

文章编号: 1000 - 1573(2008)06 - 0059 - 03

HPLC 法测定葡萄与葡萄酒中的花色素苷

王贞强¹, 韩富亮², 王羽¹, 齐小菊¹,
王向红¹, 田益玲¹, 赵仁邦¹

(1. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001; 2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100086)

摘要: 利用甲醇和超声波提取酿酒葡萄 'Granoir' 中的花色素苷, 利用高效液相色谱分别测定了该葡萄及酒中的花色素苷。在测得的 9 种花色素苷中, 均以二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷含量最高, 分别占总成分的 39.71% 和 69.55%, 其次为二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷, 构成了 Granoir 葡萄及葡萄酒中的主要呈色成分。

关键词: Granoir; 葡萄; 葡萄酒; 花色素苷

中图分类号: S 663.1

文献标识码: A

Determination of anthocyanin in Granoir grape and wine with HPLC

WANG Zhen-qiang¹, HAN Fu-liang², WANG Yu¹, QI Xiao-ju¹,
WANG Xiang-hong¹, TIAN Yi-ling¹, ZHAO Ren-bang¹

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100086, China)

Abstract: Anthocyanin in 'Granoir' grape was extracted with methanol and ultrasonic, and the anthocyanin in 'Granoir' grape and 'Granoir' wine was detected with HPLC. Among the 9 anthocyanins, the content of malvidin 3-O-glucoside was the highest in 'Granoir' grape and wine, and the respective contents were 39.71% and 69.55%, secondly was malvidin 3-O-(6-O-p-coumaryl) glucoside. These anthocyanins in 'Granoir' grape and wine were main pigments.

Key words: Granoir; grape; wine; anthocyanin

酿酒葡萄 'Granoir', 是 1970 年瑞士人 Andre Jaquinet 用 'Gamy(佳美)' × 'Reichensteiner' 杂交育成, 因其丰产, 酒质优, 特别是酒的外观呈宝石红色, 果香浓郁, 在瑞士有较大面积的栽培。1997 年春, 由西北农林科技大学葡萄酒学院引入。任玉华和郝凤鸽分别对 'Granoir' 的植物学形状和生物学形状进行了研究, 并且对 'Granoir' 酒品质进行了初步研究^[1-2]。但是没有对 'Granoir' 及其葡萄酒中的花色素苷作出任何研究。

花色素苷是葡萄与葡萄酒中一类重要的多酚类物质, 是赋予葡萄与葡萄酒颜色的主要物质, 对其质

量有着重要的影响。葡萄中花色素苷可以吸收紫外线, 起到抗氧化剂、结构分子以及信号转导等方面的作用, 对果实色泽、风味、口感和营养价值等都具有重要的作用^[3]。一般酿酒葡萄花色素苷含量为 500 ~ 1 000 mg/kg。花色素主要是花翠素、花青素、3'-甲花翠素、甲基花青素、二甲花翠素这 5 种, 在葡萄中主要以糖苷即花色素苷的形式存在。它是在花色素的 3 位上结合一个糖苷基, 主要是葡萄糖, 其次是被乙酸、对-香豆酸和咖啡酸等酰化的葡萄糖结合, 个别可能是半乳糖^[4-5]。葡萄与葡萄酒中常见的花色素苷主要有 15 种, 它们分别是花翠素 3-O

收稿日期: 2007 - 09 - 11

作者简介: 王贞强(1977 -), 男, 山东泰安人, 硕士, 讲师, 主要从事芳香化合物及葡萄与葡萄酒的研究。

- 葡萄糖苷、花青素 3-O-葡萄糖苷、3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷、甲基花翠素 3-O-葡萄糖苷、二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷、花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷、花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷、3'-甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷、甲基花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷、二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷、花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷、花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷、3'-甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷、甲基花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷、二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷。对于葡萄酒及葡萄酒中的花色苷成分的分离鉴定也是在近代才研究出的,20世纪60年代,Ribereau-Cayon 教授利用色谱技术成功地分离和鉴定出葡萄与葡萄酒中的花色苷,目前利用 HPLC 分析花色苷已经成为主要的分析方法^[6],用光电二极管阵列检测器(LDAD)进行检测,可以对分离的花色苷色谱峰进行光谱定性鉴定和纯度鉴定^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

采用瑞士引进品种'Granoir'为试材,'Granoir'为欧洲种(*V. vinifera* L.)红色酿酒葡萄品种,该葡萄取自西北农林科技大学葡萄酒学院葡萄试验园,为2000年定植的扦插苗,单篱架,单干双臂整形,株行距1.5 m × 2.0 m,采用正常的生产园管理。采摘时间:2004年8月采收。'Granoir'单品种干红酒的生产工艺按照葡萄酒学院的干红葡萄酒小容器酿造工艺^[8]酿造。

1.2 方法

葡萄花色苷提取方法:选取15粒着色均匀的葡萄,剥出果皮,称重,加入30 mL 甲醇,超声辅助提取频率60%,温度35℃,每提取1次换1次水,以防止温度过高。每次提取20 min,共提取6次,合并提取液,定容至200 mL,4℃存放。提取重复2次。

