

# 基于高效液相色谱法的宁夏葡萄酒中 十种酚类物质的测定

耿晨晨<sup>1</sup>, 张军翔<sup>1</sup>, 李强<sup>2</sup>, 李辉<sup>1</sup>, 李超<sup>1</sup>

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 银川市葡萄酒产业发展局, 宁夏 银川 750021)

**摘 要:**以宁夏贺兰山东麓 10 个葡萄酒样品为试材, 采用了 HPLC 法同时测定陈酿葡萄酒中没食子酸、水杨酸等 10 种单体酚, 并通过样品回收率和精密度的测试, 确定了最佳色谱条件。结果表明: Ultra II-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为水: 乙酸(98:2)(V/V), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 280 nm, 在此条件下各物质在 25 min 内得到了良好的分离, 各物质的含量和峰面积均有较好的线性关系( $r>0.999$ ), 同时回收率较高(>80%), 重复性好, 具有定量准确、时间短等特点。10 个葡萄酒样品中均能检测到这 10 种物质, 且含量各不相同; 其中没食子酸、儿茶素含量均较高。

**关键词:**葡萄酒; 单体酚; 高效液相色谱

**中图分类号:** TS 262.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)11-0140-05

宁夏葡萄酒中富含丰富的酚类物质, 主要包括类黄酮与非类黄酮, 类黄酮物质包括水解性单宁、花色苷类与黄酮醇类等化合物, 非类黄酮包括酚酸类化合物<sup>[1-4]</sup>, 它们是构成干红葡萄酒的重要组成部分, 影响着干红葡萄酒的颜色、口感、滋味等感官参数; 此外, 酚类物质还具有很高的生理活性, 大量的流行病学调查发现, 长期适量饮用葡萄酒可促进血液循环, 预防高血压、动脉硬化等疾病。酚类化合物主要来源于葡萄的果梗、果皮与果粒, 其空间结构与含量会在葡萄酒发酵的过程中发生较大的变化。葡萄与干红葡萄酒中的酚类化合物含量与种类随葡萄的品种、产地、栽培技术、成熟度等不同而有所不同<sup>[5-8]</sup>。

葡萄酒中酚类化合物的种类多而结构相对复杂, 随着当今社会的发展需求, 快速检测干红葡萄酒中的酚类化合物十分重要。常用的检测方法有光谱

法、色谱法和电化学法等, 其中色谱法是近年来最常用的分析方法, 国内外已有许多学者通过高效液相色谱法对红酒中的各种物质进行研究<sup>[7-10]</sup>。成宇峰等<sup>[7]</sup>研究了流动相等色谱条件的优化, 分离出了没食子酸等 10 种单体酚化合物; 孙翔宇<sup>[8]</sup>研究了葡萄酒前处理方法、优化了色谱条件, 分离出了 15 种酚酸; 陈建业<sup>[9]</sup>研究分离出 11 种单体酚; 韩国民等<sup>[10]</sup>优化方法后分离出 14 种单体酚。

该试验拟建立一种能够在较短时间内同时测定出宁夏葡萄酒中 10 种单体酚的高效液相色谱分析方法, 并对 10 种不同品种的葡萄酒进行检测分析, 以期对宁夏地区葡萄酒中酚类物质的研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试葡萄酒样: 共 10 种, 其中“赤霞珠”4 种(59cs、61cs、65cs、78cs), “梅鹿辄”2 种(8mr、28mr), “蛇龙珠”2 种(39CG、238CG), “黑比诺”(PN)和“西拉”(SR)各 1 种, 均由宁夏西夏王有限公司提供, 酿酒用葡萄均于 2012 年采收于宁夏银川黄羊滩葡萄产区, 所有酒样均采用相同酿造工艺条件酿制, 且在相同条件下瓶储陈酿。

标准品: 儿茶素(catechin)、没食子酸(gallic

**第一作者简介:**耿晨晨(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为葡萄酒酿造。E-mail: chenchengeng@hotmail.com.

**责任作者:**张军翔(1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向为葡萄酒酿造。E-mail: zhangjunxiang@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金地区科学基金资助项目(31260392)。

**收稿日期:**2017-02-17

acid)、芦丁(rutin hydrate)、安息香酸(3,4-dihydroxybenzoic acid)、咖啡酸(caffeic acid)、丁香酸(syringic acid)、阿魏酸(ferulic acid)、槲皮素(quercetin)、水杨酸(salicylic)、香豆酸(coumaric)均购自美国 Sigma 公司。

