

HPLC 检测葡萄酒中有效成分的研究进展

康俊杰 李 艳

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北 石家庄 050018)

摘要: HPLC 技术在葡萄酒中有效成分的检测试验中,应用广泛。论述了应用 HPLC 检测葡萄酒中的有机酸、酚类物质的研究进展,阐述了白藜芦醇、花色苷的 HPLC 的检测方法。

关键词: 分析检测; 葡萄酒; HPLC; 有机酸; 酚类物质

中图分类号: TS262.6; TS261.7; O657.7

文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2009)09-0112-04

Research Progress in the Determination of Effective Constituents in Grape Wine by HPLC

KANG Jun-jie and LI Yan

(College of Bioscience and Biotechnology of Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: HPLC (high performance liquid chromatography) was widely applied in the detection of the effective constituents in grape wine. In this paper, the research progress in the detection of organic acids and phenols in grape wine by HPLC was elaborated. In terms of phenols, the detection methods of resveratrol and anthocyanin by HPLC were mainly introduced in detail.

Key words: analysis and determination; grape wine; HPLC; organic acids; phenols

2008年12月8日,美国俄亥俄州立大学在全美神经学年会上发表了一项最新研究成果显示,红葡萄酒中的有效成分可以促进脑细胞的形成,防止大脑老化。同年12月9日哈佛大学公布的研究结果显示,红葡萄酒中的有益成分可以延长人类寿命。随着现代人健康消费意识的提高,葡萄酒有效成分的检测迫在眉睫。高效液相色谱(HPLC)应用于葡萄酒中有机酸、酚类物质、生物胺等的检测已被肯定。与化学方法检测相比,此方法快捷、精确、应用范围广。

1 葡萄酒中的有效成分

葡萄酒含有的有效成分包括:有机酸、糖类、含氮类化合物和较多的抗氧化剂,如酚和多酚化合物、鞣酸、黄酮类物质等,能消除或对抗氧自由基,有助于抗衰老以及预防各类疾病。白藜芦醇作为葡萄酒中的功效成分,具有抗氧化功效,是葡萄酒中的一种重要的植物抗毒素。葡萄酒中还含有丰富的原花青素,有效降低血胆固醇、防止动脉粥样硬化,还能抑制血小板的凝集、防止血栓形成、预防中风。

2 HPLC 检测葡萄酒中有效成分的研究进展

2.1 有机酸检测方法的研究

收稿日期:2009-05-25

作者简介:康俊杰(1985-),在读硕士研究生。

通讯作者:李艳,教授,主要从事发酵工程技术研究。

低分子量的有机酸类化合物是葡萄酒的重要组成部分。在葡萄浆果中最主要的有机酸有酒石酸、苹果酸和柠檬酸^[1-3],而在葡萄酒生产过程中(酒精发酵、苹果酸-乳酸发酵、乙醇氧化、酒的成熟过程等)会产生乳酸、琥珀酸、醋酸等^[2-3]。其中,醋酸在葡萄酒酿造或贮存过程中的晴雨表表明^[4],其含量超过1g/L就意味着葡萄酒有染菌的可能性^[5]。酒石酸又称葡萄酸,是葡萄酒中最强的有机酸,占葡萄酒总酸的1/4~1/3^[6-7]。利用常规分析方法检测葡萄酒中各种有机酸的含量操作过程繁琐,因此建立有机酸的HPLC测定方法,对于准确分析葡萄与葡萄酒中各阶段有机酸的含量具有重要意义。

早在1995年TETSURO MAGARIFUCHI等人就开始用HPLC法检测葡萄酒中的乳酸、富马酸、琥珀酸^[8]。1998年,M.Lourdes Morales等人用离子排斥色谱法在等梯度条件下检测葡萄酒中的酒石酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸和醋酸,流动相硫酸水溶液的流速是0.5 mL/min,实验用UV检测器,波长214 nm^[9]。2006年,孙喜房等人研究了快速测定葡萄酒中有机酸的HPLC法,其最佳条件是:色谱柱 Aminex HPX-87H 柱(300 mm×7.8 mm),流速0.6 mL/min,进样体积10 μL,检测波长210 nm,柱温为55℃,流动相0.005 mol/L 硫酸溶液与去离子水的配

