

# HPLC 测定葡萄酒中单体酚样品预处理方法的优化

成宇峰, 张振文, 岳泰新

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 对样品预处理和色谱条件进行了优化选择, 通过利用 HPLC 测定确定了 10 种单体酚的最佳萃取条件。结果表明, 调节酒样 pH 2, 用乙酸乙酯萃取 10 min, 经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后利用高效液相色谱测定, 各个单体酚 30 min 内得到了良好的分离且回收率较高。

**关键词:** 分析检测; 样品预处理; HPLC; 葡萄酒样

中图分类号: O657.7; TS261.7; TS262.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2008)02-0116-03

## Optimization of Sample Pretreatment For the Determination of Mono-phenols by HPLC

CHENG Yu-feng, ZHANG Zhen-wen and YUE Tai-xin

(Viculture College of Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

**Abstract:** Through the optimization of sample pretreatment conditions and chromatographic conditions, the optimum extraction conditions for the determination of 10 Mono-phenols in grape wine by HPLC were determined. The results showed that when pH value of wine samples was adjusted to 2, after 10 min extraction by ethyl acetate and filtration by 0.45  $\mu\text{m}$  microporous membrane, each mono-phenol could be separated successfully and high recovery could be achieved within 30 min by HPLC.

**Key words:** analysis and determination; sample pretreatment; HPLC; grape wine sample

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、黄烷酮醇类、黄烷醇类、原花色素、水解性单宁等<sup>[1]</sup>。这些酚类化合物是葡萄酒重要的组成成分, 决定着葡萄酒的色泽、收敛性、苦味等感官特性<sup>[2]</sup>。如: 酚酸类物质(如咖啡酸等)对葡萄酒色泽起着重要作用, 咖啡酸有助于葡萄酒颜色的稳定和防止氧化<sup>[3]</sup>。黄烷-3-醇中儿茶素不仅具有较强抗氧化性, 又具有苦味和收敛性, 而且苦味比聚合体更强<sup>[1]</sup>; 黄酮醇中的槲皮酮具有较强的抗氧化性、能抑制冠心病、动脉粥样硬化、消除自由基、抗癌和抗炎的作用<sup>[4]</sup>。由于这些单体酚化合物对葡萄酒感官特性以及在人类饮食中具有抗氧化和抗诱导有机体突变等物质的作用<sup>[5]</sup>。所以对葡萄酒单体酚化合物的分析检测具有重要的意义。

高效液相色谱是一种广泛的分析、分离技术<sup>[6]</sup>, 利用高效液相色谱进行酚类物质分析测定时, 为了定性、定量准确, 往往要求尽量减少样品所含杂质。由于葡萄酒中所含物质丰富, 所以在进行目标物分离测定时就要求

对样品进行预处理。目前葡萄酒多酚样品预处理最多的就是液液萃取、固相萃取两种<sup>[7]</sup>。本实验通过对液液萃取进行优化选择, 从而确定了较适合利用 HPLC 测定葡萄酒中没食子酸、儿茶素等 10 种单体酚的方法。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

模拟酒样(将 150 mL 乙醇和 3 g 酒石酸加入到 1 L 容量瓶中, 然后再加入一定量的 10 种单体酚, 混匀备用)。

#### 1.2 仪器和试剂

仪器: 分析型高效液相色谱仪 (SHIMADZU-LC-2010); UV detector 紫外检测器; Auto sampler 自动进样器; CLASS-VP 工作站; 分液漏斗; 三角瓶; 量筒。

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; 十万分之一天平。

试剂: 甲醇、乙腈(色谱纯); 酒石酸、乙酸、乙醚、乙酸乙酯(分析纯)。

基金项目: 陕西省 2007 年 13115 科技创新重大科技专项 项目编号: 2007ZDKG-0。

收稿日期: 2007-10-16

作者简介: 成宇峰(1981-), 女, 在读硕士, 主要从事葡萄与葡萄酒中多酚研究。

通讯作者: 张振文(1960-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事葡萄与葡萄酒研究。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱: Hibar RT Lichrospher 反相  $C_{18}$  柱, 250 mm × 4.0 mm, 5  $\mu$ m; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30  $^{\circ}$ C。检测波长: 280 nm。梯度洗脱: 流动相 A: 水 乙酸(98 2); 流动相 B: 乙腈。