供试试剂:甲醇、乙腈为色谱纯;乙酸、乙酸乙酯为分析纯。

供试仪器:高效液相色谱仪 Agilent1100,美国安捷伦公司;Water Millipore 纯水机,英国 Millipore 公司;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;KQ100DB 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;UltraII-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),美国瑞斯泰克公司;SHZ-III 型循环水真空泵,郑州长城科工贸有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 葡萄酒样品前处理 参照文献[13]的方法且稍作改动。所有葡萄酒样品各吸取 20 mL,分别用 20 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相减压蒸馏浓缩至干(≤37℃),残渣溶于 4 mL 色谱甲醇中,置于一30℃左右避光待用,处理后的样品测定前需用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.2.2 色谱条件 利用高效液相色谱法<sup>[14]</sup>测定干红葡萄酒中的多酚类化合物,选择 2 种流动相组成。流动相 I:流动相 A,水:乙酸=98:2(体积比);流动相 B,乙腈(色谱纯)。选择 2 种洗脱程序,洗脱程序 I:0~10 min,B 为 24%;10~25 min,B 为 24%~40%;25~35 min,B 为 40%~0%。洗脱程序 II:0~10 min,B 为 16%;10~25 min,B 为 20%~40%;25~30 min,B 为 40%~0%。流动相 II:流动相 A,水:乙酸=99:1(体积比),流动相 B,乙腈(色谱纯)。选择 3 种洗脱程序,洗脱程序 I:0~15 min,B 为 0%~22%;15~30 min,B 为 22%~38%;30~35 min,B 为 38%~0%。洗脱程序 II:0~15 min,B 为 0%~24%;15~35 min,B 为 24%~40%;35~40 min,B 为 40%~0%。洗脱程序 III:0~10 min,B 为 24%;10~25 min,B 为 24%~40%;25~35 min,B 为 40%~0%。

1.2.3 多酚标准工作曲线的制备 分别称取 10.00 mg 10 种酚类化合物(芦丁、水杨酸、咖啡酸、安息香酸、丁香酸、儿茶素、槲皮素、阿魏酸、没食子酸与香豆酸)的标准品,用甲醇(色谱级)在 10 mL 容量瓶中定容,此时标准品浓度为 1 000 mg·L<sup>-1</sup>,吸

取 5 mL 溶液于新的 10 mL 容量瓶定容,此时浓度为 500 mg·L<sup>-1</sup>,依次类推可以得到 1 000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8 mg·L<sup>-1</sup> 的 8 个不同浓度的 10 种单体酚混合标样,一30℃下保存备用。进样 10 μL,以样品浓度为横坐标,样品峰面积为纵坐标,计算得到 10 种单体酚混合标样的标准曲线。

## 1.3 项目测定

1.3.1 葡萄酒中酚类物质含量的测定 将前处理过的 10 种酒样在已经筛选出的 HPLC 进样方法下,进样 10 μL,根据得出的 10 种单体酚标准曲线,可以确定 10 种葡萄酒样品中单体酚含量。

1.3.2 回收率和精密度的测定 在 1.2.4 的结果下向这 10 种得到单体酚含量的宁夏葡萄酒试样中定量添加各标准品的混合标准溶液,按照样品预处理方法制备酒样单体酚测定液,重复 6 次,用微量注射器每次吸取 10 μL 进样,得到的结果用来验证在该试验方法下,对酒样的单体酚含量的测定是否准确。

## 1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测波长的确定

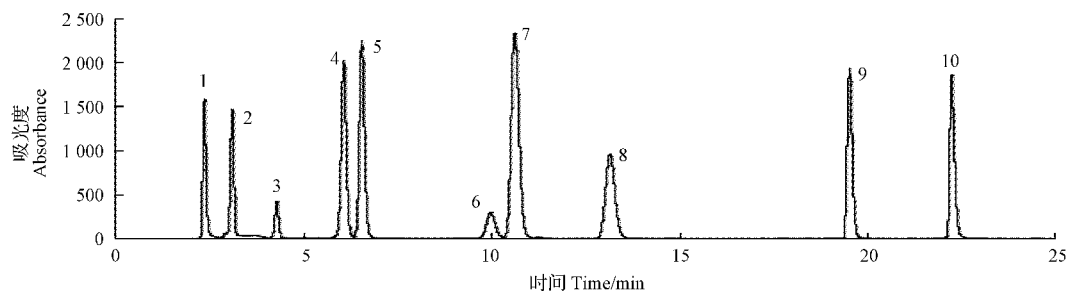
用紫外分光光度计在波长 200~400 nm 内对 10 种单体酚标准样品溶液进行扫描,根据紫外吸收值可知,10 种组分最大吸收峰均在 280 nm 处,故选择 280 nm 为检测 10 种单体酚的波长。

