

用 HPLC 分析赤霞珠干红葡萄酒中花色素苷成分

王 华^{1,2}, 韩富亮¹

(1.西北农林科技大学葡萄酒学院,陕西 杨凌 712100; 2.西北农林科技大学食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

摘要: 赤霞珠是酿造干红葡萄酒的优良传统品种。以 HPLC 方法对不同产地赤霞珠干红葡萄酒中花色素苷的组分进行了研究。结果表明,不同产地的赤霞珠干红葡萄酒中都含有:花翠素 3-O-葡萄糖苷,花青素 3-O-葡萄糖苷,3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷等 9 种花色素苷,而其中的二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷(46.75%~60.31%)和二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷(22.37%~29.03%)是赤霞珠葡萄酒中的主要花色素苷。赤霞珠葡萄酒中甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷和二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷的总量与甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷和二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷的总量比率存在大于 3 这一经验值,为 3.92~7.40。

关键词: 分析检测; 赤霞珠; 干红葡萄酒; 花色素苷成分; HPLC 法

中图分类号:TS261.7;TS262.6;O657 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2005)04-0081-04

Analysis of Anthocyanin Compositions in Cabernet Sauvignon Dry Red Wine by HPLC

WANG Hua^{1,2} and HAN Fu-liang¹

(1.Enology College of Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100; 2.College of Food Science and Engineering of Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100 China)

Abstract: Cabernet Sauvignon was a traditional quality species for dry red wine brewing. The analysis of anthocyanins compositions in dry red wine by HPLC indicated that cabernet sauvignon in different regions all contained the following nine anthocyanins: Delphinidin 3-O-Glucoside, Cyanidin 3-O-Glucoside, Petunidin 3-O-Glucoside, Peonidin 3-O-Glucoside, Malvidin 3-O-Glucoside, Peonidin 3-O-(6-O-Acetyl)-Glucoside, Malvidin 3-O-(6-O-Acetyl)-Glucoside, Peonidin 3-O-(6-O-p-Coumaryl)-Glucoside and Malvidin 3-O-(6-O-p-Coumaryl)-Glucoside. Among them Malvidin 3-O-Glucoside (46.75%~60.31%) and Malvidin 3-O-(6-O-Acetyl)-Glucoside (22.37%~29.03%) are the main anthocyanins for dry red wine. The ratio of acetylated to p-coumaroylated anthocyanins in wine ranged from 3.92 to 7.40, higher than experience value 3. (Tran. by YUE Yang)

Key words: cabernet sauvignon; dry red wine; anthocyanin compositions; HPLC

花色素苷是赋予红葡萄酒颜色的主要物质,对葡萄酒的感官品质有重要影响。赤霞珠(*V.vinifera*)是酿造干红葡萄酒的优良品种,而赤霞珠葡萄酒是葡萄酒市场里一种重要的单品种酒。

赤霞珠葡萄酒中的 9 种主要花色素苷在世界主要葡萄酒生产国已经被用来作为鉴定葡萄酒原料品种的

一种有效的方法。如果乙酰化的花色素苷与对香豆酰的花色素苷比例大于 3,认为是赤霞珠单品种葡萄酒,而不是杂交种葡萄酒^[1]。此外,葡萄与葡萄酒花色素苷 HPLC 指纹图谱为葡萄分类、品种和遗传家系鉴定,葡萄酒原料品种、葡萄酒产地和假酒鉴定,甚至于葡萄酒酒龄的鉴定提供了一种新的研究方向、途径和可能的鉴定

收稿日期:2004-12-08; 修回日期:2005-01-26

作者简介:王华(1959-),女,教授、博导,西北农林科技大学葡萄酒学院实验研究中心主任,食品科学与工程学院副院长,主要从事葡萄与葡萄酒的研究。

方法^[1,2,9]。

花色苷的成分及其比例是深入研究其作用的基础(包括指纹图谱的应用)。国外已对葡萄酒中的花色苷进行了比较广泛的研究,而国内用 HPLC 对葡萄与葡萄酒中花色苷的研究还未见报道。目前, HPLC 已经成为分析研究花色苷的主要工具。本文采用 HPLC 方法分析了赤霞珠葡萄酒中花色苷的组分和其相对百分含量,以及这些花色苷相互之间的比例,为科学客观鉴定葡萄酒原料品种和其他相关的研究提供依据,为建立葡萄与葡萄酒花色苷 HPLC 指纹图谱提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试材料为 2003 年产于河北昌黎、沙城和陕西杨凌以赤霞珠为原料酿造的干红葡萄酒,CS-1~CS-3(昌黎)、CS-4(沙城)和 CS-5(杨凌)2003 年酿造,酒样贮存在玻璃容器中。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪为岛津 LC-10ATvp,检测器 SPD-10ATvp,积分仪型号 C-R8A。真空抽滤器:Autoscience AP-9901S。超声脱气机:Autoscience AS3120B。流动相乙腈(HPLC)、甲酸(AR)。

