

制备高效液相色谱法分离制备葡萄果皮 中二甲花翠素 3- O- 葡萄糖苷单体

王 华¹, 菅 蓁¹, 郭耀东²

(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: 以 1 %盐酸甲醇为提取剂提取葡萄果皮中的花色苷, 通过 Amberlite XAD- 7HP 大孔吸附树脂对葡萄皮中花色苷进行纯化后, 由高效制备液相分离纯化二甲花翠素 3- O- 葡萄糖苷单体。采用 PREP- ODS(H)kit(5 μ m, 250 $\times$ 20 mm i.d.) 色谱柱, 流动相为水 / 乙腈 / 甲酸 流动相 A 为 80/10/1.65; 流动相 B 为 40/50/1.05, v/v), 测定波长 535 nm, 流速 11 mL/min, 室温, 进样量 100 μ L, 梯度: 0 min, 0 %B; 10 min, 10 %B; 20 min, 30 %B; 25 min, 50 %B; 30 min, 0 %B。结果表明, 产品单体纯度可达 98.13 %, 经 HPLC 分析与 UV、MS 分析鉴定, 其分析图谱与数据同标准图谱及数据相一致。

关键词: 葡萄酒; 花色苷; 提取; 高效制备液相

中图分类号: TS262.6; O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2007) 11- 0019- 03

Isolation of Malvidin 3- O- glucoside from Grape Pericarp by High Performance Liquid Chromatography

WANG Hua¹, JIAN Zhen¹ and GUO Yao-dong²

(1.Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, College of Enology, Yangling, Shanxi 712100;
2. College of Food Science and Engineering, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: 1 %HCl MeOH was used as extractant for anthocyanins extration from grape pericarp, then the anthocyanins sample was subjected to an Amberlite XAD-7HP column for purification, and then Malvidin 3-O- Glucoside was prepared by PHPLC. The relative technical parameters were as follows: PREP-ODS(H)kit(5 μ m, 250 $\times$ 20 mm i.d.) column, mobile phase as H₂O/CH₃CN/MeOH, (A:80 /10/ 1.65, B:40 /50 / 1.05, v/v), determination wavelength as 535 nm, flow rate as 11 mL/min, sample injection volume as 100 μ L, and the gradient: 0 min, 0 %B; 10 min, 10 %B; 20 min, 30 %B; 25 min, 50 %B; 30 min, 0 %B. The results suggested that the purity of the product was 98.13 % and its analytic chromatogram and data were in accord with standard chromatogram and data by HPLC, UV and MS analysis.

Key words: wine; anthocyanins; extraction; HPLC

花色苷是葡萄酒中主要的呈色物质, 它对葡萄酒的感官品质和保健功能有重要影响。花色苷广泛存在于花、果实等植物细胞中, 使其呈现由红、紫红到蓝等不同的颜色。葡萄中的花色苷主要分布于果皮、果肉、葡萄籽、芽鳞片等器官中, 以果皮中的含量最高^[1]。葡萄果皮中的花色苷通过浸渍发酵, 可部分转移到葡萄酒中, 成为葡萄酒最主要的呈色物质^[2], 对葡萄酒的感官品质有重要影响。Richard 在 1987 年提出“法国悖论”之后, 对葡萄酒中多酚类物质的生理功能的研究发现,

葡萄酒中花色苷等多酚类物质具有预防心脑血管疾病、预防癌症等保健作用^[3-6]。目前, 已明确花色苷具有抗氧化、消除自由基、改善肝脏以及血清中的脂质、防止动脉硬化、抗变异原和抗肝炎及预防眼科领域疾病等功能^[7-8]。

探索 HPLC 分离纯化花色苷的条件和方法, 并研究利用葡萄皮制备二甲花翠素 3- O- 葡萄糖苷单体的工艺流程, 获得高纯度的二甲花翠素 3- O- 葡萄糖苷单组分物质, 为葡萄花色苷研究提供对照品。

基金项目: 科技部“科技成果重点推广项目计划”(2004EC000317)。

收稿日期: 2007- 09- 13

作者简介: 王华(1959-), 女, 山东人, 博士学历, 教授、博士生导师, 主要从事葡萄与葡萄酒研究。E-mail: wanghua@nwsuaf.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

