelength was set at 280 nm. The contents of 14 mono-phenols in *Cabernet Sauvignon* wine varied with geographical origin of grape, and higher contents of gallic acid, catechin, and epicatechin were found in all the six wine samples. *Cabernet Sauvignon* wines with different aging times from the same region differed in their mono-phenols content as well. The contents of several major mono-phenols decreased with increasing aging time, while a few others exhibited an opposite change.

Key words: HPLC; wine; mono-phenols; aging time; origin

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)02-0180-04

葡萄酒含有丰富的酚类化合物, 主要有非类黄酮和类黄酮两大类, 非类黄酮主要包括酚酸类化合物, 类黄酮主要有花色苷类、黄酮醇类、黄烷醇类、黄烷醇类、原花色素、水解性单宁等^[1]。酚类物质对葡萄果实的色泽、风味以及葡萄酒的口感、营养价值都具有重要的作用^[2]。国内外研究表明, 酚类物质主要来自葡萄果梗、果皮和果粒等, 其结构和含量在发酵过程中和葡萄酒陈酿阶段都会有很大的变化^[3]。多酚物质决定葡萄酒的外观、滋味、收敛性、口感及微生物稳定性^[4-10], 这些指标被广泛应用作为评价葡萄果实、发酵葡萄汁和葡萄酒质量的参数^[11]。葡萄与葡萄酒中的多酚含量随葡萄品种^[12]、原产地气候、土壤条

件^[13-14]、栽培技术、土壤耕作^[12,15-16]、成熟度^[17]等不同而有所差异。

酚类物质大多以结合态和聚合度不同的聚合态形式存在, 且含量多少不一, 要准确分析所有酚类物质很难^[18]。成宇峰等^[19]通过对流动相等色谱条件的优选选择, 分离出了没食子酸等 10 种单体酚化合物, 陈建业等^[20]分离出了 11 种酚酸。葡萄酒的历史悠久, 营养丰富, 含有酚类等大量生理活性物质, 其中单体酚种类较多, 且含量不一, 因此建立葡萄酒中酚酸类物质的测定方法, 分析葡萄酒中各酚酸含量具有重要意义。本实验旨在建立一种新型、能够同时测定葡萄酒中 14 种单体酚的高效液相色谱分析方法。

收稿日期: 2010-03-15

基金项目: 2008 年陕西省科技计划项目(2008XH4-2)

作者简介: 韩国民(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事葡萄酒化学研究。E-mail: guomin_h@126.com

* 通信作者: 王华(1959—), 女, 教授, 博士, 主要从事葡萄与葡萄酒研究。E-mail: wanghuawine@126.com

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

6 种不同国产葡萄酒: 云南香格里拉干红(2008)(1#)、四川九寨沟干红(2008)(2#)、宁夏贺兰山干红(2008)(3#)、新疆新天干红(2009)(4#)、新疆新天干红(2008)(5#)、新疆新天干红(2007)(6#), 均取自各葡萄酒公司生产车间, 葡萄品种均为赤霞珠。

乙腈、甲醇(均为色谱纯) 上海科密欧公司; 其余试剂为分析纯; 实验用水为超纯水; 水杨酸(salicylic acid)、儿茶素(catechin)、香草酸(vanillic acid) 美国 Fluka 公司; 没食子酸(gallic acid)、咖啡酸(caffeic acid)、香豆酸(*p*-coumaric acid)、丁香酸(syringic acid)、安息香酸(3,4-dihydroxybenzoic acid)、桑色素(morin)、芦丁(rutin)、反式白藜芦醇(trans-resveratrol)、表儿茶素(-epicatechin)、槲皮素(querletin)、香豆素(coumarin) 美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

SHIMADZU-LC-2010 分析型高效液相色谱仪(含 UV detector 紫外检测器、自动进样器、CLASS-VP 工作站) 日本岛津公司; AP-9901S 真空过滤器、AS3120B 超声波脱气机 Autoscience 公司; 纯水机 英国 Millipore 公司; 薄膜旋转蒸发仪 上海申生科技有限公司; SHB-111 真空泵 郑州长城科工贸有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 样品预处理

