

新疆慕萨莱思葡萄酒中原花青素含量测定的 HPLC 方法建立

王伟华¹, 曹 员², 莫 骏 涛¹, 田 木 星¹, 刘 飞¹

(1. 塔里木大学 生命科学学院, 新疆生产建设兵团南疆特色农产品深加工重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300;

2. 阿拉尔质量技术监督局, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以矢车菊素、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯为标准品,采用岛津 LC-20A 高效液相色谱仪、二极管阵列检测器,建立了慕萨莱思酒中原花青素含量测定的 HPLC 方法。结果表明:优化后的色谱条件为色谱柱 Inertsil DOS-3, 5 μm 4.6 mm \times 250 mm 色谱柱;流动相 A 为甲醇,流动相 B 为超纯水;流动相比率为流动相 A 为 35%,流动相 B 为 65%;流速 1.0 mL/min;进样量 10 μL ;柱温 38 $^{\circ}\text{C}$ 。应用所建立的 HPLC 方法对慕萨莱思酒进行分析,出峰效果良好;标准曲线正常,回收率为 82%~93%。该方法操作简单、准确度高、测定时间短,可用于慕萨莱思酒中原花青素的测定。

关键词:高效液相色谱;慕萨莱思葡萄酒;原花青素;回收率

中图分类号:TS 262.61 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0126-05

慕萨莱思酒是新疆阿瓦提县流传千年,盛产的特有饮品。慕萨莱思酒是以成熟的“和田红”葡萄为原料,由传统的工艺秘制而成,经破碎压榨、熬煮后,利用独特环境空气中产生的酵母菌群发酵酿成,在配料中还添加了肉苁蓉、鹿茸、锁阳、丁香、玫瑰花、枸杞等诸多名贵药材^[1-3]。慕萨莱思酒中含有大量对人体有益的维生素、氨基酸以及多酚类化合物等,不仅营养丰富,而且具有一定的养生功效,是保健品中极品,具有极大的市场潜力^[4-6]。

第一作者简介:王伟华(1977-),女,吉林双阳人,博士,副教授,现主要从事食品质量安全等研究工作。E-mail:wangweihua6688@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31360409,31471667);新疆生产建设兵团“兵团英才”选拔培养工程(第一周期第三层次培养人选)资助项目。

收稿日期:2015-03-15

随着葡萄酒产业的发展,人们越来越关注葡萄酒所包含的营养成分及其生理功能和保健作用,酒中的原花青素具有显著地抗氧化性而成为重要的研究对象。原花青素是由不同数量的儿茶素或表儿茶素结合而成,具有极强的抗氧化特性,在植物中广泛存在,是具有广泛发展前景的植物药。原花青素是当今医学界发现的最安全高效的抗氧化剂、自由基清除剂和紫外线吸收剂,其抗氧化能力是维生素 E 的 50 倍、维生素 C 的 20 倍,它能有效清除体内多余的自由基,保护人体细胞组织免受自由基的氧化损伤,防治过敏、癌症、衰老等 100 多种与自由基有关的疾病,还具有加强和保护人体活性组织、稳定细胞膜以及抗酶活性(组胺脱羧酶)等生物特性^[7-14]。除植物外,葡萄汁、红葡萄酒、苹果汁、苹果酒和啤酒中也都含有原花青素^[15-20],慕萨莱思酒的许多功能与原花青素密切相关^[21-22]。建立有效的检测方法是研

Abstract: Taking lilies ‘Manissa’ as test material, the effect of several preservative solutions on fresh preservation of cut lilies during vase were studied. The economic and environment-friendly preservative solutions were consists of sucrose, glucose, alcohol, NaCl, aspirin and vitamin C, respectively. The results showed that all treatments could extend vase life of cut lilies flowers and increase the ornamental value in different degrees, in which the P7 treatment showed the best effects of preservation, that was $\text{H}_2\text{O} + 20 \text{ g/L glucose} + \text{vitamin C } 100 \text{ mg/L}$. Vitamin C could delay the flowering time and enlarge the buds, in addition to keeping leaves green for longer times; NaCl could prolong full-blossom periods thus prolong the vase life of cut flowers; addition of 0.5% alcohol could increase the diameters of flowers; aspirin prolonged the full-blossom periods obviously and cause the florescence ahead of time.

