

红葡萄酒中酚类化合物的快速高效液相色谱分析

M.Ibern-Gomez, et al 著,朱立红¹,赵荣华²,周洪福¹译

(1.张裕葡萄酒股份有限公司葡萄酒分公司 2.张裕集团技术中心,山东 烟台 264000)

摘要: 阐述了一种新型的可直接而快速分离红葡萄酒中酚类化合物(苯甲酸、黄烷-3-醇、肉桂酸、黄酮醇、花色素)的反相高效液相色谱法。采用的色谱柱可用于低 pH 环境且能高流速运行,在均含有 0.2% 三氟乙酸的水和乙腈两相中进行梯度洗脱。为了提高选择性,每种化合物都在其最大吸光度处被检测,从而建立其精密度、线性和灵敏度。尽管这种方法不能检测酒中所有组分,但适用于主要成分的测定和对特殊类别酚类化合物总量的定量分析。

关键词: 分析; 花色素; 儿茶酸; 直接进样; 类黄酮; 羟基肉桂酸; 液相色谱

中图分类号: O657.72; TS261.7; TS262.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2004)03-0089-02

Rapid HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Red Wines

By M. Ibern-Gomez, et al; Tran. by ZHU Li-hong et al.

(Zhangyu Wine Co.Ltd., Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: A new direct and rapid (18 min) reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the separation of phenolic compounds (benzoic acids, flavan-3-ols, cinnamic acids, flavonols and anthocyanins) in red wines is described. A column that allows for low pH conditions and high flow was used, with a gradient of two solvents: water and acetonitrile, both with 0.2% trifluoroacetic acid. To improve selectivity, each compound was monitored at its absorbance maximum. Precision, linearity, and sensitivity (limit of detection and limit of quantitation) were established. While this rapid method cannot resolve all wine constituents, it is appropriate for measuring major components and quantifying total amounts of particular classes of phenolic compounds. The method was applied to a set of new and aged red wines.

Key words: Analysis; anthocyanins; catechins; direct injection; flavonoids; hydroxycinnamates; liquid chromatography

用于检测和定量分析食品中的酚类化合物的分析方法已有很多。分析单体化合物应用最广泛的是高效液相色谱法,其色谱柱一般是用反相 C₁₈ 材料填充,洗脱系统一般是二元的,一种溶剂是被醋酸、高氯酸、磷酸、甲酸或三氟乙酸酸化的水溶液;另一种是有机溶剂如甲醇或乙腈,也可能用同一种酸来酸化。当然还有三元的、四元的体系。但是运行时间很长,一般需要 30~60 min 或更长,从而限制了所分析样品的数量。本文所述对红葡萄酒中酚类化合物(包括非羧基酚类、苯甲酸、黄烷-3-醇、肉桂酸、黄酮醇和花色素)的量化分析方法中,采用的是适合高流速和快速分析的色谱柱。

1 材料和方法

1.1 标样:没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯乙醇、儿茶酸、表儿茶酸、反式-咖啡酸、咖啡酰酒石酸、反式香豆酰酒石酸、芦丁、异鼠李素、栎精、3,5-二葡萄糖苷锦葵色素,纯度均高于 98%。

1.2 设备:Hewlett-Packard (HP/Agilent, Palo Alto, CA) 1100 梯度液相色谱,化学工作站 HP A.06.03(HP/Agilent), 1100M 数据自动处理系统,可限制进入检测器的流速为 1 ml/L 的微量分流阀, HP1100 自动进样器,二极管阵列检测器。

1.3 色谱柱:Zorbax SB C18 柱 (4.6mm×30mm), 粒径 3.5 μm, 柱温 30℃。

1.4 流动相:A 液 0.2% 三氟乙酸(TFA)的水溶液;B 液 0.2% 三氟乙酸的乙腈。洗脱梯度:B 液 0.5 min 时 0%, 2 min 时 2%, 8 min 时 8%, 15 min 时 15%, 18 min 时 23%, 20 min 时 0%, 在时间点间

用线性梯度。流速为 4 ml/min。三氟乙酸是分光光度计级,乙腈是高效液相色谱级。

1.5 样品准备:在用高效液相色谱分析前,所有样品和标样都要经过 0.45 μm 的直径为 13 mm 的 PTFE 类针头滤器(Gelman/Pall Life Science, Ann Arbor, MI)过滤,可保证标样无任何损失。进样体积为 10 μl。

2 结果与讨论

从红葡萄酒中完美的分离、鉴别和定量出了 18 种酚类化合物(见图 1)。这些化合物来自于不同组的酚类(数字表示所鉴别出的峰)。

非羧基酚类:对羟基苯乙醇(3);