洗脱程序: 0 ~ 10 min, B 为 16%; 10 ~ 25 min, B 为 20% ~ 40%; 25 ~ 30 min, B 为 40% ~ 0%。

#### 1.3.2 标准曲线制备

分别称取约 0.0100 g 没食子酸、安息香酸、儿茶素、咖啡酸、丁香酸、槲皮酮、阿魏酸、水杨酸、香豆酸、芦丁标样, 用色谱甲醇定容于 10 mL 容量瓶中, 配成混合溶液, 将溶液稀释成不同浓度梯度的标准溶液, 在 -30  $^{\circ}$ C 下保存备用。

#### 1.3.3 样品预处理

取 10 mL 模拟酒样 用 2 mol HCl 调节 pH=2.0 20 mL 乙酸乙酯萃取 3 次 每次萃取时间为 10 min 合并所有有机相 减压蒸馏浓缩至干 (< 35  $^{\circ}$ C) 残渣溶于 10 mL 50% 色谱甲醇中 置于 -30  $^{\circ}$ C 下避光保存, 待液相分析。测定前样品经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。

### 1.4 统计分析

实验所得数据均采用数理统计软件 DPS (Data Processing System) v7.55 版处理, 其结果以平均值表示。

## 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等 10 种单体酚标准样品溶液在波长 200 ~ 400 nm 区间内扫描。10 种单体酚的紫外吸收光谱图显示, 标准样品的最大吸收峰虽然各不相同, 但在 280 nm 处均有最大或者较大吸收峰。综合考虑, 选取 280 nm 作为检测波长为宜。

### 2.2 色谱条件确定

根据已有报道, HPLC 测定多酚试验, 本试验中分别选用 2 种流动相组成。

流动相 I: 流动相 A: 水 乙酸 =99 1, 流动相 B: 乙腈。洗脱程序: 0 ~ 10 min, B 为 24%; 10 ~ 25 min, B 为 24% ~ 40%; 25 ~ 35 min, B 为 40% ~ 0%。

流动相 II: 流动相 A: 水 乙酸(98 2), 流动相 B: 乙腈。洗脱程序: 0 ~ 10 min, B 为 16%; 10 ~ 25 min, B 为 20% ~ 40%; 25 ~ 30 min, B 为 40% ~ 0%。

结果表明, 采用流动相组成 I 时, 咖啡酸和丁香酸得不到良好的分离, 采用流动相组成 II 时各个单体酚都能得到较好分离, 且分离时间较短。综合考虑分离效果和保留时间, 故选用流动相组成 II 为试验用流动相, 洗脱程序为: 0 ~ 10 min, B 为 16%; 10 ~ 25 min, B 为 20%

~ 40%; 25 ~ 30 min, B 为 40% ~ 0%。混合标样色谱图见图 1。

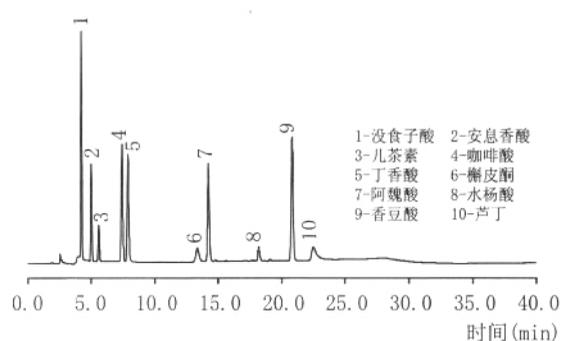


图 1 混合标样色谱图

### 2.3 标准曲线制备

分别称取约 0.0100 g 没食子酸、安息香酸、儿茶素、咖啡酸、丁香酸、槲皮酮、阿魏酸、水杨酸、香豆酸、芦丁标样, 用色谱甲醇定容于 10 mL 容量瓶中, 配成混合溶液, 将此溶液稀释成 7.5 ~ 120 mg/L 6 个不同浓度梯度的 10 种单体酚混合标样, 按上述确定的色谱条件进行测定, 进样量为 10  $\mu$ L, 以浓度为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 计算得到 10 条标准曲线。