1.2.2 HPLC 分析

HPLC 分析所用的标样酒由德国 R.Wittkowski 教授提供。分析柱 Shim-Pack VP-ODS 250×4.6 mm i.d.,预柱 10×4.6 mm i.d.。检测波长 518 nm,进样体积 20 μL。分析色谱条件参照 R.Marx、B.Holbach 和 H.Otteneder 的方法。流动相和酒样在进行液相分析前进行 0.45 μm 超微过滤。目前,能够应用的商业标样很少,不能满足多种花色苷绝对含量的测定。花色苷的含量表示为 9 种花色苷的相对百分含量,即各花色苷的峰面积与 9 种花色苷总峰面积的百分比^[4]。

2 结果与分析

2.1 HPLC 分析 9 种花色苷的有效性

9 种花色苷保留时间(min)的标准差范围在 0.056~0.189 之间,变异系数(CV)在 0.484%~0.620%之间,见表 1。

2.2 花色苷的定性分析

赤霞珠葡萄酒中含量最多的花色苷是二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,其次是二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷。花色苷在液相色谱中的洗脱顺序有一定的规律:花翠素 3-O-葡萄糖苷,花青素 3-O-葡萄糖苷,3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-葡萄糖

表 1 9 种花色苷保留时间的标准差(STD)和变异系数(CV,%)

项目	平均保留时间 (min)	标准差 STD	变异系数 CV (%)
1	10.114	0.056	0.554
2	12.314	0.066	0.535
3	13.794	0.072	0.524
4	16.106	0.081	0.506
5	17.226	0.083	0.484
6	24.834	0.154	0.620
7	25.751	0.158	0.612
8	30.744	0.189	0.614
9	31.390	0.189	0.603

注:1~9 所代表的花色苷见图 1 注解。

苷,二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷^[1-2,10]。根据德国 R. Wittkowski 教授提供的标样酒及其标准图谱和本实验中所作标样酒图谱,以及 Jennifer Burns (2002) 和 José-María Ryan (2002) 的参考文献,确定了 9 种花色苷,即:花翠素 3-O-葡萄糖苷,花青素 3-O-葡萄糖苷,3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷(见图 1)。

