

HPLC 测定酿酒葡萄中单体酚的方法研究

王美丽,张振文,张予林

(西北农林科技大学葡萄酒学院,陕西 杨凌 712100)

摘要: 建立了用 HPLC 测定葡萄中单体酚的方法,色谱条件为 Hibar RT Lichrospher 反相 C₁₈ 柱,流动相为 16%乙腈水溶液(含 1%乙酸),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm,进样量为 10 μL。测定了黑比诺和霞多丽中主要的几种单体酚(没食子酸、安息香酸、芦丁、丁香酸、阿魏酸、儿茶素)含量。

关键词: 分析检测; HPLC; 单体酚; 葡萄

中图分类号:TS262.6;TS261.2 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2006)06-0091-03

Study on the Determination of Mono-phenol in Grape by HPLC

WANG Mei-li, ZHANG Zhen-wen and ZHANG Yu-lin

(College of Enology, Northwest Agriculture & Forest University Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The determination of mono-phenol in grape by HPLC was developed and the chromatographic conditions were as follows: Hibar RT Lichrospher C₁₈ column(250 × 4.0 mm, 5 μm), mobile phase as 16% acetonitrile in water (containing 1% acetic acid), flow-rate as 1.0 mL/min, detection wavelength at 280 nm, and injection volume as 10 μL. The content of several mono-phenols (gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, syringic acid, ferulic acid, catechin and rutin hydrate) in Pinot Noir and Chardonnay were determined by such method.

Key words: determination; HPLC; mono-phenol; grape

多酚物质(polyphenols)是分子结构中含有酚官能团的物质,是构成植物固体部分的主要物质之一^[1],其种类繁多,结构复杂。在成熟的葡萄浆果中主要有5类多酚化合物^[2]:酚酸类(没食子酸、丁香酸、安息香酸等)、黄酮醇类(槲皮素、山奈酚等)、黄烷醇类(儿茶素等)、黄烷酮醇类和花色苷类,另外还有芪类化合物-白藜芦醇。它们可以形成色素、吸收紫外线,并可作为抗氧化剂等。葡萄中的多酚化合物对果实的色泽、风味以及葡萄酒的口感、营养价值都具有重要作用,且其具有显著的生物活性,在医疗、保健方面有重要的作用和利用价值^[3-9]。在不同葡萄品种中多酚的含量及类型差异很大,在相同葡萄品种中其构成及含量也会受地域、栽培条件、气候条件、成熟度等多种因素的影响,使多酚物质含量也不同^[2,9]。近几年,国内关于葡萄与葡萄酒中总酚含量及其生理功能的研究较多,而对其单体酚的研究较少。因此,建立葡萄中单体酚的测定方法,分析葡萄中主要单体酚的含量,可为研究不同地区葡萄及葡萄酒中单体酚的种类及含量变化、建立多酚物质图谱及品种区域化和葡萄酒原

产地命名提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器和试剂

材料: 葡萄品种为黑比诺(Pinot Noir)、霞多丽(Chardonnay)。

标样: 安息香酸(3,4-dihydroxybenzoic acid)、没食子酸(gallic acid)、芦丁(rutin hydrate)、儿茶素(catechin):美国Fluka公司;丁香酸(syringic acid)、阿魏酸(ferulic acid):美国Sigma公司。

仪器: 日本岛津高效液相色谱仪,包括:LC-10ATvp泵,SPD-10Avp检测器,CTO-10ASvp柱温箱,C-R8A积分仪;色谱柱:Hibar RT Lichrospher反相C₁₈柱(250 × 4.0 mm, 5 μm);

真空抽滤器: Autoscience AP-9901S; **超声波脱气机:** Autoscience AS3120B; **纯水机:** Water Millipore; **薄膜旋转蒸发仪。**

试剂: 色谱纯:甲醇、乙腈;分析纯:乙酸、乙醇、氯

收稿日期:2006-02-24

作者简介:王美丽(1980-),女,在读硕士,主要从事葡萄与葡萄酒中单体酚的研究。

通讯作者:张振文(1960-),男,教授,博士生导师。E-mail:zhangzhw60@163.com

仿、乙酸乙酯。

1.2 实验方法

1.2.1 采样及提取

每个品种随机选取 30 串果穗用以取样。多酚提取采用有机溶剂萃取法进行^[10],其工艺路线:果实 10 g 用 50%酒精提取两次(5 倍料液比、70℃ 提取 60 min)

减压蒸馏 氯仿萃取 2 次 乙酸乙酯萃取 2 次 减压蒸馏 粗提物 0.45 μm 膜过滤 备用。

1.2.2 色谱条件

色谱柱: Hibar RT Lichrospher 反相 C₁₈ 柱, 250 × 4.0 mm, 5 μm。

流动相: 16%乙腈水溶液(含 1%乙酸)。

流速: 1.0 mL/min。

柱温: 30℃。

检测波长: 280 nm。

1.2.3 标准曲线制备

准确称取 0.0100 g 没食子酸、芦丁、儿茶素、丁香酸、阿魏酸、安息香酸标样,用甲醇定容于 10 mL 容量瓶中,配成混合溶液,将此溶液稀释成不同浓度梯度 500 mg/L, 250 mg/L, 125 mg/L, 62.5 mg/L, 31.3 mg/L, 15.6 mg/L 和 7.8 mg/L) 的标准溶液,备用。