### 2.2 流动相条件的确定

每种单体酚本身具有特定的出峰时间,将所有标准品称取相同的量配成同一个浓度,混合,在流动相相同的条件下进行不同的洗脱程序。由结果得知,选择流动相组成 I 时,洗脱程序 II 中,混合样品中各个标准品单体酚都能得到较好分离,且分离时间较短。选择流动相组成 II 时,各种酚类物质的分离效果不好,分离时间较长,综合考虑分离效果和保留时间,故选择流动相组成 I 为该试验用流动相,洗脱程序为 II:0~10 min,B 为 16%;10~25 min,B 为 20%~40%;25~30 min,B 为 40%~0%(图 1)。

### 2.3 多酚标准工作曲线

分别准确配制 7.8~1 000 mg·L<sup>-1</sup> 的 8 个不同浓度的 10 种单体酚混合标样,进样 10 μL,以样品浓度为横坐标,样品峰面积为纵坐标,计算得到 10 种单体酚混合标样的标准曲线(表 1)。



注:1. 没食子酸;2. 香豆酸;3. 儿茶素;4. 咖啡酸;5. 丁香酸;6. 芦丁;7. 阿魏酸;8. 安息香酸;9. 水杨酸;10. 槲皮素。

Note:1. Gallic acid;2. Coumaric;3. Catechin;4. Caffeic acid;5. Syringic acid;6. Rutin hydrate;7. Ferulic acid;8. 3,4-dihydroxybenzoic acid;9. Salicylic;10. Quercetin.

图1 混合标样色谱分析

Fig.1 Chromatogram of 10 mono-phenols standards

表1

各单体酚保留时间,检测限和回归方程

Table 1

Retention time, regression equation, detection limits of 10 mono-phenols

名称 Name	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient ( <i>r</i> )	线性范围 Linear range ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	保留时间 Remain time /min	最小检测限 Minimum detection limit ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
槲皮素 Quercetin	$y=0.0732x+2.4908$	0.9989	11.20~349.00	22.95	0.0306
芦丁 Rutin hydrate	$y=0.1572x-1.7040$	0.9996	9.04~392.00	10.66	0.0693
安息香酸 3,4-dihydroxybenzoic acid	$y=0.2638x+2.9904$	0.9996	11.75~357.00	18.61	0.0507
阿魏酸 Ferulic acid	$y=0.0363x-0.4823$	0.9998	8.06~234.00	13.99	0.0520
丁香酸 Syringic acid	$y=0.0347x-4.4784$	0.9992	9.21~350.00	7.07	0.0483
水杨酸 Salicylic	$y=0.1404x+3.9842$	0.9995	11.08~336.90	19.91	0.0559
香豆酸 Coumaric	$y=0.0490x-2.3108$	0.9997	10.06~368.70	4.21	0.0281
咖啡酸 Caffeic acid	$y=0.0417x-2.0749$	0.9994	11.54~325.70	6.62	0.0464
儿茶素 Catechin	$y=0.1439x+7.5270$	0.9993	9.30~371.90	4.65	0.0530
没食子酸 Gallic acid	$y=0.0523x-2.2340$	0.9996	10.90~347.00	3.32	0.0256

#### 2.4 各单体酚回收率和精密度的测定

根据测得宁夏产红葡萄酒样品中10种单体酚含量来分别计算出相应的精密度与回收率。由表2

可知,宁夏葡萄酒中各种单体酚的回收率均可达到80.00%以上,且相对标准偏差都在3%内。表明样品预处理方法是有效可行的。

表2

各单体酚精密度和加标回收试验结果( $n=6$ )

Table 2

Results of precision and recovery experiment for several mono-phenols ( $n=6$ )