参考成宇峰等^[21]的方法稍加修改。取 30mL 葡萄酒样, 用 30mL 乙酸乙酯萃取 3 次, 有机相用薄膜旋转蒸发仪($< 40^{\circ}\text{C}$)浓缩至干后, 残渣溶于 3mL 色谱甲醇中, 置于 -20°C 避光保存, 待液相分析用。测定样品前经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

1.3.2 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱($4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$), 紫外检测波长为 280nm , 柱温 30°C , 进样量 $10\mu\text{L}$, 以峰面积外标法定量。梯度洗脱: 流动相 A: 水-冰醋酸(98:2, V/V), 流动相 B: 乙腈, 流速为 $1\text{mL}/\text{min}$ 。洗脱程序: $0\sim 20\text{min}$, B 为 3%~5%; $20\sim 35\text{min}$, B 为 5%~15%; $35\sim 50\text{min}$, B 为 15%~30%; $50\sim 65\text{min}$, B 为 30%~30%; $65\sim 75\text{min}$, B 为 30%~0%。

1.3.3 标准溶液的配制

分别称取没食子酸等 14 种单体酚 $9\sim 11\text{mg}$ 移至 10mL 棕色容量瓶中, 色谱甲醇定容, 封口, 作为混合标准母液, 将此标准液稀释成不同浓度梯度的标准溶液, -30°C 保存备用。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

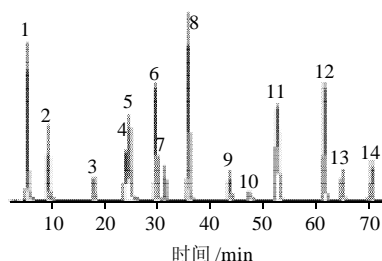
用紫外分光光度计对没食子酸、儿茶素等 14 种单体酚标准样品溶液在波长 $200\sim 400\text{nm}$ 区间内扫描。14 种单体酚紫外吸收光谱图显示, 其组分最大吸收峰均在 280nm 处有最大或者较大吸收峰, 故选择 280nm 为检测波长。

2.2 流动相条件的确定

根据成宇峰等^[19]的研究, 本实验选取流动相 A: 水-冰醋酸(98:2, V/V), 流动相 B: 乙腈, 为流动相系统, 根据试凑试验法^[22], 本实验共设计了 90 个不同的梯度洗脱程序, 其中有代表性的两个梯度条件如下:

I: $0\sim 20\text{min}$, B 为 3%~8%; $20\sim 30\text{min}$, B 为 8%~15%; $35\sim 50\text{min}$, B 为 15%~30%; $50\sim 65\text{min}$, B 为 30%~30%; $65\sim 75\text{min}$, B 为 30%~0%。

II: $0\sim 20\text{min}$, B 为 3%~5%; $20\sim 35\text{min}$, B 为 5%~15%; $35\sim 50\text{min}$, B 为 15%~30%; $50\sim 65\text{min}$, B 为 30%~30%; $65\sim 75\text{min}$, B 为 30%~0%。

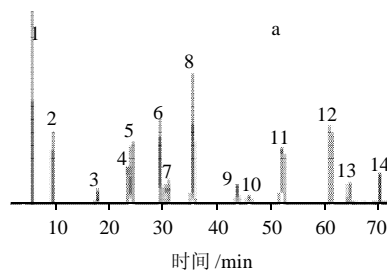


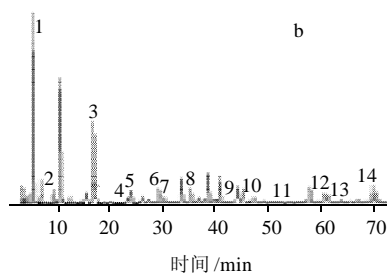
1. 没食子酸; 2. 安息香酸; 3. 儿茶素; 4. 香草酸; 5. 咖啡酸; 6. 丁香酸; 7. 表儿茶素; 8. 香豆酸; 9. 芦丁; 10. 水杨酸; 11. 香豆素; 12. 白藜芦醇; 13. 桑色素; 14. 槲皮素。