2 结果与分析

2.1 流动相条件确定

将混合标样分别在以下条件进样。

梯度洗脱: 流动相 A: 9%乙腈水溶液(含 2%乙酸); 流动相 B: 80%乙腈水溶液。

梯度一: 0~8 min, 0~6% B; 8~20 min, 6%~35% B; 20~40 min, 35%~0% B。

梯度二: 0~10 min, 0% B; 10~25 min, 0%~32% B; 25~35 min, 32% B; 35~40 min, 32%~0% B。

等压洗脱: 16%乙腈水溶液(含 1%乙酸), 1.0 mL/min 等压洗脱; 16%乙腈水溶液(含 1%乙酸), 0.8 mL/min 等压洗脱。

通过比较色谱图可知,梯度洗脱时,各单体酚不能完全分离;用 16%乙腈(含 1%乙酸) 0.8 mL/min 等压洗脱时,分离时间较长,而用 1.0 mL/min 等压洗脱分离效果最好(见图 1)。故选定色谱条件为 16%乙腈水溶液(含 1%乙酸), 1.0 mL/min 等压洗脱。

2.2 标准曲线的制备

在确定的色谱条件下测定不同浓度的标准混合液,以峰面积为横坐标,浓度为纵坐标,得到各个单体酚的回归方程如下(结果见表 1)。

2.3 葡萄中单体酚的测定

在确定的色谱条件下对黑比诺和霞多丽中的单体酚含量进行了测定,色谱图见图 2, 图 3。结果表明,黑比

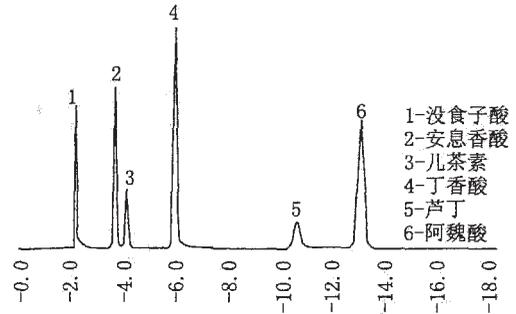


图 1 混合标样色谱图

表 1 混合标样在选定色谱条件下的标准曲线

标样	标准曲线	相关系数 (R ²)
没食子酸	y=0.0001x-0.7447	0.9994
安息香酸	y=0.0002x+0.8057	0.9997
儿茶素	y=0.0004x+1.6481	0.9999
丁香酸	y=0.0001x+0.5504	0.9996
芦丁	y=0.0005x+1.1678	0.9998
阿魏酸	y=0.0001x+0.5109	0.9996

诺和霞多丽中儿茶素含量最高,分别为 221 mg/kg 鲜重和 130 mg/kg 鲜重,且黑比诺中各个单体酚含量均高于霞多丽(见图 4, 图 5)。

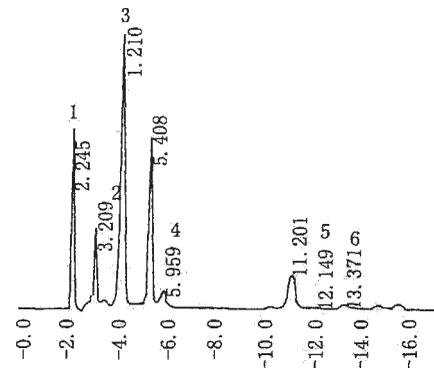


图 2 霞多丽葡萄色谱图

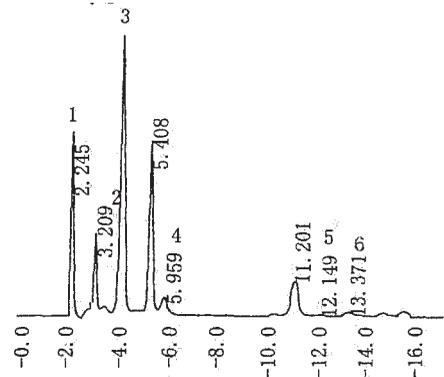


图 3 黑比诺葡萄色谱图

3 结论

3.1 采用 Hibar RT Lichrospher 反相 C₁₈ 柱(250 × 4.0 mm, 5 μm), 16%乙腈水溶液(含 1%乙酸), 1.0 mL/min 等压洗脱,可以较好地分离测定葡萄中主要单体酚。