比为90:10^[6]。2007年,吴永平等利用HPLC-CL柱后同时检测葡萄酒中的有机酸,基于在酸性介质中高锰酸钾直接氧化柠檬酸、苹果酸和琥珀酸产生化学发光,而盐酸氨基脲能够显著增强该体系的发光强度,建立了反相高效液相色谱分离柱后化学发光检测柠檬酸、苹果酸和琥珀酸的方法,并成功应用于葡萄酒中有机酸的测定^[10]。2009年,A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós等人,在检测有机酸时用一种新的色谱柱TEKNOKROMA:Tr-010065 Mediterranea sea₁₈(15 cm×0.4 cm, i.d. 3 μm),流动相为0.1% (v/v)的甲酸溶液。检测结果优于传统的ODS₂色谱柱^[11]。2009年,Orawan Kritsunankul等人采用HPLC结合流动注射在线透析法检测葡萄酒中的有机酸,液相系统采用的是反相C₁₈的色谱柱,UV检测器的波长是210 nm^[12]。

2.2 多酚化合物检测方法的研究

2.2.1 白藜芦醇

白藜芦醇以游离态(顺式、反式)和糖苷态(顺式、反式)两种形式存在^[1]。顺式白藜芦醇是一种植物抗毒素,对人体低密度脂蛋白(LDP)有抗氧化作用。葡萄浆果中本身不含有反式白藜芦醇,但在葡萄酒检测中能检测到此物质及其糖苷态。所以反式白藜芦醇很有可能是顺式白藜芦醇在葡萄酒酿造过程中转化成的异构体^[13]。白藜芦醇在葡萄酒中的含量根据葡萄酒的酒种、葡萄品种、产地的不同而存在着很大的差异^[1]。需建立葡萄酒中白藜芦醇的快速分析测定方法,对研究葡萄酒的药用价值、酿造工艺及葡萄酒的鉴别、葡萄酒质量等级划分具有重大意义。

1999年,国内开始采用HPLC法测定葡萄酒中白藜芦醇(T-RESVERATROL)的含量。葡萄酒样品经0.45 μm超滤后可直接进样测定,采用乙腈-水流动相进行1:9~9:1梯度洗脱,在波长306 nm下检测^[14]。2002年,管锡建等人采用HPLC直接进样快速测定葡萄酒中白藜芦醇及其甙的方法,分析条件为:色谱柱为Lichrospher C₁₈(5 μm 4.6 mm×150 mm),流动相为乙腈:0.1%冰乙酸为20:80(v/v),流速1.6 mL/min,检测器是紫外306 nm,室温条件,进样量20 μL^[15]。2004年,Irena Kolouchova-Hanzlikova等人应用电化学的HPLC法检测白藜芦醇,实验用的等度洗脱条件,0.75 V的玻璃电极电化学检测器^[16]。2008年Pilar Vinas等人的样品前处理采用的是固相萃取装置(DI-SPME),最优的萃取条件是搅拌时加入5%(m/v)氯化钠溶液和pH为6,0.07 mol/L的醋酸缓冲液,在40℃下萃取30 min^[17]。

2.2.2 花色苷

花色苷是一类水溶性植物色素,多以糖苷(花色苷)

的形式存在于植物细胞液中,构成花、果实、茎和叶的五彩缤纷的色彩。所有的花色苷和花色苷都是2-苯基-苯并吡喃阳离子的结构衍生物^[1]。花色苷具有强抗氧化性,有抗癌、抗动脉硬化的作用,其对人体的保健作用越来越受到人们的重视。葡萄酒中花色苷含量的多少不仅是影响其外观色泽的重要因素,也是其保健价值高低的一个指标,因此,精确测定果实中花色苷含量具有重要意义。

