

HPLC法测定葡萄酒中有机酸的色谱条件研究

张 军,韩英素,高年发,姜 丽
(天津科技大学生物工程系,天津 300222)

摘 要: 利用高效液相色谱法(HPLC)测定葡萄酒中有机酸,测得相对标准偏差为1.8 %~4.5 %,回收率为94.5 %~103.1 %,具有简便快速、选择性好、准确度高之特点。最佳分离条件为:流动相用高氯酸调pH为2.5的水溶液,流速为0.6 ml/min,柱温55 ℃,检测波长210 nm,进样量10 μl。(丹妮)
关键词: 分析检测; 葡萄酒; 有机酸; 高效液相色谱法
中图分类号: TS261.7; TS262.6; O657.72 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2004)02-0091-03

Study on the Conditions in the Determination of Organic Acids in Grape Wine by HPLC

ZHANG Jun, HAN Ying-su and GAO Nian-fa et al.
(Bioengineering Department of Tianjin Science & Technology University, Tianjin 300222, China)

Abstract: HPLC (high efficiency liquid chromatography) was applied to determine the organic acids in grape wine. The RSD was 1.8 %~4.5 % and the recovery rate was 94.5 %~103.1 %. The method had the superiorities of rapid and simple operation, good selectivity and high accuracy. The optimal separation conditions were as follows: pH value adjusted to 2.5 by perchloric acid in mobile phase, flow rate as 0.6 ml/min, column temperature at 55 ℃, detecting wavelength as 210 nm, and sample size as 10 μl. (Tran. by YUE Yang)
Key words: analysis & determination; grape wine; organic acid; HPLC

葡萄酒中的酸度主要由有机酸决定,有机酸的种类、浓度与葡萄酒的类型、品质优劣有很大关系,调节着酸碱的平衡,影响葡萄酒的口感、色泽及生物稳定性。葡萄酒中的有机酸主要包括酒石酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、乳酸、乙酸等。其中的乙酸是葡萄酒酿造、贮存过程中的晴雨表,其含量过高表明已感染杂菌。酒石酸又名葡萄酸,是葡萄酒中含量较大的酸,它是抗葡萄呼吸氧化作用和抗酒中细菌作用的酸类,对葡萄酒着色与抗病有重要作用。酒石酸大部分以酒石酸钾、酒石酸氢钾形式存在,在发酵过程中以结晶形式析出,减少了酒石酸浓度,其溶解度随温度降低而减小^[1-3]。

由于有机酸在葡萄酒中的重要性质,所以有机酸的检测十分重要而且必要的。有机酸的检测方法有很多种,但是这些方法一般要进行预分离、衍生化等繁琐的前处理,而且能达到同时分离的有机酸种类较少,所以在现代最为成熟的技术就是HPLC技术。HPLC分析有机酸不仅简便快速,而且选择性好、准确度高^[4-6]。

在高效液相色谱法检测葡萄酒中的有机酸时,最重要的是选择最佳的色谱分离条件。这些条件中涉及流动相的pH值、流速、柱温、检测波长等等。流动相比影响着流动相的pH值,从而对柱效和峰的分离均有影响;流速同样是影响其分离效果的一个重要因素,流速过低则分离时间过长、柱效差,而流速过高又导致峰挤在一起分不开;根据色谱理论,柱温是影响柱效和分离度的主要因素,柱温升高可以降低流动相的粘度和提高树脂的传质效率,但是太高又会破坏色谱柱,所以色谱条件的选择是相当复杂的,要综合众多的考虑因素。

1 材料与方法

收稿日期:2003-09-03; 修回日期:2003-10-09
作者简介:张军(1980-),男,安徽明光人,在读硕士研究生;高年发(1945-),男,教授。

- 1.1 主要实验仪器
日本岛津LC-3A型高效液相色谱仪; 色谱柱:SCR-101H(300 mm×7.9 mm); 检测器:SPD-1紫外分光光度检测器。
- 1.2 主要试剂
二次蒸馏水, 优级高氯酸; 色谱纯级标准样品:酒石酸、L-苹果酸、L-乳酸、琥珀酸、柠檬酸和乙酸。
- 1.3 实验方法
1.3.1 标准酸混合液的配制
根据参考数据,葡萄酒中含:酒石酸5~10 g/L, L-苹果酸2~4 g/L, L-乳酸0~2.5 g/L, 琥珀酸0.5~1.5 g/L, 柠檬酸1 g/L左右, 乙酸<1 g/L^[1-3]。
根据以上数值,配制以下浓度的混合标准酸液,定容至10 ml,作为寻找标准酸的色谱分离条件使用,对量的要求不严格。如表1所示。