图 1 采用梯度条件 I 条件下 14 种单体酚标准色谱图

Fig.1 Chromatogram of 14 mono-phenol standards under the first gradient program

由图 1 可知, 采用梯度条件 I 时, 香草酸和咖啡酸两种单体酚不能较好的分离, 梯度条件 II 中, 降低 $0\sim 20\text{min}$ 乙腈体积分数, 延长第二梯度洗脱时间, 在不影响其他单体酚分离程度的前提下, 香草酸和咖啡酸得到了较好的分离(图 2)。由此, 选取梯度条件 II 为洗脱条件, 该条件有利于 14 种单体酚的精确测定。





1.没食子酸; 2.安息香酸; 3.儿茶素; 4.香草酸; 5.咖啡酸; 6.丁香酸; 7.表儿茶素; 8.香豆酸; 9. 芦丁; 10.水杨酸; 11.香豆素 12.白藜芦醇; 13.桑色素 14.槲皮素。

图2 采用流动相Ⅱ条件下14种单体酚标准样品(a)和葡萄酒样品(b)的色谱图

Fig.2 Chromatogram of 14 mono-phenol standards (a) and wine samples (b) under the second gradient program

2.3 标准曲线的制备

分别配制10~360mg/L 6个不同质量浓度的14种单体酚混合标准溶液,进样10 μ L,按上述确定的色谱条件进行测定,以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标,计算得到14条标准曲线,结果见表1。由表1可知,没食子酸、儿茶素等14种单体酚标准品质量浓度和相应峰面积呈良好线性关系,最低检测限($R_{SN}=3$)时亦较低,表明此法灵敏度较高。

表1 14种单体酚保留时间、回归方程和检测限

Table 1 Retention time, regression equations, and detection limits of 14 phenolic acids

单体酚	保留时间/min	线性范围/(mg/L)	标准曲线	相关系数(r)	最低检测限/(mg/L)
没食子酸	5.36	10~350	$y=17882x-302711$	0.9994	0.0223
安息香酸	9.79	10.56~368.2	$y=9766.2x-182286$	0.9994	0.0352
儿茶素	20.56	10~341.6	$y=4280.2x-79096$	0.9995	0.042
香草酸	26.43	10.02~350	$y=10634x-219985$	0.999	0.0311
咖啡酸	27.25	10.24~352.8	$y=18976x-341675$	0.9994	0.0456
丁香酸	31.7	10.39~354.55	$y=17857x-318002$	0.9994	0.0361
表儿茶素	33.07	10.52~379.4	$y=4204x-85701$	0.9995	0.0287
香豆酸	37.39	10.66~357.7	$y=27226x-479951$	0.9993	0.0238
芦丁	46	10.05~350	$y=4641.9x-56887$	0.9995	0.0422
水杨酸	48.36	10.18~352.1	$y=3441.3x-78908$	0.9994	0.0328
香豆素	55.27	10.36~354.2	$y=25661x-458099$	0.9994	0.0301
白藜芦醇	62.66	10.69~358.05	$y=21192x-375172$	0.9993	0.0232
桑色素	65.6	10.3~353.2	$y=5255.1x-145555$	0.9995	0.0297
槲皮素	70.74	10.2~350	$y=5707x-139844$	0.9991	0.0266

2.4 精密度和加标回收率实验

向已知14种单体酚含量的葡萄酒中定量添加混合标准液,按照1.3.1节方法制备葡萄酒样品($n=6$)。10 μ L进样,根据测定结果中14种单体酚的含量分别计算相应的精确度和回收率,结果见表2。由表2可知,没食子酸、儿茶素等14种单体酚的回收率均在85%以上,且

相对标准偏差较低(3%以内)。结果表明,乙酸乙酯可用于高效萃取葡萄酒种单体酚,方法精密度高,符合HPLC测定要求。

表2 14种单体酚精密度和加标回收率实验结果($n=6$)

Table 2 Precision and recovery tests for 14 pheolic acids ($n=6$)