2000年,Balint Berente等人采用一种对pH稳定的固定相来检测葡萄酒中的花色苷类物质^[18]。2005年,王华等人HPLC检测花色苷的色谱条件是:分析柱Shim-Pack VP-ODS 250 mm×4.6 mm i.d.,预柱10 mm×4.6 mm i.d.,检测波长518 nm,进样体积20 μL^[19]。2008年,王贞强等人检测葡萄酒中花色苷,色谱条件:波长535 nm,流速1 mL/min,柱温30℃,进样体积20 μL;流动相:水/乙腈/甲酸A=80/10/7,B=40/50/7;梯度:0 min,0%B;15 min,30%B;25 min,50%B;30 min,0%B;35 min,0%B^[20]。2009年,Noelia Lo'pez等人在进行花色苷检测时采用脉冲电场处理花色苷等物质,脉冲条件为5 kV/cm,2.1 kJ/kg^[21]。2009年,André de Villiers等人在进样前首先采用1.7 μm的微孔过滤膜,大大减少其他杂质的影响。同时率先采用高温液相套色版(HTLC)来增加物质间转化反应的动力^[22]。

2.2.3 其他酚类物质

葡萄酒中除了白藜芦醇和花色苷等酚类物质,还含有单体酚即酚酸类、聚合多酚、单宁和黄酮类等成分。酚酸又分苯酸和苯丙烯酸两大类,聚合多酚是中间物质,随着多酚的逐渐聚合,形成复杂的聚合物。相反通过解聚,又会形成相应的酚酸。葡萄酒中的聚合多酚为黄烷醇类化合物,可分为儿茶素和原花色苷两大类。单宁是一类特殊的酚类物质,是由一些非常活跃的基本分子通过缩合和聚合作用形成^[1]。单宁在食品中可引起涩感。作为葡萄酒中最重要的活性物质,多酚类化合物还具有多种令人瞩目的生理功能。

1995年,Lab. Fitoquímica等人采用HPLC检测葡萄酒中无色多酚类物质,ODS-Hypersil反相柱,柱温为40℃,流动相0.6%的高氯酸和甲醇,流速0.3 mL/min,采用线性梯度洗脱,实验开始为2%的甲醇,60 min后结束,甲醇达到62%^[23]。2000年,Eugenio Revilla等人针对葡萄酒中无色多酚的液相检测,率先应用二元梯度和光电二极管阵列检测器。此方法比三元梯度操作简便^[24]。2008年Zdeněk Spáčil等人在检测酚类物质时,使用了两个新的色谱柱,检测到了34种酚类物质。其色谱填充颗粒都在2 μm以下,粒径分别为1.7 μm、1.8 μm。此方

法属于超高效色谱技术(UPLC),在液相色谱的基础上提高了柱子的承受压力,减少操作时间和样品的用量^[25]。2009年,Paola Dugo等人采用综合二维液相色谱方法对酚类物质的目的峰进行二维检测和量化。此方法能减少流动相对检测目的峰的干扰^[26]。2009年,María-Pilar Sáenz-Navajas等人采用了毛细管电泳和超高效液相色谱联用检测羟基肉桂酸和二甲花翠素单糖苷类衍生物。实验对两种物质及其衍生物的化学结构和稳定性进行了测定^[27]。

2.3 糖类、含氮物质、醛类物质检测方法的研究

糖类、含氮化合物等也在葡萄酒的色泽和口感方面起了重要的作用。糖类是葡萄酒中酒精发酵的基质,也是葡萄酒中重要的呈味物质。含氮化合物既是酿酒酵母的营养源,又是葡萄酒发生病害的前体物质,同时也是葡萄酒发生沉淀的主要原因之一。醛类物质是橡木桶在烘烤操作过程中(木质素被破坏)形成的。均匀的烘烤会使木头原料产生具体的特点变化,而这些特点可使葡萄酒获得具体的香气。