苯甲酸类:没食子酸(1)和原儿茶酸(2);

羟基肉桂酸及其酯类:反式-咖啡酸(7),咖啡酰酒石酸(6),反式香豆酰酒石酸(8)和绿原酸(9);

黄烷-3-醇类:儿茶酸(4)和表儿茶酸(5);

黄酮醇类:3-葡萄糖苷酸栎精(10),异鼠李素(11)和栎精(12);

花色素类:3-葡萄糖苷翠雀花色素(13),3-葡萄糖苷矮牵牛花色素(14),3-葡萄糖苷牡丹色素(15),3-葡萄糖苷锦葵色素(16),6-乙酰-3-葡萄糖苷锦葵色素(17)和(6-香豆酰)-3-葡萄糖苷锦葵色素(18)。

2.1 色谱柱和流动相:可高流速运行短柱的使用能改进运行时间

收稿日期:2003-08-21

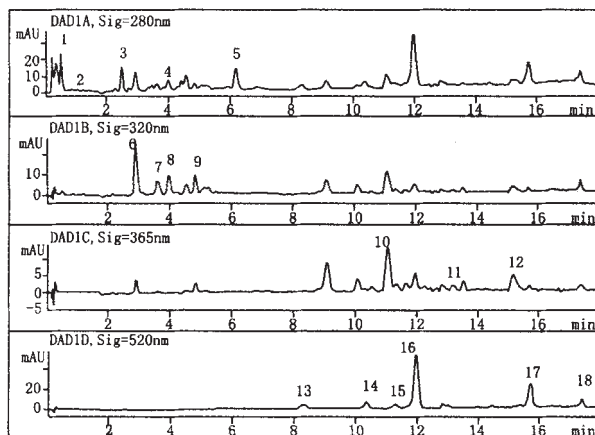


图1 新红酒色谱图

和色谱峰的分度。花色素是红葡萄酒颜色的来源,在 pH 值接近于 1.5 时可有效分离。因此,SB C18 柱采用能在如此低 pH 条件下性能稳定的硅烷来填充。在具有复杂酚类成分的新酒中做不同流动相、洗脱梯度、pH 值和流速等方面的实验。

通过不同流速 (1 ml/min, 2 ml/min, 3 ml/min, 4 ml/min) 进行测试,确定出可获得最佳分离度的最适宜的流速为 4 ml/min。接下来是对 3 种溶剂 (水, 甲醇和乙腈) 进行实验,它们均含有 0.02 % 三氟乙酸。有机溶剂在持续使用的情况下,使用甲醇产生的峰比使用乙腈所产生的峰要宽,因此,甲醇被淘汰。三氟乙酸的百分数提高 10 倍可提高花色素峰的分度。因此,采用两种溶剂:A 液为 0.2 % 三氟乙酸的水溶液,B 液为含 0.2 % 三氟乙酸的乙腈。调整梯度来分离尽可能多的酚类化合物,在 18 min 内将 18 种不同的峰分离开来。

2.2 峰的鉴别:色谱峰通过二极管阵列检测器来检测,通过对外标色谱的保留时间的对比来鉴定。芦丁在葡萄或葡萄酒中并不存在,而用它的标样来鉴别 3-葡萄糖苷鞣精是因为它们有相同的保留时间。花色素峰主要是通过 520nm 波长下的吸收峰来鉴别。