表 1	标准酸混合液的配制 (g/L)					
	酒石酸	L-苹果酸	琥珀酸	柠檬酸	L-乳酸	乙酸
浓度	5	5	2	1	2	1

- 标准液使用重蒸水配制,水用0.45 μm的四氟乙烯膜过滤后使用,混合液中含乙醇11 % (v/v)。
- 1.3.2 各种有机酸的定性定量
(1)定性用各种有机酸标准液的配制
各种单一标准有机酸液分别进样,记下保留时间。
(2)定量用各种有机酸标准液的配制

所使用的6种有机酸中:酒石酸、L-苹果酸、琥珀酸、柠檬酸4种酸为固体药品,可以准确称量定容,但L-乳酸和乙酸为液体,必须配制完进行标定浓度,因此配制了4种固体酸的混合标准液,L-乳酸和乙酸单独配制后标定浓度,然后分别稀释成5个不同浓度,进行定量(见表2)。

表2 各种酸标准液的配制

项目	预配浓度 (g/L)	需称量 (g)	实称量 (g)	实配浓度 (g/L)
四酸混合液	10	0.5	0.5040	10.080
L-苹果酸	5	0.25	0.2500	5.000
琥珀酸	4	0.2	0.2005	4.010
柠檬酸	2	0.1	0.1044	2.088
L-乳酸	5	液体 L-乳酸,定容, 用 0.14285 M NaOH 标定		4.632
乙酸	2	36% 乙酸 0.3 ml 定 容,用 0.14285 M NaOH 标定		2.059

注:准确称量,定容至 50 ml。

将以上配置的3种酸液各分别取出8.0 ml,6.0 ml,4.0 ml,2.0 ml,分别定容到10 ml,加上母液作为5个不同的浓度,分别进样,定量分析。

2 结果与讨论

2.1 标准混合酸色谱分离条件的选择

2.1.1 色谱柱的选择

针对有机酸组系,选择了SCR-101H柱。

2.1.2 流动相的选择和配制

用高氯酸调pH值的水溶液作为流动相,分别调pH值为2.4,2.5,2.6,2.7,2.8,3.0,使用前要经过脱气处理。

2.1.3 检测波长的选择

根据各种酸在200~240 nm吸光度的扫描,各酸在210 nm左右均有较大吸收峰,最大吸收波长均在210 nm左右,所以把检测波长暂定在210 nm。如图1所示。

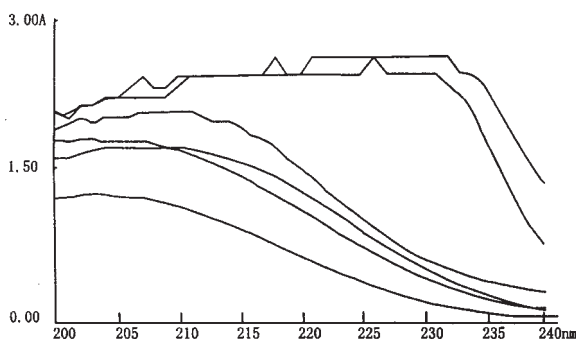


图1 6种有机酸的紫外扫描图

2.1.4 进样量的选择

用标准酸混合液进样,进样量为5 μ l时,峰形较小,进样量改为10 μ l时,峰形适中。

2.1.5 流动相的pH值和流速的选择

分别以pH值为3.0,2.8,2.7,2.6,2.5,2.4的高氯酸液作为流动相,然后分别以流速0.4 ml/min,0.5 ml/min,0.6 ml/min,0.7 ml/min,0.8 ml/min,0.9 ml/min,1.0 ml/min进样。结果得出流动相pH值为2.5,2.4,流速为0.4 ml/min,0.5 ml/min,0.6 ml/min时分离效果

最好。因为流动相的pH值低对机器的损伤程度大,流速过高导致峰挤在一起分不开,流速过低则分析时间长,柱效差,所以在同等分离效果的情况下,应选择pH值高,流速高的分离条件。因此选择了流动相pH值为2.5,流速为0.6 ml/min。

2.1.6 柱温的选择

根据色谱理论,柱温是影响柱效和分离度的主要因素,柱温升高可以降低流动相的粘度和提高树脂的传质效率,因此柱温升高可以在更高的流动相流速下也能达到较好的分离效果。通过实验选定流动相pH值为2.5,流速为0.6 ml/min。因此,在210 nm,流动相pH为2.5时,升高柱温,在不同的柱温下,分别以0.6 ml/min,0.7 ml/min的流速进样。依次升高柱温到30 $^{\circ}$ C,35 $^{\circ}$ C,40 $^{\circ}$ C,45 $^{\circ}$ C,50 $^{\circ}$ C,55 $^{\circ}$ C,60 $^{\circ}$ C,分别以0.6 ml/min,0.7 ml/min的流速进样。结果表明,柱温为55 $^{\circ}$ C,60 $^{\circ}$ C的分离效果较好。考虑到同等分离效果的条件对机器和色谱柱的维护,应该尽量选择较低的温度,因此选择55 $^{\circ}$ C作为分离条件的柱温。流速为0.6 ml/min和0.7 ml/min的分离效果相当,流速为0.6 ml/min的分离效果稍好,因此选择了流速为0.6 ml/min。