早在1998年,Magdalena Lo'pez-Barajas等人应用改进的粒子排斥高效液相色谱检测葡萄酒中的多聚糖类物质。样品在进入HPLC色谱柱之前,采用了阳离子交换柱来达到NCPS和CPS多聚糖的分离。实验数据处理采用Hewlett-Packard二极管阵列分光光度计结合89531A UV-Vis软件^[28]。2005年,李志军等人建立葡萄酒中多组分生物胺的柱前衍生反相高效液相色谱-荧光/紫外串联检测器的测定方法。实验以正丁醇/氯仿(1:1)为萃取液提取葡萄酒中的生物胺,丹磺酰氯为衍生剂,1,7-二氨基庚烷为定量内标,采用C₁₈色谱柱分离,甲醇/水为流动相梯度洗脱,流速1×5 mL/min,紫外检测波长254 nm,荧光激发波长(Ex)350 nm,发射波长(Em)520 nm^[29]。2006年,Angela Alca'zar等人对酒精类饮品中的2-糠醛和5-羟甲基-2-糠醛进行了测定。这两种醛主要在蒸馏和橡木贮存过程中产生的。实验采用的是AC-18的色谱柱,流动相为乙腈水溶液,在等度条件下进行洗脱,检测波长为280 nm^[30]。

3 小结

随着现代色谱检测技术的迅猛发展,使用HPLC来检测葡萄酒中有效成分已经普及,越来越多的科学研究采用质谱联用、两个色谱柱的串联结构、毛细管电泳技术与HPLC的联用还有最新采用的超高效液相色谱技术(UPLC)等等。在样品前处理方面的新方法、新技术也在不断发展,如固相微萃取、超声波过滤等技术。所以说检测葡萄酒中的有效成分时,HPLC技术起着至关重要的

作用。

参考文献:

- [1] 李华,王华,袁春龙,等.葡萄酒化学[M].北京:科学出版社,2005.30-36.
- [2] Orawan Kritsunankul, Benjaporn Pramote, Jaroon Jakmune. Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine[J]. Talanta.2009.1-8.
- [3] R.G. Peres, E.P. Moraes, G.A. Micke, F.G. Tonin, M.F.M. Tavares, D.B. Rodriguez-Amaya. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection[J]. Food Control.2008.1-5.
- [4] BoultonRB, SingletonVL, BissonLF, et al, 赵光鳌译.葡萄酒酿造学-原理及应用[M].北京:中国轻工业出版社,2001.
- [5] R.G. Peres, E.P. Moraes, G.A. Micke, edc. Rapid method for determination of organic acids in wine by capillary electroresis with indirect UV detection[J]. Food Control. 2008.
- [6] 孙喜房,李春,武占省,等.HPLC测定葡萄酒中有机酸方法的研究[J].石河子大学学报(自然科学版),2006,(6):728-731.
- [7] 李君霞,都振江.HPLC法测定葡萄酒中的有机酸[J].中外葡萄与葡萄酒,2007,(6):51-52.
- [8] TETSURO MAGARIFUCHI, KUNIASU GOT0, YUZURU IIMURA, MAKOTO TADENUMA, edc. Effect of yeast fumarase gene (FUM1) disruption on production of malic, fumaric and succinic-acids in sake mash[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 4: 355-361.
- [9] M.Lourdes Morales, A.Gustavo Gonzalez, Ana M.Troncoso. Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars[J]. Journal of Chromatography A 1998, (822): 45-51.
- [10] 吴永平,高智席,王满力.HPLC-CL柱后同时检测葡萄酒中的有机酸[J].酿酒科技.2007,(1):99-101.
- [11] A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, M.A. Lage-Yusty, J. López-Hernández. HPLC analysis of organic acids using a novel stationary phase[J]. Talanta, 2009, (78): 643-646.
- [12] Orawan Kritsunankul, Benjaporn Pramote, Jaroon Jakmune. Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine[J]. Talanta.2009.
- [13] Vassilis G. Dourtoglou, Dimitrios P. Makris, Fabienne Bois-Dounas. Trans-resveratrol concentration in wines produced in greece[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 1999, (12): 227-233.
- [14] 王华,尉亚辉,王庆俐,等.葡萄酒中白藜芦醇的HPLC测定[J].西北农业大学学报,1999,(4):83-87.
- [15] 管锡建,马佩选,刘建华.直接进样快速测定葡萄酒中白藜芦醇及其甙的HPLC方法[J].中外葡萄与葡萄酒,2002,(4):60.
- [16] Irena Kolouchova-Hanzlikova, Karel Melzoch, Vladimir Filip, Jan Smidrkal. Rapid method for resveratrol determination