Keywords: *Lilium* ‘Mantissa’; environment-friendly preservative solution; vitamin C; sodium chloride; aspirin

究原花青素的前提和基础。该研究基于 HPLC 建立的原花青素测定方法,为准确、快速检测和进一步研究慕萨莱思酒中原花青素提供了必要条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

慕萨莱思酒来源于新疆阿瓦提县刀郎慕萨莱思酒厂。

甲醇(色谱纯)、超纯水、三氟乙酸(分析纯)、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、儿茶素、矢车菊素(4种标准品购于 Sigma 公司,纯度 98%)。

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪、KQ-100VDE 型双频数控超声波清洗器、自动进样装置、二极管阵列检测仪、真空抽滤机、色谱柱 Inertsil DOS-3, 5 μm 4.6 mm \times 250 mm 色谱柱。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液的配制 标准溶液的配制:准确称取标准品 1 mg,然后用纯甲醇溶解,配制成为标准品溶液。然后加入 10 mL 的容量瓶中,用纯甲醇稀释定容到 10 mL,浓度为 0.1 mg/mL。溶液的配制:准确称取 1 mg 矢车菊素、1 mg 儿茶素、1 mg 表儿茶素、1 mg 表儿茶素没食子酸酯,溶于 5 mL 甲醇中,然后转移至 10 mL 容量瓶中定容,则混合标准体的每种标准品浓度为 0.1 mg/mL,按以上方法配制 2 份,4℃ 保存^[23]。

1.2.2 液相色谱条件 对色谱柱、柱温、流动相、流动相梯度、流速等条件进行优化,确定最佳的 HPLC 条件。

1.2.3 HPLC 流动相的选择 在固定其它的色谱条件下,改变流动相种类,进行高效液相色谱分析,确定最佳流动相。

1.2.4 HPLC 流动相比比例的选择 在固定其它的色谱条件下,调试流动相 A 与流动相 B 的比例,进行高效液相色谱分析,从而确定流动相的最佳比例。

1.2.5 HPLC 流速的选择 在固定其它色谱条件下,调试流速,进行高效液相色谱分析,从而确定最佳的流速。

1.2.6 HPLC 进样量的选择 在固定其它的色谱条件

下,改变进样量,进行高效液相色谱分析,从而确定最佳进样量。

1.2.7 HPLC 柱温的选择 在固定其它色谱条件下,改变柱温,进行高效液相色谱分析,从而确定最佳柱温。

1.2.8 矢车菊素、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯的色谱图及标准曲线的建立 在优化的条件下,配制一定浓度的矢车菊素、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯的标准品,分别得到 4 种标准品的单色谱峰。将母液分别抽取 4、6、8、10 mL,分别转移至 10 mL 容量瓶中定容,依次浓度为 0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL。在最佳色谱条件下进样混合标准品,对不同浓度混合标准品进样,由外标峰面积法计算并绘制标准品的标准曲线。

1.2.9 回收率的测定 将 0.05 mg/mL 浓度的混合标准品添加到慕萨莱思酒样品中,以不加标准品的酒样为本底计算其回收率。同样品平行进样 5 次,加标回收率=(加标试样测定-试样测定)/加标量 \times 100%。

1.3 项目测定

采用乙醇浸提法,提取时间为 55 min,提取温度 50℃,料液比 1:8.5 g/mL,乙醇浓度为 70%;大孔树脂 AB-8 进行纯化,进样浓度为 6 mg/mL,最佳洗脱流速是 4 BV/h,乙醇的最佳洗脱浓度是 50%,在此条件下提取纯化得到慕萨莱思酒中的原花青素,用 HPLC 方法测定其含量。