名称 Name	样品中酚含量 Phenols content in samples/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	添加量 Addition/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	结果 Result/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 Recovery rate/%	相对标准偏差 RSD/%
槲皮素 Quercetin	11.90	50.00	52.54	81.42	2.95
芦丁 Rutin hydrate	3.90	50.05	48.79	86.93	1.51
安息香酸 3,4-dihydroxybenzoic acid	9.73	50.50	45.08	93.23	0.87
阿魏酸 Ferulic acid	2.09	51.10	38.18	90.02	3.08
丁香酸 Syringic acid	5.30	50.20	49.08	89.48	1.98
水杨酸 Salicylic	12.19	50.15	57.27	87.03	2.02
香豆酸 Coumaric	4.90	51.00	50.02	90.29	1.29
咖啡酸 Caffeic acid	11.62	50.10	51.30	85.53	2.97
儿茶素 Catechin	30.17	50.15	81.30	83.38	2.72
没食子酸 Gallic acid	51.20	50.00	87.20	82.15	1.34

## 2.5 重复性试验

对样品与混合标样连续进行 6 次测定,对标样与样品进行重复性试验。由表 3 可知,各酚类物质

的保留时间与峰面积重复性较好,各酚类物质的出峰时间的相对标准偏差均在 1%以内;各酚类物质峰面积的相对标准偏差均在 2%以内。

表 3 样品与标样测定重复性试验结果( $n=6$ )Table 3 Results of repeatability for standards and sample determination( $n=6$ )

%

名称 Name	混合标样相对标准偏差 RSD		样品相对标准偏差 RSD	
	保留时间 Retention time	峰面积 Peak area	保留时间 Retention time	峰面积 Peak area
槲皮素 Quercetin	0.75	0.24	0.31	0.55
芦丁 Rutin hydrate	0.63	0.10	0.25	0.83
安息香酸 3,4-dihydroxybenzoic acid	0.68	0.29	0.17	0.93
阿魏酸 Ferulic acid	0.60	0.07	0.06	0.27
丁香酸 Syringic acid	0.58	0.12	0.11	0.99
水杨酸 Salicylic	0.92	0.16	0.07	1.21
香豆酸 Coumaric	0.64	0.10	0.05	1.08
咖啡酸 Caffeic acid	0.83	0.22	0.03	0.81
儿茶素 Catechin	0.63	0.09	0.10	0.93
没食子酸 Gallic acid	0.23	0.14	0.04	0.37

## 2.6 葡萄酒样品酚类物质含量的测定

根据前述色谱条件,对 10 种宁夏葡萄酒中的 10 种单体酚含量进行测定,由表 4 可知,在宁夏产 10 种不同的葡萄酒中均检测出没食子酸、儿茶素等 10 种单体酚物质,但是 10 种单体酚物质的含量在 10 种葡萄酒中各不相同。按葡萄品种之间来比较,则总含量由大到小依次为“赤霞珠”>“梅鹿辄”>“蛇龙珠”>“黑比诺”>“西拉”,其中,“赤霞珠”与“梅鹿辄”葡萄酒中酚类物质的总含量很接近,“西拉”葡萄

酒中酚类物质的含量最少,儿茶素、没食子酸以及水杨酸的含量在干红葡萄酒中比例相对较高,含量水平最低的是芦丁和阿魏酸。按单体酚含量来比较,“赤霞珠”(59cs、61cs、65cs、78cs)葡萄酒中的没食子酸含量较高,“黑比诺”(PN)最低。葡萄酒中除丁香酸、芦丁、阿魏酸和香豆酸含量较低外,其它各单体酚含量均较高。其中没食子酸在每种葡萄酒中含量均相对最高,其次为儿茶素与水杨酸。

表 4 葡萄酒中酚类物质含量的测定

Table 4 Mono-phenol contents in 10 different wines

 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 

名称 Name	样品号 Sample									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
槲皮素 Quercetin	84.32	53.25	75.97	58.77	95.36	86.72	51.43	43.67	62.11	51.07
芦丁 Rutin hydrate	19.45	18.56	16.34	14.26	22.71	22.56	28.05	18.41	9.67	7.30
安息香酸 3,4-dihydroxybenzoic acid	62.91	21.54	54.40	22.46	19.02	36.48	43.83	25.45	50.04	28.67
阿魏酸 Ferulic acid	3.20	4.01	9.10	1.47	36.39	11.08	14.63	3.83	18.62	26.65
丁香酸 Syringic acid	37.29	15.38	27.44	22.60	35.36	37.94	31.11	35.65	6.58	16.59
水杨酸 Salicylic	167.12	57.96	119.41	99.64	130.52	128.36	141.95	90.53	86.98	53.17
香豆酸 Coumaric	39.72	13.78	29.40	24.44	39.60	43.99	42.74	40.40	9.05	11.79
咖啡酸 Caffeic acid	78.35	42.06	52.06	37.19	130.94	58.05	70.57	58.05	75.58	122.79
儿茶素 Catechin	497.77	450.47	421.94	328.84	424.65	378.04	236.57	281.82	255.59	410.38
没食子酸 Gallic acid	688.52	561.37	534.00	413.03	592.27	572.10	329.99	420.34	226.36	550.64