- by HPLC with electrochemical and UV detections in wines[J]. Food Chemistry, 2004, (87): 151-158.
- [17] Pilar Vin as, Natalia Campillo, Monica Hernandez-Pe'rez. A comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, (611): 119-125.
- [18] Ba?lint Berente, Demetrio De la Calle Garc??a, Manfred Reichenba" cher, edc. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods[J]. Journal of Chromatography A, 2000, (871): 95-103.
- [19] 王华,韩富亮.用 HPLC 分析赤霞珠干红葡萄酒中花色素苷成分[J].酿酒科技, 2005,(1): 81-84.
- [20] 王贞强,韩富亮,王羽. HPLC 法测定葡萄与葡萄酒中的花色素苷[J]. 河北农业大学学报, 2008,(6): 30-31.
- [21] Noelia Lo'pez a, Eduardo Pue'rtolas a, Purificacio'n Herna'ndez-Orte b. Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of *Cabernet Sauvignon* freshly fermented model wines obtained after different maceration times[J]. LWT - Food Science and Technology, 2009, (42): 1225-1231.
- [22] André de Villiers, Deirdre Cabooter, Fr  d  ric Lynenc, edc. High performance liquid chromatography analysis of wine anthocyanins revisited: Effect of particle size and temperature[J]. Journal of Chromatography A, 2009, (1216): 3270-3279.
- [23] Lab. Fitoquimica, Dept. Ciencia y Tecnologia de Alimentos CEBAS-CSIC, edc. Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis[J]. Food Chemistry, 1995, 54(4): 34-35.
- [24] Eugenio Revilla, Jose'-Mar'ia Ryan. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation[J]. Journal of Chromatography A, 2000, (881): 461-469.
- [25] Zden ek Sp?a'cil, Lucie Nov'akov'a, Petr Solich. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography[J]. Talanta, 2008, (76): 189-199.
- [26] Paola Dugo, Francesco Cacciola, Paola Donato, edc. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography to quantify polyphenols in red wines[J]. Journal of Chromatography A, 2009.
- [27] Mar'ia-Pilar Sáenz-Navajas, Mar' a Teresa Tena, Purificaci n Fernández-Zurbano. Study of hydroxycinnamic acids and malvidin 3-monoglucoside derivatives using capillary zone electrophoresis and ultra-performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry, 2009, (115): 766-774.
- [28] Magdalena Lo'pez-Barajas, Elvira Lo'pez-Tamames, Susana Buxaderas. Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the simple analysis of grape juice and wine polysaccharides[J]. Jour.Jnal of Chromatography A, 1998, (823): 339-347.
- [29] 李志军,吴永宁,刘浩.葡萄酒中生物胺多组分的 UVD/FLD 串联 HPLC 方法研究[J]. 卫生研究, 2005,(5): 577-580.
- [30] Angela Alca'zar, Jose' M. Jurado, Fernando Pablos, edc. Angela Alca'zar, Jose' M. Jurado, Fernando Pablos[J]. Microchemical Journal, 2006, (82): 22- 28.

酿酒行业的新起点

每瓶酒里装入一棵鲜人参,成本几角钱,可使每瓶酒的售价提高2~5元。我场长期为酿酒行业提供各种规格的鲜人参,购量大价格优惠。来场购货或场里去人送货均可,我场希望能同更多的酿酒企业建立并保持长期的合作关系。

供货单位:吉林省抚松县西岗乡东江沿爱林参场

场 长:吕启东

电 话:(0439)6318265 (0)13644393406

传 真:(0439)6310007

开户行:抚松县松江河工商银行

账 号:0807240201003311576

邮 编:134504