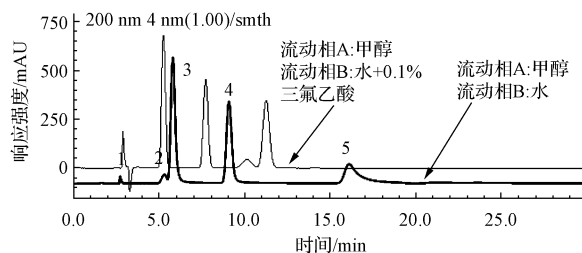
2 结果与分析

2.1 HPLC 流动相的选择

由图 1 可知,当流动相中加入三氟乙酸后,会造成溶剂峰后出现倒峰。加入三氟乙酸的流动相并不出现矢车菊素峰,峰 4 最大吸收波长为 580 nm,矢车菊素最大吸收波长为 199 nm,波长 225 nm 出现峰肩,初步判断峰 4 并不是矢车菊素出的峰,所以确定的流动相为 A 为甲醇,B 为超纯水。

2.2 HPLC 流动相比比例的选择

由图 2 可知,最佳的等度洗脱条件为流动相 A 为 35%,流动相 B 为 65%。



注:1 为流动相;2 为儿茶素;3 为表儿茶素;4 为未知物质;5 为表儿茶素没食子酸酯。下同。

Note:1 is mobile phase;2 is catechin;3 is epicatechin;4 is an unknown substance;5 is epicatechin-3-gallate, the same below.

图 1 不同流动相的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of different mobile phases

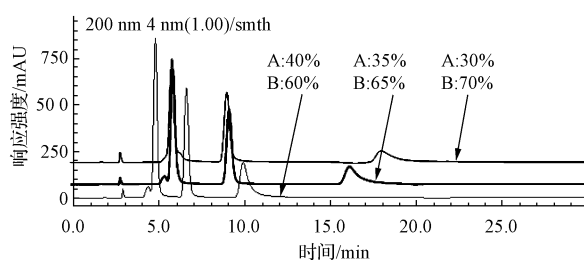


图2 不同流动相比例的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of different mobile phase ratios

2.3 HPLC 流速的选择

由图3可知,最佳的流速条件为1.0 mL/min。在流速分别为0.8、1.0、1.2 mL/min时,流速对样品的响

应值峰形影响并不大,但是在流速1.0 mL/min时,矢车菊素与儿茶素出峰分离的效果更佳。

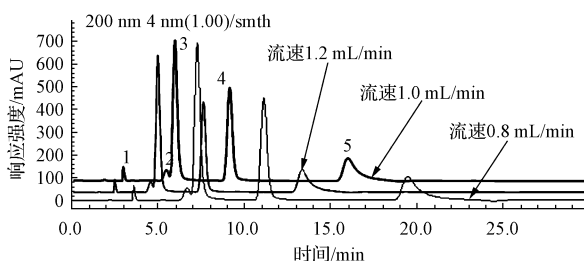


图3 不同流速的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of different flow rates

2.4 HPLC 进样量的选择

由图4可知,各标准品随着进样量的增加而呈现规律性变化,出峰峰高呈规律性增加,峰面积随着进样量的递增而增加,峰宽随着进样量增加到20 μ L之后,会造成矢车菊素与儿茶素出峰重合,使其难以分离,所以在进样量选择时,综合考虑保留时间、峰宽和峰面积,应选择进样量10 μ L。

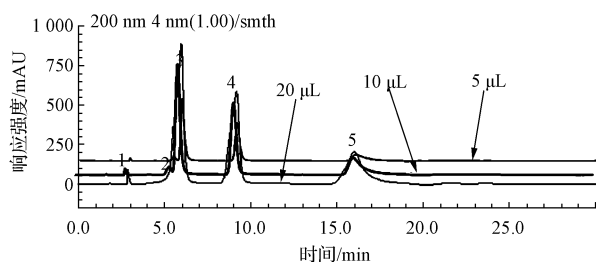


图4 不同进样量的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of different sample volumes