表 1

灵敏度、精度数值

| 化合物 | | 灵敏度 | | 精度(n=6) | | | |
|--------------------|-------------------|--------------|------|----------------|---------|----------|---------|
| | | (mg/L)(n=10) | | 保留时间(min) | | 浓度(mg/L) | |
| | | 检测限 | 定量限 | T _R | 变异系数(%) | C | 变异系数(%) |
| 非羧基酚类 | 对羟基苯乙醇 | 0.3 | 0.9 | 2.4 | 0.7 | 56.0 | 1.8 |
| | | | | | | | |
| 苯甲酸类 | 没食子酸 | 0.4 | 1.3 | 0.5 | 0.3 | 15.9 | 4.6 |
| | 原儿茶酸 | 0.1 | 0.4 | 1.0 | 0.2 | 3.1 | 1.4 |
| 羟基肉桂酸 | 咖啡酰酒石酸 | 0.2 | 0.8 | 2.7 | 0.7 | 16.7 | 5.5 |
| | 反式-咖啡酸 | 0.2 | 0.6 | 3.4 | 0.7 | 7.3 | 4.4 |
| | 反式香豆酰酒石酸 | 0.3 | 1.0 | 3.7 | 0.5 | 9.1 | 4.2 |
| | 绿原酸 | 0.2 | 0.8 | 4.8 | 0.6 | 6.5 | 5.4 |
| | | | | | | | |
| 黄烷-3-醇类 | 儿茶酸 | 0.1 | 0.5 | 3.5 | 0.7 | 15.7 | 5.9 |
| | 表儿茶酸 | 0.5 | 1.8 | 6.3 | 0.1 | 69.7 | 5.4 |
| 黄酮醇类 | 3-葡萄糖苷鞣精 | 0.2 | 0.7 | 10.9 | 0.3 | 15.2 | 1.7 |
| | 异鼠李素 | 0.2 | 0.7 | 13.2 | 0.3 | 2.8 | 4.1 |
| 花色素类 | 栲精 | 0.2 | 0.7 | 15.5 | 0.3 | 7.5 | 2.4 |
| | | | | | | | |
| | 3-葡萄糖苷翠雀花色素 | 0.3 | 0.9 | 8.2 | 0.5 | 28.9 | 2.3 |
| | 3-葡萄糖苷矮牵牛花色素 | 0.3 | 0.9 | 10.2 | 0.6 | 28.6 | 4.0 |
| | 3-葡萄糖苷牡丹色素 | 0.2 | 0.7 | 11.1 | 0.3 | 17.7 | 4.0 |
| | 3-葡萄糖苷锦葵色素 | 0.1 | 0.5 | 11.9 | 0.4 | 216.9 | 1.0 |
| | (6-乙酰)-3-葡萄糖苷锦葵色素 | 0.2 | 0.8 | 16.3 | 0.2 | 88.0 | 2.9 |
| (6-香豆酰)-3-葡萄糖苷锦葵色素 | 0.3 | 1.0 | 17.7 | 0.2 | 35.4 | 4.3 | |

表 2 运用本方法在 6 种红酒中测出的酚类化合物的浓度范围

| 化合物 | 浓度范围 (mg/L) |
|---------|-----------------------------|
| 非羧基酚类 | 对羟基苯乙醇 25.9~56.8 |
| 苯甲酸类 | 没食子酸 16.3~72.9 |
| | 原儿茶酸 3.0~9.6 |
| 羟基肉桂酸 | 咖啡酰酒石酸 12.9~34.3 |
| | 反式-咖啡酸 5.5~11.8 |
| | 反式香豆酰酒石酸 6.1~22.2 |
| | 绿原酸 3.1~6.6 |
| 黄烷-3-醇类 | 儿茶酸 14.9~57.5 |
| | 表儿茶酸 20.7~85.6 |
| 黄酮醇类 | 3-葡萄糖苷鞣精 0.2~1.5 |
| | 异鼠李素 0.2~2.8 |
| | 栲精 1.3~10.7 |
| 花色素类 | 3-葡萄糖苷翠雀花色素 7.6~36.7 |
| | 3-葡萄糖苷矮牵牛花色素 5.4~38.0 |
| | 3-葡萄糖苷牡丹色素 6.1~37.5 |
| | 3-葡萄糖苷锦葵色素 86.5~220.0 |
| | (6-乙酰)-3-葡萄糖苷锦葵色素 18.1~98.8 |
| | (6-香豆酰)-3-葡萄糖苷锦葵色素 6.7~43.1 |

2.3 峰的定量:鉴定出的酚类化合物浓度是用外标所做的曲线来计算的。校正曲线是由测定标准的吸光度面积对其浓度来绘制完成,但咖啡酰酒石酸、反式香豆酰酒石酸和绿原酸是以反式咖啡酸为标准来定量的,3-葡萄糖苷鞣精是以栲精为标准来定量的,所有的花青素都是以 3,5-二葡萄糖苷锦葵色素为标准来定量的。

2.4 方法的选择性:为了提高选择性,每组酚类化合物都在其最大吸光度处测定,280 nm 处为非羧基酸、苯甲酸和黄烷-3-醇,320 nm 处为羟基肉桂酸及其酯,365 nm 处为黄酮醇,520 nm 处为花色素。图 1 显示了同一种红酒在不同波长下的色谱图。

2.5 精度:通过保留时间和峰面积两个参数来研究精度。变异系数的值以百分数形式表示。所有峰的保留时间的变异系数值都小于 0.7 %,化合物峰浓度的变异系数从 1 % 到 6 % (见表 1)。