赤霞珠(Cabernet-sauvignon)葡萄皮, 盐酸, 甲醇(分析纯), 色谱纯乙腈、甲醇 Amberlite XAD-7HP 大孔吸附树脂。

1.2 仪器

江苏 SP-KQ-300DE 数控型超声波清洗器; 制备型高效液相色谱仪: LC-6AD, 检测器 SPD-10Avp, 馏分收集器 FRC-10A, 色谱工作站; 真空抽滤器: Autoscience AP-9901S; 真空脱气机: Autoscience AS3120B; 纯水机: Water Millipore; 旋转蒸发仪; 真空冷冻干燥机; 离心管若干。

1.3 花色素苷提取

选用成熟度良好的赤霞珠葡萄皮, 以 1% 盐酸甲醇(v/v) 为提取剂, 提取条件为: 40℃ 水浴中超声波辅助提取, 提取时间 50 min, 料液比 1:7, 提取 3 次。将得到的花色素苷提取物用旋转蒸发仪于 35℃ 旋转蒸发至无有机相, 所得花色素苷溶液于 4℃ 保存备用^[8,13-15]。

1.4 花色素苷纯化

将旋转蒸发浓缩后的花色素苷溶液上 Amberlite XAD-7HP 大孔吸附树脂纯化。将经大孔树脂纯化后的花色素苷溶液用旋转蒸发仪于 35℃ 旋转蒸发至无有机相, 所得溶液经冷冻干燥机冻干后得到暗红色粉末状固体, 真空包装后低温避光保存^[16-17]。

1.5 花色素苷单体分离纯化

1.5.1 花色素苷单体的 HPLC 制备

色谱柱: PREP-ODS(H)kit 250×20 mm i.d., 粒径为 5 μm, 流动相为水/乙腈/甲酸(流动相 A 为 80/10/1.65; 流动相 B 为 40/50/1.05), 测定波长 535 nm, 流速为 11 mL/min, 室温, 进样量 100 μL, 梯度为: 0 min, 0%B; 10 min, 10%B; 20 min, 30%B; 25 min, 50%B; 30 min, 0%B^[8-9]。

1.5.2 花色素苷单体溶液冻干保存

将分离纯化后的花色素苷单体溶液用旋转蒸发仪于 35℃ 旋转蒸发至无有机相, 所得溶液经冷冻干燥机冻干后得到粉末状固体, 装入 2 mL 离心管后低温避光保存。

1.5.3 花色素苷单体经液相分析柱分析纯度

将收集的目标物质上分析柱, 用面积归一法计算其纯度, 检测其是否达到预期纯度。

1.5.4 HPLC 分析

称取 1 mg 将制备得到的单体冷冻干燥后得到粉末状固体, 加入 1 mL 色谱甲醇, 配置成 1 mg/mL 的二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷溶液, 高效液相分析, 观察色谱峰的出峰时间以及其光谱图。色谱条件如下:

色谱柱: PREP-ODS(H)kit 250×4.6 mm i.d., 粒径 5 μm, 流动相为水/乙腈/甲酸(流动相 A 为 80/10/1.65, v/v; 流动相 B 为 40/50/1.05, v/v), 测定波长

535 nm, 流速 1 mL/min, 室温, 进样量为 10 μL, 梯度为: 0 min, 0%B; 10 min, 10%B; 20 min, 30%B; 25 min, 50%B; 30 min, 0%B。

称取 1 mg 购自挪威的二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷标准品, 加入 1 mL 色谱甲醇, 配置成 1 mg/mL 的二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷溶液, 在最佳色谱分析条件下进行高效液相分析, 观察色谱峰的出峰时间以及其色谱图。色谱条件同上。

1.5.5 紫外光谱分析

取少量自制单体和二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷标准品分别配成甲醇溶液, 在 200~800 nm 扫描, 得到其紫外光谱图。