2.5 HPLC 柱温的选择

由图5可知,各标准品保留时间、峰面积随着温度的上升而有规律的变化,儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯的出峰时间越来越向前,矢车菊素与儿茶素出峰越来越难分离,当温度达到30℃时,矢车菊素与儿茶素的峰完全重合。为了确保矢车菊素与儿茶素出峰更

好的分离,应选择色谱柱柱温30℃。

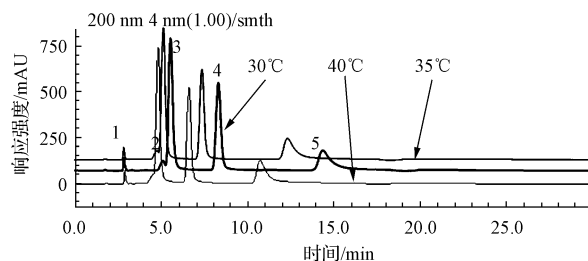


图5 不同柱温的色谱图

Fig. 5 Chromatogram of different column temperatures

2.6 矢车菊素、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯的色谱图及标准曲线的建立

由图6可知,矢车菊素、儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的保留时间分别为5.0、6.1、8.5、15.0 min。

从表1可以看出,4种原花青素单体相关系数都较高,可用于慕萨莱思酒中原花青素的检测。

2.7 回收率的测定

从表2可以看出,该方法对于慕萨莱思葡萄酒中的原花青素加标回收率均大于等于82.0%,单次连续进样得到的结果证明,该试验方法可靠。

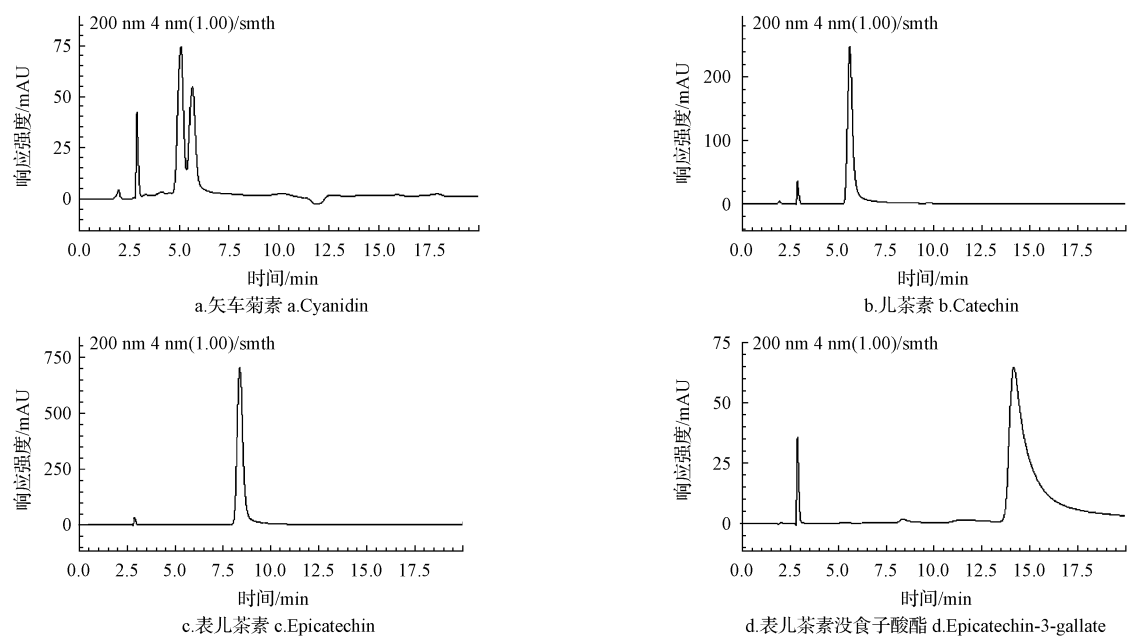


图 6 标准品的色谱图
Fig. 6 Chromatogram of standards

表 1 慕萨莱思酒中 4 种原花青素单体的标准曲线的建立

名称	回归方程	相关系数	线性范围
矢车菊素	$y=1\times10^{-7}x-10\ 325$	0.999 6	0.025~0.100
儿茶素	$y=5\times10^{-7}x-426\ 635$	0.999 9	0.025~0.100
表儿茶素	$y=2\times10^{-8}x-853\ 501$	0.999 9	0.025~0.100
表儿茶素没食子酸酯	$y=6\times10^{-7}x-888\ 070$	0.999 3	0.025~0.100

表 2 慕萨莱思酒中 4 种原花青素的回收率

名称	加标前 /(mg·mL ⁻¹)	加标后 /(mg·mL ⁻¹)	混标 /(mg·mL ⁻¹)	回收率 /%
矢车菊素	0.056 7	0.152 4	0.110 1	86.9
儿茶素	0.113 7	0.752 4	0.778 7	82.0
表儿茶素	0.092 3	0.578 7	0.565 1	86.1
表儿茶素没食子酸酯	0.059 9	0.611 8	0.593 4	93.0

2.8 慕萨莱思中(原)花青素含量的测定

由图 7 可知,慕萨莱思酒样中有矢车菊素、儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的色谱峰出现。由表 3 可知,慕萨莱思酒中表儿茶素的含量最高,矢车菊素的含量最低。