所以,在检测波长210 nm下,选择了流动相pH值为2.5,柱温为55 $^{\circ}$ C,流速为0.6 ml/min作为分离条件。

2.1.7 检测波长的选择

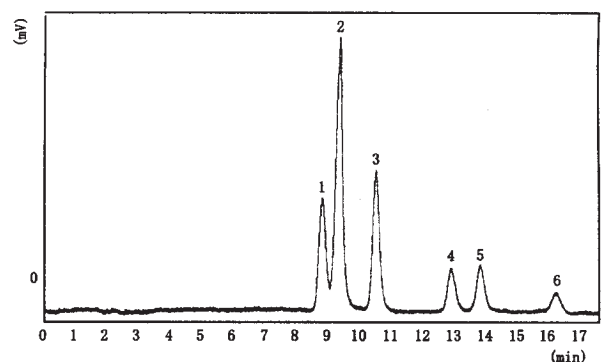
根据各种酸在200~240 nm的吸光度扫描,各酸在210 nm左右均有较大吸收,最大吸收波长均在210 nm左右,因此以上实验把检测波长定为210 nm。但是这6种酸中,如柠檬酸、乙酸,在酒中的含量很低,为了也能够检测出来,因此要尽量把检测波长定在接近于他们的最大吸收波长处,使它们在此波长下有最大吸收,能够最大出峰,从而不会因为量小而不被检测出来。

因此,用接近于葡萄酒中真实含量的有机酸混合液,在195~220 nm的不同波长下分别进样,根据出峰大小的比较,选择出最佳的检测波长。

以pH2.5的高氯酸水溶液为流动相,流速为0.6 ml/min,柱温为55 $^{\circ}$ C,分别以195 nm,200 nm,205 nm,210 nm,215 nm,220 nm的检测波长进样混合酸液,结果在几个波长下差别不是很大,即出峰时间及峰高无太大差别。因此,仍选择210 nm作为检测波长。

最后选定分离条件:流动相为用高氯酸调pH为2.5的水溶液,流速0.6 ml/min,柱温55 $^{\circ}$ C,检测波长210 nm,进样量10 μ l。

在此分离条件下,各种有机酸可以达到很好的分离效果,如图2所示。



1—柠檬酸;2—酒石酸;3—L-苹果酸;4—琥珀酸;5—L-乳酸;6—乙酸

图2 最佳分离条件下标准混合有机酸分离色谱图

2.2 定性与定量试验

2.2.1 有机酸的定性

将各种单一有机酸液依次进样,记录各自保留时间(见表3)。

表 3	各种有机酸的保留时间 (min)					
	柠檬酸	酒石酸	L-苹果酸	琥珀酸	L-乳酸	乙酸
保留时间	8.743	9.235	10.425	12.794	13.722	16.049

2.2.2 有机酸的定量(面积外标法)