1.5.6 质谱分析

将自制的单组分物质溶于色谱甲醇中, 5~7 kV 氩原子流轰击, 进行质谱分析^[8-13,17]。

2 结果与分析

2.1 制备色谱图

图 1 为制备色谱条件下进样的色谱图。收集标号为 16 号的峰, 得到花色素苷单体组分。

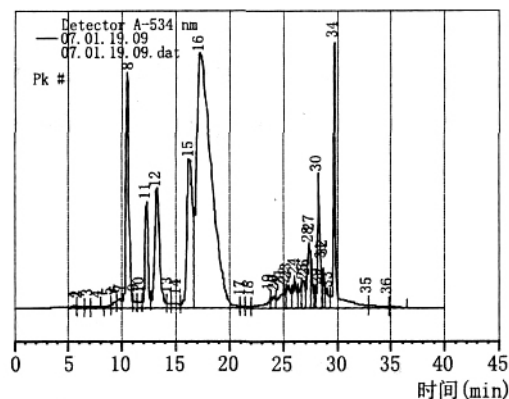


图 1 花色素苷制备色谱图

2.2 对所收集的单组分纯度检验

应用面积归一法, 计算出所得花色素苷单体纯度为 98.13%。

2.3 定性分析

图 2 和图 3 为购买标准品与自制对照品的色谱图。由图 2 和图 3 可知, 自制对照品与二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷标准品的出峰时间一致。初步推断, 自制物质为二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷。

2.4 紫外光谱分析(见图 4、图 5)

由图 4 和图 5 可知, 自制单体与二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷标准品的紫外光谱一致。

2.5 质谱分析(见图 6、图 7)

如图 6 所示, 正离子图中 492.82 的离子峰与二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷的分子量一致。在图 7 中, 组分子峰 $[M]^+m/z$ 为 492.69, 第一碎片峰 m/z 330.99, 质量差为 162, 推断出 m/z 330.99 为失去葡萄糖的碎片离子峰。

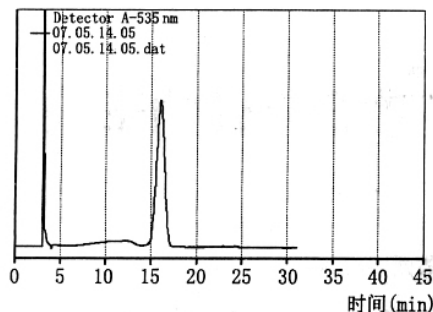


图2 自制单体分析色谱图

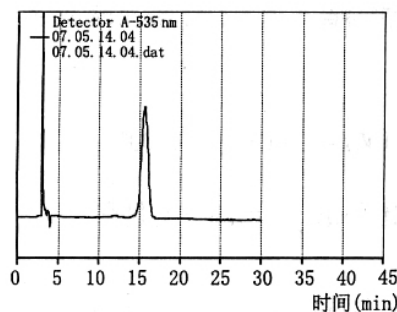


图3 标准品分析色谱图

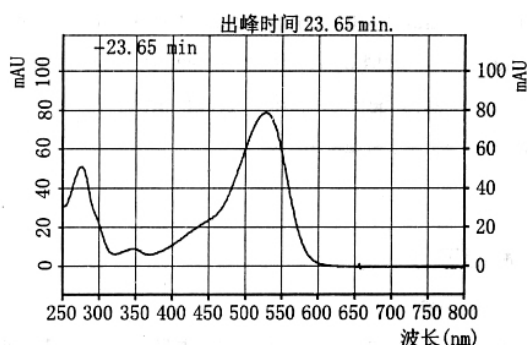


图4 自制单体光谱图

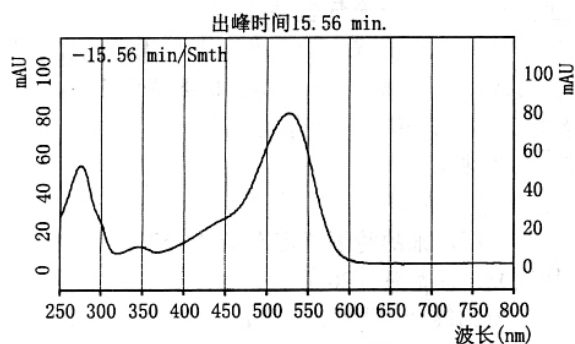


图5 标准品光谱图

[姜平等,2003; Markham K R,1982]。

3 结论

采用色谱柱: PREP- ODS (H)kit 250 ×20 mm i.d., 粒径 5 μm, 流动相为水 / 乙腈 / 甲酸 (流动相 A 为 80/10/1.65; 流动相 B 为 40/50/1.05), 测定波长 535 nm,