表 1 各单体酚保留时间和回归方程

化合物	标准曲线	相关系数 (r)	线性范围 (mg/L)	保留时间 (min)
没食子酸	$y=32234x+63721$	0.9991	7.5~120	4.20
安息香酸	$y=17666x+19942$	0.9998	7.5~120	4.99
儿茶素	$y=7219.3x+108866$	0.9993	7.5~120	5.56
咖啡酸	$y=33633x+2378.7$	0.9999	7.5~120	7.36
丁香酸	$Y=33575x-578.69$	0.9999	7.5~120	7.83
槲皮酮	$y=8270.4x+9483.9$	0.9995	7.5~120	13.12
阿魏酸	$y=30735x-855.39$	0.9999	7.5~120	14.15
水杨酸	$y=6043.1x+4893.2$	0.9999	7.5~120	18.18
香豆酸	$y=47986x-15435$	0.9999	7.5~120	20.93
芦丁	$y=13936x+8046.2$	0.9994	7.5~120	22.59

### 2.4 样品预处理方法的优化

#### 2.4.1 萃取剂选择

取 10 mL 模拟酒样调节 pH2.0 (用 2 M HCl 调节), 分别用 20 mL 乙酸乙酯、乙醚、乙酸乙酯和乙醚等体积混合物萃取 3 次, 每次萃取时间为 10 min, 合并有机相, 减压蒸馏浓缩至干 (< 35  $^{\circ}$ C), 残渣溶于 10 mL 50% 色谱甲醇中, 置于 -30  $^{\circ}$ C 下避光保存, 待液相分析。测定前样品经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。

从图 2 可知, 乙酯乙酯提取各个单体酚回收率均较高。除槲皮酮外其他单体酚回收均在 80% 以上, 乙酸乙酯比乙醚提取率高, 可能与乙醚在室温大于 20  $^{\circ}$ C 时挥发性较大、化学性质不稳定、暴露于空气中、遇光即变质等有关。由于乙醚挥发温度较低, 室温较易挥发, 使得溶

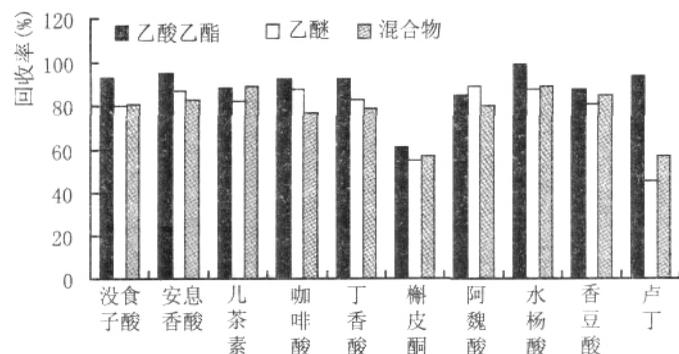


图2 不同有机溶剂对各个单体酚回收率的影响

剂损失和对环境的污染比乙酸乙酯严重,所以采用乙酸乙酯作为提取溶剂。

#### 2.4.2 pH 值的选择

分别取 10 mL pH2(用 2 M HCl 调节)、pH3.2(直接取酒样)、pH7(用 1 M NaOH 调节)模拟酒样,用 20 mL 乙酸乙酯提取 3 次,每次提取时间为 10 min,合并有机相,减压蒸馏浓缩至干( $< 35^\circ\text{C}$ ),残渣溶于 10 mL 50% 色谱甲醇中,置于  $-30^\circ\text{C}$  下避光保存,待液相分析。测定前样品经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。结果见表 2。