表 3 慕萨莱思酒中原花青素含量的测定

矢车菊素	儿茶素	表儿茶素	表儿茶素没食子酸酯
0.250 1	3.741 8	8.780 9	3.535 6

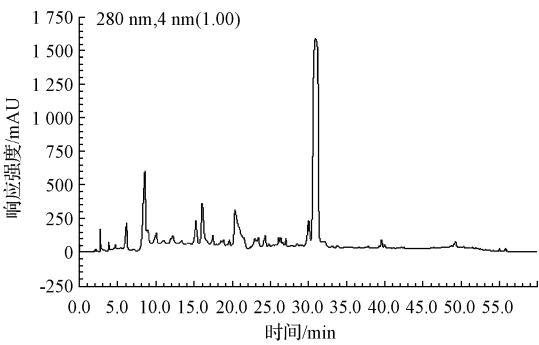


图 7 慕萨莱思酒样色谱图

Fig. 7 Chromatogram of Musalais samples

3 结论

该试验所建立的 HPLC 方法操作简单、准确度较

高、测定时间短、对 4 种原花青素分离效果较好,可用于慕萨莱思酒中原花青素的测定。

参考文献

- [1] 张新民. 新疆一本就 GO[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [2] 《走遍中国》编辑部. 走遍中国: 新疆[M]. 3 版. 北京: 中国旅游出版社, 2014.
- [3] 朱丽霞, 李红梅, 郭东起, 等. 新疆慕萨莱思自然发酵过程中酵母菌表型多样性及优势菌分析[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 142-147.
- [4] 朱丽霞, 甄文, 王丽玲, 等. 新疆慕萨莱思感官特性定量描述分析[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 38-44.
- [5] 朱丽霞, 侯旭杰, 许倩. 新疆慕萨莱思葡萄酒品质分析初探[J]. 酿酒科技, 2008(6): 68-71.
- [6] ZHU L, WANG L, SONG H, et al. Qualitative analysis of the main aroma compounds associated with traditional Musalais processing in Xinjiang, China [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 118(2): 236-242.
- [7] 国植, 徐莉. 原花青素: 具有广泛发展前景的植物药[J]. 国外医药(植物药分册), 1996, 11(1): 196-204.
- [8] 余晓琴, 阚建全, 赵国华, 等. 天然抗氧化剂原花青素保健功能[J]. 粮食与油脂, 2003(4): 40-42.
- [9] 孙芸. 葡萄籽原花青素的聚合度与功效关系的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [10] PEARSON D A, SCHMITZ H H, LAZARUS S A, et al. Inhibition of *in vitro* low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas[J]. Methods Enzymol, 2001, 335: 350-360.
- [11] LING Z Q, XIE B J, YANG E L. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(7): 2441-2445.
- [12] XIAO J S, XIE B J, CAO Y P, et al. Characterization of oligomeric procyanidins and identification of quercetin glucuronide from the lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(11): 2825-2829.
- [13] RIOS L Y, BENNETT R N, LAZARUS S A, et al. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans[J]. American J Clin Nutr, 2002, 76(5): 1106-1110.
- [14] AUGER C, AL-AWWADI N, BORNET A, et al. Catechins and procyanidins in Mediterranean diets[J]. Food Research International, 2004(3): 233-245.
- [15] 崔介君, 孙培龙, 马新. 原花青素的研究进展[J]. 食品科技, 2003(2): 292-295.
- [16] 李春阳. 葡萄籽中原花青素的提取纯化及其结构和功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [17] 凌智群, 谢笔钧. 莲房原花青素对氧自由基和脂质过氧化的作用[J]. 营养学报, 2002, 24(2): 121-124.
- [18] 常世敏, 范蓓. 红葡萄酒中原花青素的功能[J]. 中国食物与营养, 2004(3): 48-50.