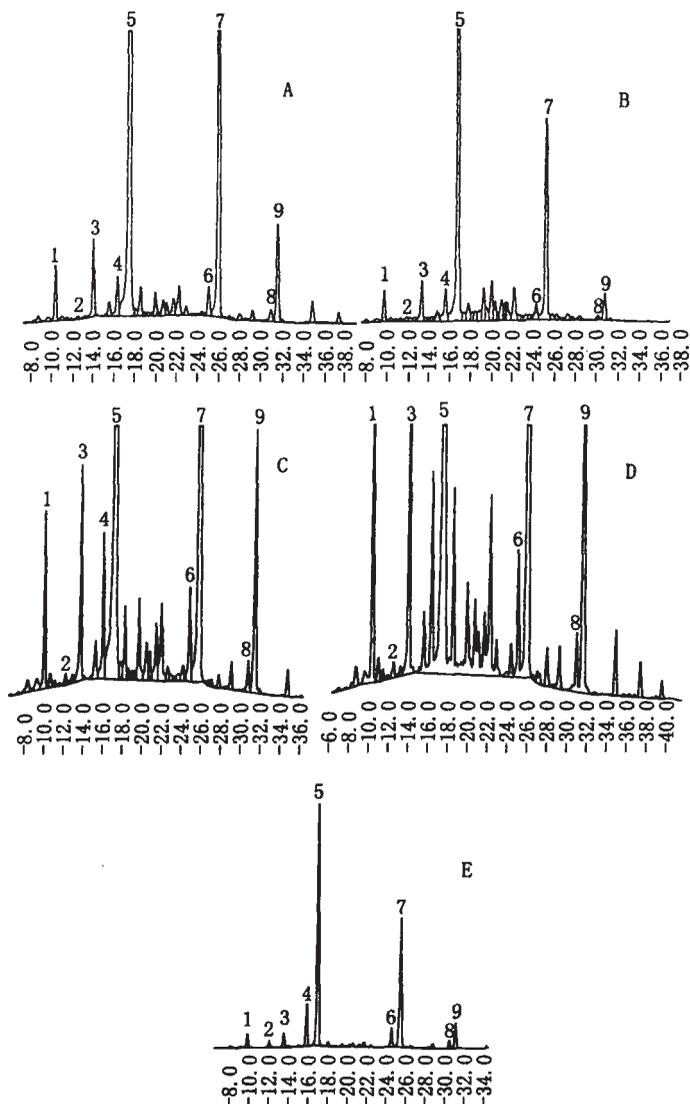
2.3 赤霞珠干红葡萄酒花色苷的组分及其比例

2.3.1 赤霞珠干红葡萄酒花色苷的组分

赤霞珠干红葡萄酒中含量最多的花色苷是二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,含量在 46.75%~60.31%之间,这与 Jennifer Burns 等(2002)的测定结果相似^[6]。二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷其次,含量在 22.37%~29.03%。3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-葡萄糖苷和二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷的含量没有超过 10%;花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)-葡萄糖苷和甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷的含量不超过 5%;花青素 3-O-葡萄糖苷的含量没有超过 1%(杨凌赤霞珠葡萄酒的甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)-葡萄糖苷含量例外,超过 1%,为 1.75%);不同产地赤霞珠干红葡萄酒 9 种花色苷的相对百分含量见图 1 和表 2。

2.3.2 花色苷之间的比例

同一地域和不同地域赤霞珠葡萄酒中,乙酰化的花色苷与对香豆酰的花色苷之间的比率(表 3 D 列)都大于 3,验证了相同产地和不同产地的赤霞珠干红葡萄酒具有大于 3 这一经验比率。



样本编号 A: CS-1(昌黎) ; B: CS-2(昌黎) ; C: CS-3(昌黎) ; D: CS-4(沙城) ; E: CS-5(杨凌)

花色素苷:

1. 花翠素 3-O-葡萄糖苷
2. 花青素 3-O-葡萄糖苷
3. 3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷
4. 甲基花青素 3-O-葡萄糖苷
5. 二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷
6. 甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷
7. 二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷
8. 甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷
9. 二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷

图 1 赤霞珠干红葡萄酒花色素苷 518 nm 下的 HPLC 色谱图

对香豆酰化的花色素苷与非酰化花色素苷的百分比(表 3 F 列)在赤霞珠葡萄酒中都小于 15%。对香豆酰化的花色素苷与二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷和其衍生物的百分比(表 3 H 列)在赤霞珠葡萄酒中都小于 10%。

3 结论与讨论

赤霞珠葡萄酒中含有以下 9 种花色素苷:花翠素

表 2 赤霞珠葡萄酒花色素苷的 9 种组分

葡萄酒产地	CS-1 昌黎	CS-2 昌黎	CS-3 昌黎	CS-4 沙城	CS-5 杨凌
1	2.37	2.89	2.72	4.29	2.38
2	0.23	0.74	0.31	0.50	0.90
3	3.65	4.32	3.64	5.18	2.63
4	2.35	4.27	2.74	2.33	7.46
5	60.29	60.31	58.77	55.35	46.75
6	1.74	1.84	1.80	1.56	3.76
7	24.07	22.37	24.62	24.22	29.03
8	0.63	0.47	0.58	0.66	1.75
9	4.67	2.80	4.85	5.92	5.35

注: 1~9 所代表的花色素苷见图 1 注解。

表 3 花色素苷之间的比例或比率

葡萄酒产地	CS-1 昌黎	CS-2 昌黎	CS-3 昌黎	CS-4 沙城	CS-5 杨凌
A(%)	68.89	72.95	68.16	67.64	60.12
B(%)	25.81	24.21	26.42	25.78	32.79
C(%)	5.30	3.27	5.43	6.58	7.10
D	4.87	7.40	4.87	3.92	4.62
E(%)	37.47	33.19	38.76	38.11	54.54
F(%)	7.69	4.48	7.97	9.73	11.81
G(%)	27.04	26.17	27.90	28.33	35.83
H(%)	5.25	3.28	5.50	6.92	6.59
I(%)	32.28	29.45	33.40	35.26	42.38

注: 1~9 所代表的花色素苷见图 1 注解。A=1+2+3+4+5(非酰化花色素苷含量); B=6+7(乙酰化花色素苷含量); C=8+9(对香豆酰化花色素苷含量); D=B/C; E=B/A × 100; F=C/A × 100; G=7/(5+7+9) × 100; H=9/(5+7+9) × 100; I=(7+9)/(5+7+9) × 100。

3-O-葡萄糖苷,花青素 3-O-葡萄糖苷,3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷,其中二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷(46.75%~60.31%)和二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷(22.37%~29.03%)是其主要的花色素苷,而乙酰化的花色素苷与对香豆酰的花色素苷之间的比率(表 3 D 列)大于 3。

由图 1 可以看出,不同产地的赤霞珠葡萄酒含有几十个色谱峰,根据花色素苷的洗脱顺序可以推断在 5 号峰(不包括 5 号峰)到 7 号峰(包括 7 号峰)之间的色谱峰含有花翠素 3-O-葡萄糖苷,花青素 3-O-葡萄糖苷,3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷这 5 种乙酰化的花色素苷,而在 7 号峰(不包括 7 号峰)到 9 号峰(包括 9 号峰)之间的色谱峰则含有花翠素 3-O-葡萄糖苷,花青素 3-O-葡萄糖苷,3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷对香豆酰化