单体酚	样品含量/(mg/L)	添加量/(mg/L)	测定量/(mg/L)	相对标准偏差/%	回收率/%
没食子酸	45.4	50	89.6	1.87	93.92
安息香酸	3.8	52.6	48.5	0.67	85.99
儿茶素	29.8	48.8	72.99	1.23	92.86
香草酸	5.4	51.5	52.3	0.54	91.91
咖啡酸	12.9	50.4	58.12	0.66	91.82
丁香酸	4.9	50.65	52.03	2.83	93.66
表儿茶素	23.4	54.2	69.37	0.95	89.39
香豆酸	8.5	51.1	51.93	1.08	87.13
芦丁	4.9	50	50.04	0.97	91.15
水杨酸	10.4	50.3	55.38	1.25	91.24
香豆素	2.2	50.6	50.69	2.38	96
白藜芦醇	5	51.15	48.35	0.89	86.11
桑色素	4.3	50.5	51.01	2.97	93.08
槲皮素	10.2	50	51.35	1.74	85.3

2.5 标样和样品重复性实验

取同一批次的混合标准样品和葡萄酒样品,连续测定6次,结果见表3。从表3可以看出,各单体酚保留时间和峰面积的重复性较好,14种单体酚保留时间的相对标准偏差均在2%以内,峰面积的相对偏差均在3%以内。

表3 标样和样品测定重复性实验结果($n=6$)

Table 3 Reproducibility tests for standard and sample determination

单体酚	混合标样 RSD/%		葡萄酒样品 RSD/%	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
没食子酸	0.89	0.23	0.35	2.24
安息香酸	1.2	0.18	0.26	1.98
儿茶素	1.86	0.28	1.47	1.36
香草酸	0.92	0.36	0.15	2.35
咖啡酸	1.19	0.18	0.18	2.87
丁香酸	0.82	0.56	0.1	1.83
表儿茶素	0.76	0.33	0.1	1.24
香豆酸	0.64	0.27	0.07	1.55
芦丁	0.69	0.43	0.05	2.82
水杨酸	0.71	0.24	0.09	2.11
香豆素	0.69	0.21	0.12	2.13
白藜芦醇	0.42	0.19	0.06	0.98
桑色素	0.29	0.26	0.05	1.77
槲皮素	0.33	0.17	0.03	0.89

2.6 葡萄酒样品的测定

根据前述色谱条件,对云南香格里拉赤霞珠干红(2008)、四川九寨沟赤霞珠干红(2008)、宁夏贺兰山赤霞珠干红(2008)、新疆新天赤霞珠干红(2009)、新疆新

天赤霞珠干红(2008)、新疆新天赤霞珠干红(2007)6种不同地区、不同年份、相同品种的葡萄酒中14种单体酚含量进行了测定,结果见表4。

表4 葡萄酒中各单体酚含量的测定
Table 4 Mono-phenol contents in 6 different wines mg/L

单体酚	样品号					
	1#	2#	3#	4#	5#	6#
没食子酸	45.4	35.4	26.8	55.2	26.4	12.4
安息香酸	3.8	4.8	3.1	3.4	3.3	2.8
儿茶素	29.8	25.8	28	79.5	72.5	45.5
香草酸	5.4	4.5	4.1	4.4	4.4	4.5
咖啡酸	12.9	4.3	11.6	6.8	4.5	10.4
丁香酸	4.9	4	3.8	4.3	4.9	4.8
表儿茶素	23.4	23.5	23.4	75.3	43.8	34.3
香豆酸	8.5	3.5	7.1	7.2	7.8	8.1
芦丁	4.9	2.9	4	5.9	7.2	4.7
水杨酸	10.4	4.9	16.8	9.5	13.6	6.5
香豆素	2.2	2	2	2.1	2.5	1.9
白藜芦醇	5	3.8	3.8	5.2	4	5.1
桑色素	4.3	3.2	3.9	3.5	3.8	4.3
槲皮素	10.2	8.8	10.9	11.2	16.3	10.9

由表4可知,在6种不同葡萄酒中均检测出没食子酸、儿茶素等14种单体酚,且没食子酸、儿茶素、表儿茶素、槲皮素、水杨酸的含量均较高;四川、云南两地葡萄酒中以没食子酸含量最高,宁夏、新疆两地葡萄酒中以儿茶素含量最高,不同地区相同品种的葡萄酒中单体酚含量有着明显的差异。新疆新天赤霞珠干红(2007)、新疆新天赤霞珠干红(2008)与新疆新天赤霞珠干红(2009)中,儿茶素、表儿茶素、没食子酸含量均较高,但是酒龄较大的葡萄酒中这3种单体酚含量均有不同程度的降低,香豆酸和桑色素含量却有一定程度的升高,表明在陈酿过程中,单体酚之间有着复杂的化学变化。