将不同浓度酸液从低浓度到高浓度依次进样,计算各自的峰面积(每个样平行进3次)。作各种有机酸的(峰面积-浓度)标准曲线(见图3)。

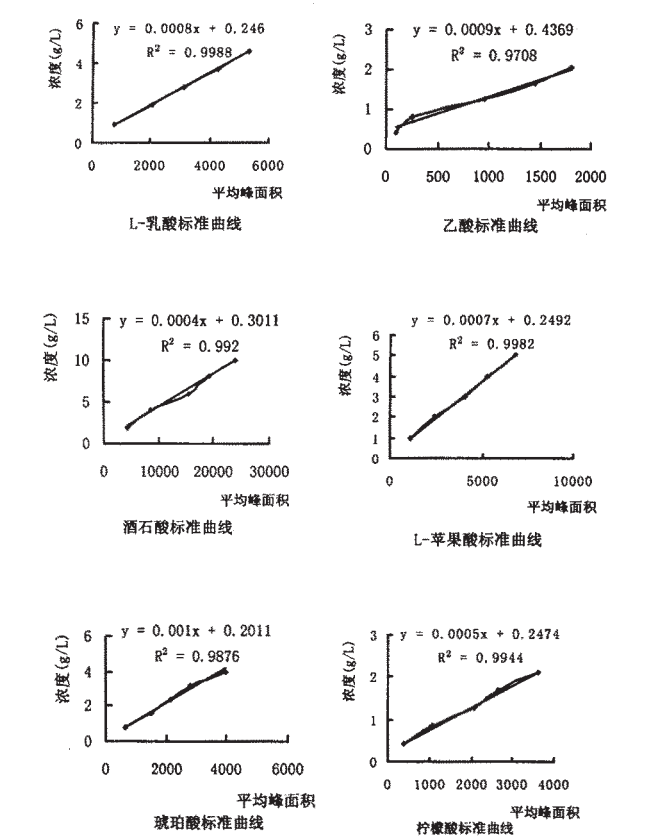


图 3 6种有机酸的标准曲线

综合2.2.1和2.2.2,各种有机酸的定性与定量试验结果如表4所示。

表 4	各种有机酸的保留时间与线性回归方程			
组分	保留时间(min)	回归方程	R²	
柠檬酸	8.743	Y = 0.0005x + 0.2474	0.9944	
酒石酸	9.235	Y = 0.0004x + 0.3011	0.9920	
L-苹果酸	10.425	Y = 0.0007x + 0.2011	0.9982	
琥珀酸	12.794	Y = 0.0001x + 0.2011	0.9876	
L-乳酸	13.722	Y = 0.0008x + 0.2460	0.9988	
乙酸	16.049	Y = 0.0009x + 0.4639	0.9708	

y:有机酸浓度(g/L) x:峰面积(AU/S)。

从表4中线性回归方程可知,在实验样品的浓度范围内,各种有机酸的线性关系良好,用外标法定量准确度可以得到保证。

2.3 方法的重现性与回收率测定

2.3.1 方法的重现性

将长城1号酒样重复进样测定5次,以考察方法的重现性。测定结果见表5。

表 5	方法的重现性试验结果 (g/L)				
测定次数	柠檬酸	酒石酸	L-苹果酸	琥珀酸	
1	0.5040	3.7499	2.9002	0.6231	
2	0.5268	3.8325	2.9038	0.5618	
3	0.5306	3.6795	2.8125	0.6449	
4	0.4938	3.9003	2.9890	0.5824	
5	0.4802	3.8382	2.7835	0.6169	
平均值	0.50708	3.8001	2.8782	0.60582	
相对标准偏差(%)	3.4	1.8	2.2	4.5	

从表5可得,各种有机酸的相对标准偏差在1.8%~4.5%之间,重现性较好。

2.3.2 方法的回收率

在10 ml长城1号酒样中加入4种固体标准酸,酒石酸和L-苹果酸各20.0 mg,柠檬酸和琥珀酸各10.0 mg。然后取4 ml进行10000 r/min高速离心15 min,取上清液进行高效液相色谱法测定,根据加入量和检出量计算回收率。测定结果如表6所示。

表 6	方法的回收率实验结果 (g/L)			
组分	测定结果		加入标准品	回收率(%)
	酒样含量	酒样+标准品		
柠檬酸	0.5040	1.4873	1.020	96.4
酒石酸	3.7499	5.7244	2.050	96.3
L-苹果酸	2.9022	4.8012	2.010	94.5
琥珀酸	0.6231	1.6747	1.020	103.1

从表6结果中可以看出,回收率为94.5%~103.1%,方法的准确度较高。

综合2.3.1和2.3.2:样品经高效液相色谱分析测得相对标准偏差为1.8%~4.5%,回收率为94.5%~103.1%,方法的准确性可以得到保证。

参考文献:

[1] 赵光璠,尹卓容,张继民,等译.葡萄酒酿造学-原理及应用(第1版)[M].北京:轻工业出版社,2001.
[2] 李华.葡萄酒的总酸及pH值[J].酿酒,1987,(6):9-12.
[3] 秦含章.葡萄酒分析化学(第1版)[M].北京:中国轻工业出版社,1991.
[4] AMERINE M.A and OUGH C.S. Methods for Analysis of musts and Wines. 2nd ed[M]. New York:John Wiley and Sons,1988.57-69.
[5] 沈国惠,王荣民,等.直接进样-高压液相色谱法测定葡萄酒的有机酸[J].食品与发酵工业,1984,(6):14-20.
[6] 朱明华.仪器分析(第3版)[M].北京:高等教育出版社,2000.
[7] 高先富,高年发,韩英素,等.发酵液中丙酮酸的HPLC法检测的研究[J].天津轻工业学院学报,2003,(3):10-12.

《酿酒科技》2003 增刊
出版发行

由中国酿酒工业协会白酒分会和《酿酒科技》杂志社联合编辑出版的《2003 中国白酒生产技术论文集》以《酿酒科技》2003 年增刊形式正式出版发行。凡需订阅《论文集》的读者请与酿酒科技杂志社发行部联系。

联系人:吴萍 电话:0851-5796163

酿酒科技杂志社
2004.2.16.