2.6 线性:标准曲线的线性是为了研究标准的可用性。线性是用相关系数 r 表示的,由积分的峰面积 (时间×吸光度, mAU) 对标准浓度 (mg/L) 作图。根据红葡萄酒中的这些化合物含量的多少,在一个宽的浓度范围内获得这些方程式。建立了线性方程,线性令人满意 ($r > 0.999$)。

2.7 灵敏度:通过 USP XXIII 核准的运行 10 个空白的方法来对每一种酚类化合物的检测限和定量限进行计算。量的变化范围在 0.4~1.8 mg/L 之间。

2.8 样品结果:通过这种方法分析了加利福尼亚和 Penedès 的 6 种新酒和陈酿的红葡萄酒。测定数值的

(下转第 92 页)

技术室主任,主持总结技术工作。通过近一年细微的查定,出色地完成了以下任务。

1.1 系统整理出“泸州老窖大曲酒操作法”300多年历史演变,针对传统操作,进行了系统整理。系统整理泸州老窖大曲酒传统操作法及制曲工艺,使之规范化、系统化,便于学习推广。

1.2 用常规方法对“泸州老窖大曲酒”进行较全面的分析,从而对传统操作法有更深的认识;用生物化学、微生物发酵、有机化学等方面有关理论进行高度概括与总结。

1.3 在深度认识传统操作法的基础上,通过试验,反复进行对比,去伪存真,去粗取精,继承传统,建立“新型的泸州老窖大曲酒操作法”,其中“熟糠拌料”、“量水用量”、“麦曲用量”、“入窖温度”、“回酒入窖”、“踩窖”、“窖窖”、“窖帽高低”、“延长发酵周期”、“截头去尾”、“原度酒加浆”、“不同容器贮酒对酒质的影响”、“贮存试验”、“麦曲制造”等14个方面,分别试验,均与传统方法进行对比,经过分析,确定最佳工艺条件,使产品质量进一步提高。

1.4 写出了“泸州老窖大曲酒提高质量的初步总结”及“泸州老窖大曲酒”一书,该书于1959年由轻工业出版社出版发行。

1958年泸州老窖大曲酒的查定总结,为确定“泸州老窖大曲酒”为我国浓香型酒的典型代表提供了充分的科学依据。

泸州老窖大曲酒之所以饮誉中华,蜚声海外,其“老窖”、“万年糟”、“传统操作”是精华所在。

2 400年老窖是造就泸州老窖大曲酒独特风味的基础

座落在泸州营沟头的温永盛老窖,其基地是优质黄泥,就地挖坑建成,因土质独特,无需采取防漏措施,即可保住“黄水”,为泸州老窖大曲酒独特风味的形成奠定了基础,提供了先决条件。泸州传统窖池的建造是在黄泥基地挖坑或在基地上用纯黄泥筑窖埂(窖壁),然后在窖墙内钉以楠竹制成的竹钉,再用优质黄水踩柔熟的黄泥搭于窖墙,厚8cm,窖底亦用此泥夯紧,厚约20cm。泸州温永盛老窖(400年)据1958年查定,其容积为7.99m³(口长2.45m,底长2.05m,口宽2.07m,底宽1.67m,深1.9m)。新建成的窖池经酿造7~8个月,黄泥由黄色转为乌色。约再经一年半的时间,又逐渐转为乌白色,并变绵软为脆硬,酒质亦随着时间的延长和泥质的转变而逐渐提高。再经20余年,泥质又由脆硬逐渐变得又碎(无粘性)又软,泥色由乌白转为乌黑,并出现红绿等彩色,产生一种浓郁的香味,这就初步达到“老窖”的标准,酒质也随之显著提高。此后年复一年,越来越好。温永盛400年老窖数百年来经母糟、黄水、微生物的连续长期作用,从未间断,以致离窖窖1m多远的泥土都是芳香扑鼻,沁入心肺,所产之酒质地优美,无可比拟。

正是由于老窖对酒质有决定性的影响,所以工人对这份珍贵的民族遗产——老窖,无不倍加爱护。无论出窖、装窖、滴窖、舀黄水等操作都特别小心,避免伤及窖泥。万一年久泥碎,窖壁松坍,或不小心碰掉,必须整补时,必将就老窖窖泥内加入少量新泥来整补,这样整补过的窖,影响不大,容易恢复。