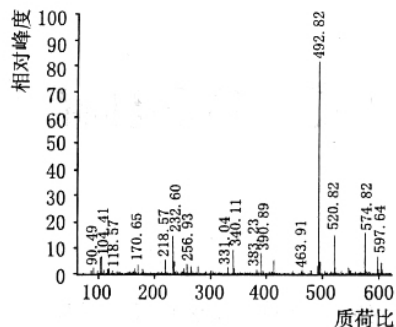


图6 质谱图

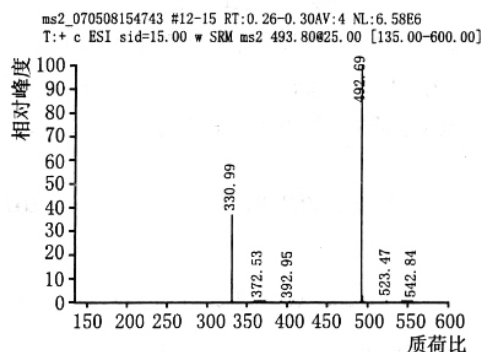


图7 质谱图

流速 11 mL/min, 室温, 进样量 100 μL, 梯度为: 0 min, 0 %B; 10 min, 10 %B; 20 min, 30 %B; 25 min, 50 %B 和 30 min, 0 %B, 制备二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷单体。对产品的纯度和结构分别进行了 HPLC 分析与 UV、MS 分析鉴定。结果表明, 单体纯度可达 98.13 %, 其分析图谱与数据同标准图谱及数据相一致。

参考文献:

- [1] 温普红, 王晓玲, 杨得锁. 葡萄籽中花色素的分离研究[J]. 精细化工, 2001, 18(4): 218-221.
- [2] 李华. 现代葡萄酒工艺学[M]. 西安: 陕西人民出版社, 2001.
- [3] 高尧来, 温其标, 张福艳. 葡萄酒中的多酚类物质及其保健功能[J]. 食品与发酵工业, 2002, 8(3): 124-128.
- [4] 陈曾三. 红葡萄酒多酚的保健功效[J]. 酿酒科技, 2001, 2(3): 77-79.
- [5] 齐慧, 葛毅轩, 战吉成. 多酚类物质与葡萄酒的保健作用[J]. 中国食品, 2006, 16(3): 122-123.
- [6] 刘树文, 李华, 房玉林. 葡萄酒的营养与保健[J]. 酿酒, 1999, 5(4): 40-42.
- [7] Bakker J and Timberlake C F. The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography [J]. J.Sci.Food Agric, 1985, 36: 1315-1324.
- [8] 韩富亮. 葡萄与葡萄酒花色素苷 HPLC 指纹图谱的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学葡萄酒学院, 2004.
- [9] Bakker J, Bridle P, Honda T et al. Identification of an Anthocyanin occurring in some red wines [J]. Phytochemistry, 1997, 44(7): 1375-1382.
- [10] Bridle P, C.F.Timberlake. Anthocyanins as natural food

(下转第 24 页)

0.01‰~0.05‰时,啤酒的色度呈逐渐上升的趋势,显示出此浓度下保质4个月时色度值达到5.468,6个月时为5.785,尽管超过了企标中高档啤酒的标准,但仍在普通酒的色度范围之内。植酸浓度为0.07‰时,护色效果最为理想,保质4个月、6个月的色度值分别降为5.032和5.328。但在浓度为0.09‰时,啤酒的色度又呈现出较缓的上升趋势,表明植酸的护色作用并不是完全取决于浓度的高低。