注:1~4 号为 59cs、61cs、65cs、78cs;5~6 号为 8mr、28mr;7~8 号为 39CG、238CG;9 号为 PN;10 号为 SR。

Note:1-4. 59cs,61cs,65cs,78cs;5-6. 8mr,28mr;7-8. 39CG,238CG;9. PN;10. SR.

### 3 讨论

该试验结果表明,利用筛选的最适高效液相色谱条件同时检测宁夏产葡萄酒中 10 种单体酚的方法简单、快速、准确度高,重复性好。

在宁夏产 10 种不同的葡萄酒中均检测出没食子酸、儿茶素等 10 种单体酚物质,但是 10 种单体酚物质的含量在 10 种葡萄酒中各不相同。按葡萄品种之间来比较,则总含量由大到小依次为“赤霞珠”>“梅鹿辄”>“蛇龙珠”>“黑比诺”>“西拉”,儿茶素、没食子酸以及水杨酸的含量在干红葡萄酒中比例相对较高,含量水平最低的是芦丁和阿魏酸。葡萄酒中除丁香酸、芦丁、阿魏酸和香豆酸含量较低外,其它各单体酚含量均较高。这种现象与其不同的品种,生长条件,栽培技术、酿造工艺及储藏环境等都有直接关系。不同品种葡萄酒中单体酚含量千差万别,这可能与土壤特征、气候条件与生产工艺不同有关,至于葡萄酒不同陈酿时间与单体酚含量之间的关系,尚需进一步研究。

### 参考文献

- [1] REVILLA E, GARCLA-BENEYTEZ E, CABELLO F, et al. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them[J]. J Chromatogr A, 2001, 915: 53-60.
- [2] ESCRIBANO-BAILN M T, SANTOS-BUELGA C, RIVAS-GONZALO J C. Anthocyanins in cereals[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1054: 129-141.
- [3] REIN M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins[D]. Helsinki: University of Helsinki, 2005.
- [4] HE J. Absorption, excretion, and transformation of individual anthocyanins in rats[D]. Maryland: University of Maryland, 2004.
- [5] 王霞, 王恭堂. 橡木片的选择与使用方法[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2002(4): 44-46.
- [6] 李华. 橡木桶与葡萄酒[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2002(1): 49-53.
- [7] 成宇峰, 张振文, 岳泰新, 等. HPLC 同时检测葡萄酒中 10 种单体酚的方法[J]. 食品科学, 2008(4): 287-290.
- [8] 孙翔宇. 单品种葡萄酒、商业葡萄酒酚类物质分析及发酵时去籽时间对葡萄酒中酚类物质含量影响[D]. 西安: 陕西师范大学, 2013.
- [9] 陈建业. 葡萄酒中酚酸及葡萄果实苯丙烷类代谢途径研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [10] 韩国民, 陈锋, 侯敏, 等. 葡萄酒中 14 种单体酚的高效液相色谱测定[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 180-183.

## Determination of Ten Mono-phenols in Dry Red Wines of Ningxia by HPLC

GENG Chenchen<sup>1</sup>, ZHANG Junxiang<sup>1</sup>, LI Qiang<sup>2</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, LI Chao<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Wine Industry Development Department of Yinchuan, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** Ten red wine samples from Helan Mountain in Ningxia were used as test materials. Simultaneous determination of 10 mono-phenols in wines by HPLC was studied. The results showed that chromatographic separation was performed by UltraII-C<sub>18</sub> precolumn (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). A gradient elution consisting of solvent A (water : acetic acid, 98 : 2, V/V) and solvent B (acetonitrile) was applied with flow rate at 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and detection wavelength at 280 nm. Under this chromatographic condition, the calibrations curves were linear with  $r > 0.999$  and recoveries of several mono-phenols  $> 80\%$ . The results showed that 10 mono-phenols were found in ten wines. Gallic acid and catechin content were higher than that of all the mono-phenols.

**Keywords:** grape wine; mono-phenol; HPLC