3 结 论

本实验建立了一种新的同时检测葡萄酒中14种单体酚含量的HPLC分析方法。通过对洗脱条件的不断摸索,14种单体酚得到了很好的分离,且回收率均在85%以上,最低检测限也较低。该方法精确度、灵敏度较高,重复性好。在所选定的色谱条件下,其他峰也得到了很好的分离,在单体酚标准品充足的条件下,亦可以检测出样品中尽量多的有效成分。

对6种不同葡萄酒中14种单体酚的测定结果表明,同一地区赤霞珠年份酒中部分单体酚较新酒含量有一定程度的降低,同时有部分单体酚含量有所增加,可能是由于陈酿过程中单体酚间发生了复杂的化学变化,由于该实验年份酒酒样不充足,难以论证葡萄酒陈酿过程中发生的具体的化学变化;不同地区葡萄酒单体酚含量千差万别,这可能与当地土壤特征和气候条件有关,还与不同酒厂生产工艺不同相关,至于不同产区葡萄酒与

单体酚含量之间的关系,还有待于今后进一步的研究。

参考文献:

- 温鹏飞,陈建业,黄卫东. HPLC法同时测定葡萄酒中5种黄酮-3-醇单体的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(3): 133-137.
- 李华,王华,袁春龙,等. 葡萄酒化学[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- 王美丽,吴鲁阳,张振文,等. HPLC法测定不同葡萄品种成熟过程中单体酚的变化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 134-138.
- BOZAN B, TOSUN G, ÖZCAN D. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity[J]. Food Chemistry, 2008, 109(2): 426-430.
- CADAHIA E, SIMON B F, SANZ M, et al. Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels[J]. Food Chemistry, 2009, 115(2): 639-649.
- MAJO D D, GUARDIA M L, GIAMMANCO S, et al. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents[J]. Food Chemistry, 2008, 111(1): 45-49.
- KOUSSISSI E, DOURTOGLOU V G, AGELOUSSIS G, et al. Influence of toasting of oak chips on red wine maturation from sensory and gas chromatographic headspace analysis[J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1503-1509.
- RASTIJA V, SREČNIK G, ŠARIĆ M M. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 54-60.
- MONAGAS M, SUAREZ R, GOMEZ-CORDOVES C, et al. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2005, 56(2): 139-147.
- BOSCH-FUSTÈ J, SARTINI E, FLORES-RUBIO C, et al. Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, ‘cavas’[J]. Food Chemistry, 2009, 114(3): 782-790.
- GOLLÜCKE A P B, CATHARINO R R, SOUZA J C, et al. Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage[J]. Food Chemistry, 2009, 112(4): 868-873.
- CLIFF M A, KING M C, SCHLOSSER J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines[J]. Food Research International, 2007, 40(1): 92-100.
- ESTEBAN M A, VILLANUEVA M J, LISSARRAGUE J R. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81(4): 409-420.
- BERGQVIST J, DOKOOZLIAN N, EBISUDA N. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the central San Joaquin valley of California[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52(1): 1-7.
- HARBERTSON J F, KENNEDY J A, ADAMS D O. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2002, 53(1): 54-59.
- DOWNEY M O, HARVEY J S, ROBINSON S P. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2004, 10(1): 55-73.
- HARBERTSON J F, SPAYD S. Measuring phenolics in the winery[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2006, 57(3): 280-288.
- 于贞,赵光鳌,李记明,等. 用HPLC法测定干红葡萄酒中的酚类物质[J]. 酿酒, 2002, 29(2): 88-89.
- 成宇峰,张振文,岳泰新,等. HPLC同时检测葡萄酒中10种单体酚的方法[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 287-290.
- 陈建业,温鹏飞,战吉成,等. 葡萄酒中11种酚酸的反相高效液相色谱测定方法研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(6): 133-138.
- 成宇峰,张振文,岳泰新. HPLC测定葡萄酒中单体酚样品预处理方法的优化[J]. 酿酒科技, 2008(2): 116-118.
- 施奈德 L R, 格莱吉克 J L. 实用高效液相色谱法的建立[M]. 北京: 科学出版社, 2000.