- [19] 赵文军, 吴雪萍, 王旭. 葡萄籽低聚原花青素提取及性质分析[J]. 精细化工, 2004, 21(8): 591-593.
- [20] 吴朝霞. 葡萄籽原花青素分离提纯、组分鉴定及抗氧化性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2005.
- [21] 周素娟. 葡萄籽提取物原花青素的研究概况及其在我国保健食品中的应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 284-286.
- [22] 王伟华, 韩占江. 新疆慕萨莱思酒天然活性成分的代谢组学研究进展: 以原花青素为例[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1808-1812.
- [23] 王燕, 王方, 张岱, 等. 葡萄酒有机酸的 HPLC 分析中色谱条件的优化[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2010(9): 34-37.
- [24] 王夏青, 於洪建, 赵余庆. 干红葡萄酒中儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇和原花青素的测定[J]. 中草药, 2009, 40(5): 745-747.
- [25] 李春阳, 许时婴, 王璋. 葡萄籽原花青素结构单元的红外光谱分析[J]. 食品与生物技术学报, 2005(4): 47-51.

Establishment of High Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Procyanidin From Musalais Wine in Xinjiang

WANG Weihua¹, CAO Yuan², MO Juntao¹, TIAN Muxing¹, LIU Fei¹

(1. College of Life Science, Tarim University, Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Deep Processing of Agricultural Products in South Xinjiang, Alar, Xinjiang 843300; 2. Alar Quality and Technical Supervision Bureau, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: Taking cyanidin, catechin, epicatechin and epicatechin-3-gallate as standards, a high performance liquid chromatograph (HPLC) method for determination of procyanidin content from Musalais was established using SHIMADZU LC-20A HPLC and diode array detector. The results showed that optimized chromatographic condition was as follow: column with Inertsil DOS-3, 5 μm 4.6 mm \times 250 mm; mobile phase A was methanol, and mobile phase B was ultrapure water; proportion of mobile phase: mobile phase A was 35%, and mobile phase B was 65%; flow rate was 1 mL/min; sample volume was 10 μL ; column temperature was 38°C. Using this HPLC method to detect Musalais, peak effect was well, standard curve was normal, and recoveries were 82% to 93%. This method had the advantages of simple operation, high accuracy, and short detection time. So it was successfully applied to determine procyanidins form Musalais.

Keywords: high performance liquid chromatography (HPLC); Musalais wine; procyanidins; recovery