泸州温永盛400年老窖为什么出好酒,一直是个谜。经现代检测技术和生物技术发现,老窖与新窖的窖泥差异悬殊。

泸州温永盛400年老窖与新窖有显著区别。老窖泥为酸性,氨态氮为新泥的14倍、腐殖质为新泥的8.7倍、有效磷为新泥的9.1

倍,这是窖泥微生物长年累月栖息和母糟黄水作用之结果。从微生物检测结果可见,老窖和新窖窖泥微生物数量和类群有显著差异,充分表明浓香型曲酒的老窖是嫌气细菌,特别是嫌气芽孢杆菌的主要栖息地,这是泸型酒老窖窖泥的独特的微生物学特征。温永盛老窖是浓香型曲酒窖泥微生物的宝库,有待进一步发掘和开发。

20世纪80年代以来,通过对老窖窖泥微生物的进一步研究,发现窖泥中的甲烷菌、甲烷氧化菌等窖泥功能菌,随窖龄不同而相差悬殊。

3 400年老窖发酵期较短,酒中总酯不高但酒质极其优美丰满

泸州老窖大曲酒传统发酵周期较短,1958年查定时发酵周期也只有30~45d,所产之酒与众不同。

泸州温永盛大曲酒发酵期不长,酒中总酯不高,酒质具有“醇香浓郁,清冽甘爽,饮后尤香,回味悠长”的独特风格,尤以“回味悠长”著称于世。南洋鉴赏家认为:“在长年溽暑的南洋地方,在泸州老窖大曲酒内和以少许冰块饮用,香沁脾胃醇酣肌肉,薰薰然妙不可言”。可见泸州老窖之特殊魅力。泸州温永盛大曲酒之所以酒质优美丰满,回味悠长,与“老窖”和“万年糟”密切相关。“万年糟”是在本窖内长期循环使用的母糟(酒醅)。温永盛老窖因时代久远,母糟在窖内循环使用的时间亦随之增长,糟经数百年的循环使用,其中富含生香的前体物质和有利于浓香型大曲酒微生物生长繁殖产香的微量物质,故酒虽总酯不高,但因微量成分极其丰满、协调,使之“回味悠长”,这是泸州老窖独到之处。

4 泸州老窖大曲酒的传统操作,堪称浓香型曲酒操作之典范

泸州老窖大曲酒是我国浓香型白酒的典型代表,它的传统操作广为传颂,综观正式出版的教科书、专著,凡涉及浓香型白酒的操作,均以泸州老窖大曲酒传统操作为典范,这些资料均是1957年和1965年查定总结的文献资料。

1957年,泸州老窖大曲酒总结委员会对泸州老窖大曲酒的传统操作中的关键技术进行了分析研究,用大量的数据在科学上加以肯定。其中对“熟糠拌料”、“回沙发酵”、“窖帽高低”、“清烧与混烧蒸酒”、“发酵周期”、“原度酒与加浆酒”、“加浆用水”、“贮存期”、“酿造用水”等进行了对比试验。肯定了传统操作中之“混蒸续糟发酵”、“熟糠合料”、“滴窖勤舀”、“低温入窖发酵”、“截头去尾”、“量水用高温”、“踩窖”的精神实质。

已故“川酒泰斗”,著名酿酒专家陈茂椿教授将泸州大曲酒传统操作的关键概括为“稳、准、匀、适、勤”。“稳”是操作要稳、配料要稳;“准”是配料要准、温度要看准;“匀”是拌料要匀、打量水要匀、上甑要轻撒匀铺、撒曲要匀、入窖温度要匀;“适”是配料要适当、量水要适当、入窖条件要适当、蒸粮要适当、窖帽要适当、踩窖要适当、截头去尾要适当;“勤”是滴窖要勤舀、烧火要勤(指大火控制,用蒸汽亦如此)、卫生要勤、清窖要勤。“五字真经”是浓香型曲酒传统操作之精髓。传统操作至今仍在全国浓香型酒厂视为至宝,不敢轻易改动。

泸州老窖大曲酒因有“老窖”、“万年糟”、“老操作”,是极其珍贵的民族遗产,真不愧为国之瑰宝。●

复杂酚类样品的高压液相色谱分析比较耗时,如能适当分离,将是一个比较快速而有价值的方法。这一新程序具有快速的特点,给酒中大多数酚类化合物的分析提供了好的方法,有利于大量样品的快速分析。

译自 Am. J. Enol. Vitic. 2002,53,(3):218-221.

(上接第90页)

范围见表2。这些样品被保存在充有氮气的空气中以避免被氧化。这些数值同别处商用酒所报道的数值相近。这种方法快速而精确,适用于红葡萄酒中大多数酚类化合物的常规分析。

3 总结