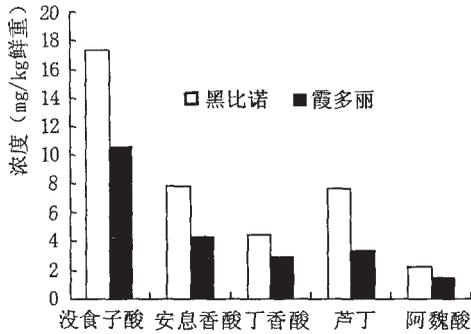


图4 葡萄中单体酚含量

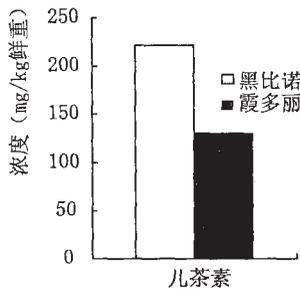


图5 葡萄中儿茶素含量

3.2 实验表明,黑比诺和霞多丽中儿茶素含量最高,分别为 221 mg/kg 鲜重和 130 mg/kg 鲜重,其次依次为没食子酸、安息香酸、芦丁、丁香酸、阿魏酸。且供试红葡萄(黑比诺)中各个单体酚含量均高于白葡萄(霞多丽)。

参考文献:

- [1] 李华. 葡萄集约化栽培手册[M]. 西安:西安地图出版社, 2001.
- [2] 刘金豹, 杜中军, 翟衡. 葡萄浆果中的主要多酚化合物及影响因素[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003, (2): 22-26.
- [3] 樊玺, 李记明. 不同种酿酒葡萄酚类物质特性研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2000, (4): 13-15.
- [4] 李华. 葡萄酒的生物化学[A]. 葡萄与葡萄酒研究进展- 葡萄酒学院年报(2000)[C]. 西安:陕西人民出版社, 2000.
- [5] Yurttas H C, Schafer H W, Warthesen J J. Antioxidant activity of nontocopherol hazelnut(Corylus spp.) phenolics[J]. Journal of food science, 2000, 65: 276-280.
- [6] Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, et al. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes and Aronia[J]. Journal of food science, 2004, 69: 164-169.
- [7] Emma Cantos, Juan Carlos Espin, Francisco A. Tomas-Barberan. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS[J]. Journal of agriculture and food chemistry, 2002, 50: 5691-5696.
- [8] 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.
- [9] 丁燕, 赵新节. 酚类物质的结构与性质及其葡萄与葡萄酒的关系[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003, (1): 13-17.
- [10] 汪成东, 张振文, 宋士任. 葡萄多酚物质提取方法的研究[J]. 西北植物学报, 2004, (11): 2131-2135.

中国轻工业出版社图书邮购目录

书名	定价 (元/册)	邮费 (元/册)	书名	定价 (元/册)	邮费 (元/册)
酒精与蒸馏酒工艺学	55	8	葡萄酒酿造与欣赏	16	3
酒精工艺学(中职教材)	18	3	葡萄酒工业手册	48	7
*玉米酒精生产新技术	50	8	*白兰地工艺学	20	4
*白酒酿造工教程(上)(基础知识)	25	4	*苹果酒酿造技术	43	7
*白酒酿造工教程(中)(初级中级高级工适用)	22	4	特种啤酒酿造技术	24	4
*白酒酿造工教程(下)(技师高级技师适用)	45	7	啤酒生产工艺(技工教材)	48	7
白酒生产技术全书	120	18	啤酒工艺学(中职教材)	36	5
新型白酒生产与勾调技术问答	32	5	黄酒和清酒生产问答	25	4
新型白酒勾调技术与生产工艺	15	3	药酒 ABC	10	2
白酒勾兑技术问答	16	3	药酒生产实用技术	28	4
白酒品评与勾兑	20	4	药酒配方 800 例	15	3
配制酒生产问答	25	4	酶制剂应用手册	28	4
*新版配制酒配方	20	4	*新编酶制剂实用技术手册	35	5
生料酿酒技术	36	5	*酵母生产与应用手册	50	8
小曲白酒生产指南	22	4	新编调酒师手册	36	5
*凤型白酒生产问答	35	5	调酒师教程	40	6
*凤型白酒生产技术	30	5	*发酵食品微生物学(引进版)	85	13
酿造酒工艺学(第二版)	50	8	生物工程设备	50	8
*英汉意法葡萄酒词典	45	7	发酵工厂设备(中职教材)	45.25	7
*葡萄酒酿造学——原理及应用(引进版)	88	13	发酵工厂设计概论(职教教材)	28	4
*国际葡萄酒药典——葡萄酒辅料标准	28	4	中国酿酒科技发展史	120	18
*葡萄酒品尝法	20	4			

- (1) 邮购办法: 收款地址: 北京市东长安街6号 中国轻工业出版社 收款人: 读者服务部
 邮政编码: 100740 联系电话: (010) 65241695/85111729 传真: (010) 85111730
- (2) 字迹务必清楚, 以免误投。在汇款单的“附言”栏内注明所购书名和册数。
- (3) 有*号为近期出版新书。