的花色素苷。

由图1可以看出,色谱图A、B、C、D,尤其是C和D的基线漂移上升,因此A、B、C、D色谱图中花色素苷的峰面积可能偏高。但由于采用相对百分含量表示,各花色素苷的百分含量和其比例的误差相对就会减小。

赤霞珠干红葡萄酒中含有花色素苷很多(见图1),所以测定花色素苷需要选择柱效较高的色谱柱。另外,由于HPLC分析花色素苷采用的流动相pH值很低,因此分析应注意兼顾选用对低pH(1.5~2.5)也稳定的色谱柱,否则会显著地降低花色素苷在分离柱中的保留时间,缩短柱寿命。

从直观上看(见图1)3个地域的同种干红葡萄酒花色素苷的指纹图谱有一定程度的差异,国外已经采用多元统计分析对花色素苷指纹图谱进行分析研究,因此,葡萄酒花色素苷指纹图谱可能有助于鉴定不同产地的葡萄酒。

赤霞珠干红葡萄酒花色素苷的成分和比例是其品种在发酵过程中通过浸渍传递给葡萄酒的,因此,它的这些花色素苷组分和比例就是赤霞珠葡萄酒的特征特性。

致谢!感谢德国消费者保健联邦协会和兽医药联邦协会的R.Wittkowski教授、B.Sassy、C.Fauhl和A.Heier博士惠赠参考资料、标样酒及其标准图谱!

参考文献:

- [1] Jennifer Burns, William Mullen, Nicholas Landrault et al. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines Made from Cabernet Sauvignon and Hybrid Grapes [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50(14): 4096-4102.
- [2] José-María Ryan and Eugenio Revilla. Anthocyanin Composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Grapes at

- Different Stages of Ripening[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003, 51: 3372-3378.
- [3] A. Heier, W. Blaas, A. Droß and R. Wittkowski. Anthocyanin Analysis by HPLC/MS[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2002, 53(1): 78-86.
- [4] Johanna Bakker and Colin F. Timberlake. The Distribution and Content of Anthocyanins in Young Port Wines as Determined by High Performance Liquid Chromatography[J]. Journal of Science Food Agriculture, 1985, 36: 1325-1333.
- [5] Eva García-Beneytez, Eugenio Revilla and Félix Cabello. Anthocyanin Pattern of Several Red Grape Cultivars and Wines Made from Them[J]. European Food Research Technol, 2002, 215: 32-37.
- [6] M. Ibern-Gómez, C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós et al. Rapid HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Red Wines[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2002, 53(3): 218-221.
- [7] María Monagas, Verónica Núñez, Begoña Bartolomé et al. Anthocyanin-derived Pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon Wines Produced in Spain[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2003, 54(3): 163-169.
- [8] A. Morata, M. C. Gómez-Cordovés, J. Suberviola et al. Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003, 51: 4084-4088.
- [9] Yu Gao and Garth A. Cahoon. High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Anthocyanins in the Red Seedless Table Grape Reliance[J]. Am. J. Enol. Vitic, 1995, 46(3): 339-345.
- [10] María A. Esteban, María J. Villanueva and José R. Lissarrague. Effect of Irrigation on Changes in the Anthocyanin Composition of the Skin of cv. Tempranillo (Vitis vinifera L.) Grape Berries during Ripening[J]. J. Sci. Food. Agric, 2001, 81: 409-420.

2004年全国啤酒产量(万kL)

省市区名	2004年产量	2003年产量	省市区名	2004年产量	2003年产量
北京	138.45	123.51	湖北	118.56	113.33
天津	17.17	17.33	湖南	43.96	42.21
河北	126.92	114.79	广东	253.68	213.79
山西	17.45	17.14	广西	46.76	40.33
内蒙古	51.29	43.54	海南	8.77	5.82
辽宁	171.58	149.38	重庆	46.21	45.10
吉林	86.65	81.54	四川	107.36	90.12
黑龙江	243.24	202.33	贵州	13.84	12.00
上海	59.16	43.40	云南	20.05	18.67
江苏	146.15	115.90	西藏	3.89	3.29
浙江	215.47	201.68	陕西	61.92	53.72
安徽	129.84	122.02	甘肃	29.58	23.85
福建	145.17	137.27	青海		0.19
江西	48.41	45.31	宁夏	9.07	6.29
山东	374.73	321.70	新疆	24.59	22.38
河南	150.13	112.55	合计	2910.05	2540.48

(丹摘)