表2 不同pH值对10种单体酚回收率的影响

化合物	pH 2	pH 3.2	pH 7
没食子酸	93.24	62.76	48.21
安息香酸	95.17	78.67	28.14
儿茶素	88.25	68.26	62.34
咖啡酸	92.62	71.32	44.58
丁香酸	92.23	88.54	36.85
槲皮酮	60.91	59.26	60.47
阿魏酸	85.37	79.57	53.27
水杨酸	99.48	67.55	21.66
香豆酸	87.99	67.55	70.64
卢丁	93.65	78.68	76.19

从表 2 中可以看出, pH 值对各个单体酚回收率的影响很大,随着 pH 值的增加各个单体酚的回收率逐渐降低,调节 pH 2 各个单体酚提取含量明显高于 pH 7 时。这可能是因为 pH 2 时酸性酚成分子状态,中性酚成分子状态,而 pH 7 时中性酚成分子状态,酸性酚成离子状态的缘故。

#### 2.4.3 萃取时间的选择

取 10 mL 模拟酒样调节 pH 2 (用 2 M HCl 调节),用 20 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,萃取时间分别为 10 min、20 min、30 min、40 min 和 50 min,合并所有有机相,减压蒸馏浓缩至干( $< 35^\circ\text{C}$ ),残渣溶于 10 mL 50% 色谱甲醇中,置于  $-30^\circ\text{C}$  下避光保存,待液相分析。测定前样品经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。结果见图 3。

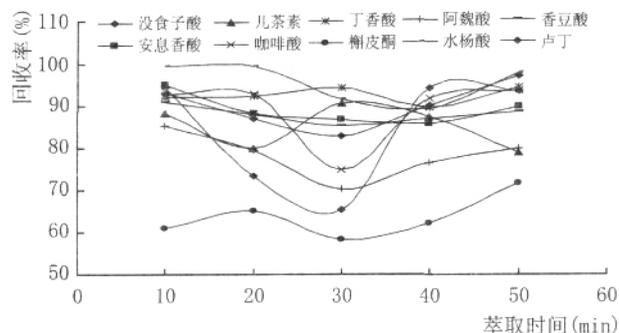


图3 不同提取时间对各个单体酚回收率的影响

### 3 结论

3.1 通过对色谱条件的选择优化,确定了流动相 A 为:水乙酸=98 2;流动相 B 为:乙腈。梯度洗脱程序为:0~10 min, B 为 16%; 10~25 min, B 为 20%~40%; 25~30 min, B 为 40%~0%。在此色谱条件下,10 种单体酚在 30 min 内均得到了良好的分离。

3.2 通过对溶剂类型、pH 值以及萃取时间的选择优化,确定了 10 种单体酚的最佳萃取条件。结果表明,调节酒样 pH 2,用乙酸乙酯萃取 10 min,经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后利用高效液相色谱测定,各个单体酚 30 min 内得到了良好的分离且回收率较高。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Mar í a Monagas,Rafael Su á rez,Carmen G ó n e z-Cordov e s.Si-multaneous 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.
- [3] 陈建业,温鹏飞,战吉成.葡萄酒中 11 种酚酸的反相高效液相色谱测定[J].中国食品学报,2006,6(6): 134-138.
- [4] 裴鹰,钱洪.葡萄酒中的槲皮酮的保健功能[J].广州食品工业科技,2004,20(2): 140-142.
- [5] Massimo Castellari, Elisa Sartini, Alessandra Fabiani, et al. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column [J]. Journal of Chromatography A, 2002,973: 221-227.
- [6] Radek Sladkovsky, Petr Solich, Marek Urb á nek et al. High-performance liquid chromatography determination of phenolic components in wine using off-line isotachophoretic pre-treatment[J]. Journal of Chromatography A, 2004,1040: 179-184.
- [7] S. Malovana, F.J. Garcia Montelongo, J.P. Perez et al. Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography[J]. Analytica Chimica Acta, 2001,428: 245-253.