2.3 植酸在超高压条件下对啤酒色度的影响

为进一步考察植酸在超高压条件下对啤酒的协同护色作用,依据上述超高压及植酸单因素作用于啤酒的效果,确定了3因素3水平的正交实验,即压力分别为200 MPa、300 MPa和400 MPa,保压时间分别为5 min、10 min和15 min,植酸添加量分别为0.03‰、0.05‰和0.07‰。正交实验结果见表1。

表 1 正交实验结果

实验号	A	B	C	色度
1	1	1	1	4.267
2	1	2	2	4.318
3	1	3	3	4.286
4	2	1	2	4.280
5	2	2	3	4.270
6	2	3	1	4.280
7	3	1	3	4.229
8	3	2	1	4.274
9	3	3	2	4.242
K ₁	12.871	12.776	12.821	Σ=38.446
K ₂	12.830	12.862	12.840	
K ₃	12.745	12.808	12.785	
$\bar{K}_1$	4.290	4.259	4.274	
$\bar{K}_2$	4.277	4.287	4.280	
$\bar{K}_3$	4.248	4.269	4.262	
R	0.042	0.028	0.018	
主次顺序	A	B	C	
最佳条件	A ₃	B ₁	C ₃	

正交实验结果表明,最佳试验方案为A₃B₁C₃,在此条件下,啤酒的色度值最小,为4.229。各因素影响啤酒色度稳定性的主次顺序为:A>B>C。

3 结论

啤酒的色度随着压力的增高,呈现先是急剧上升而后平缓的下降趋势,保压时间延长,作用不显著但仍有下降,说明增大压力及延长保压时间对啤酒色度稳定性都有积极的作用。

啤酒添加植酸后的24 h内,由于植酸反应尚不完全,啤酒色泽有所加深,但在保质期中,植酸发挥了显著的护色效果。植酸浓度达到0.07‰时,啤酒的色度达到最小值。

超高压协同植酸作用对啤酒的护色效果优于单一的超高压处理和植酸处理。协同作用的最佳方案为:作用压力400 MPa,加压时间5 min,植酸浓度0.07‰。3个因素对啤酒色度的影响主次顺序为:压力大小>保压时间>植酸浓度。

参考文献:

[1] Beom Jun Lee and Deloy G. Hendricks. Phytic acid protective effect against beef rind muscle lipid peroxidation[J]. Journal of Food Science,1995(2): 241- 244.

[2] 赵玉生. 植酸在食品工业中的应用[J]. 西部粮油科技, 2000, (6): 51- 52.

[3] 柏冬. pH 值对植酸络合能力的影响[J]. 山东师范大学学报, 2004, (2): 104- 105.

[4] 陈复生, 张雪, 等. 食品超高压技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[5] Wolfgang Kunze., 湖北啤酒学校翻译. 啤酒工艺实用技术[M]. 北京: 轻工业出版社, 1998. 527- 528.

[6] 赵玉生, 于然. 啤酒保鲜的新技术——超高压[J]. 酿酒科技, 2007, (4): 46- 48.

[7] 赵玉生, 于然. 植酸的保鲜机理及应用[J]. 中国调味品, 2007, (3): 56- 58.

(上接第 21 页)

colours-selected aspects[J]. Food Chemistry,1997,58: 103- 109.

[11] Cantos E, Espín JC and Tomás-Barberá FA. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS[J]. J.Agric. Food Chem,2002,50: 5691- 5696.

[12] Fiorini M. Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins[J]. J. Chromatography A ,1995,692: 213- 219.

[13] Fossen T, Andersen M. Anthocyanins from red onion, Allium cepa, with novel aglycone[J]. Phytochemistry. 2003,62: 1217- 1220.

[14] Jean-Hugues R, Thénier P, Zech-Hanrot M et al. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography[J]. J.Chromatography A ,1997,763: 345- 352.

[15] Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P. et al. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia[J]. J.Agric.Food Chem, 1999,47: 4009- 4017.

[16] 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.

[17] Hong V, Wrolstad R E. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins[J]. J. Agric Food Chem, 1990,38(3): 708- 715.