高效液相色谱(HPLC)定性和定量分析:花色苷的定性采用标样二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷来定性,然后根据参考文献鉴定其它花色苷的成分^[9-16]。按照相关文献其中9种花色苷的出峰顺序为:花翠素 3-O-葡萄糖苷,花青素 3-O-葡萄糖苷,3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷,甲基花青

素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷,二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷。含量表示为9种花色苷峰面积的相对百分含量。0.45 μm 过滤提取液,直接进样。葡萄酒中花色苷的测定用0.45 μm 的超滤膜过滤后直接进样。定性和定量方法同葡萄中花色苷。

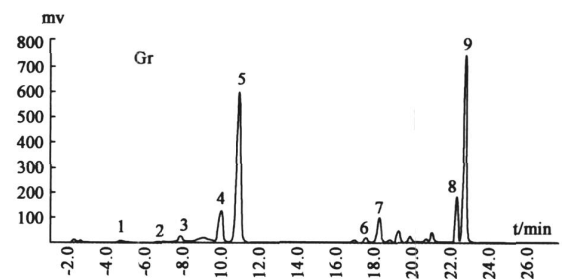
主要仪器:高效液相色谱:岛津 LC-10Avp,检测器 SPD-10Avp,柱温箱 CTO-10Asvp,积分仪 C-R8A,柱子(Zorbax SB C-18)为250 mm × 4.6 mm,保护柱(Zorbax SB C-18)为12.5 mm × 4.6 mm。另外还有真空抽滤器:Autoscience AP-9901S;真空脱气机:Autoscience AS3120B;纯水机:Water Millipore-Q;超声波清洗器:江苏 SP-KQ-300DE。主要的试剂为乙腈(GR)、超纯水(0.22 μm)、甲醇(AR)、盐酸(AR)、甲酸(AR)等。

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^[17]。流动相过滤,脱气5 min。HPLC分析重复3次。

2 结果与分析

2.1 'Granoir' 中的花色苷

根据高效液相色谱分析,'Granoir'葡萄中的其中9种花色苷如图1所示。图中5号峰的出峰时间与标样二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷相同,可以根据5号峰结合参考文献近似判断其它峰代表的成分。



注:1:花翠素 3-O-葡萄糖苷,2:花青素 3-O-葡萄糖苷,3:3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,4:甲基花青素 3-O-葡萄糖苷,5:二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,6:甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷,7:二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷,8:甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷,9:二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷

图1 'Granoir' 葡萄花色苷的色谱图

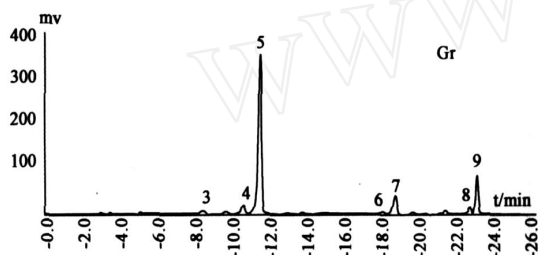
Fig. 1 HPLC chromatography of anthocyanin in 'Granoir' grape

'Granoir'果实中相对含量分布最多的是二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷,占9种花色苷总成分的

39.71%,其次是二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷,占总成分的 35.52%。甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷、甲基花青素 3-O-葡萄糖苷和二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷的相对含量都低于 10%,而甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷、花翠素 3-O-葡萄糖苷和花青素 3-O-葡萄糖苷的相对含量都在 1.0%以下。

2.2 'Granoir'葡萄酒中的花色素苷

葡萄酒中的花色素苷定性分析与葡萄中的定性分析相同,'Granoir'葡萄酒中的花色素苷高效液相色谱测定结果见图 2。图中因 1,2 号峰太小,未做标记。



注:1:花翠素 3-O-葡萄糖苷;2:花青素 3-O-葡萄糖苷;3:3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷;4:甲基花青素 3-O-葡萄糖苷;5:二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷;6:甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷;7:二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷;8:甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷;9:二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷

图 2 'Granoir'葡萄酒中花色素苷的色谱图

Fig. 2 Chromatography of anthocyanin in 'Granoir' wine

对葡萄酒中的 9 种花色素苷面积归一化,各种花色素苷的相对含量分别为:花翠素 3-O-葡萄糖苷(0.25%),花青素 3-O-葡萄糖苷(0.15%),3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷(0.97%),甲基花青素 3-O-葡萄糖苷(3.65%),二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷(69.55%),甲基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷(0.88%),二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷(8.80%),甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷(2.24%),二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷(13.51%)。在所测定的'Granoir'葡萄酒中,以二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷的相对含量最高,占总成分的 69.55%;其次为二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷,占总成分的 13.51%,相对含量最少的是花青素 3-O-葡萄糖苷,与葡萄中的花色素苷表现出相同的趋势。花翠素 3-O-葡萄糖苷、3'-甲花翠素 3-O-葡萄糖苷、甲基花青素 3-O-葡萄糖苷、甲

基花青素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷、二甲花翠素 3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷、甲基花青素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷的相对含量均低于 10%。

3 结论与讨论

利用该方法能够将'Granoir'葡萄及葡萄酒中的花色素苷分离开,'Granoir'葡萄果实及葡萄酒中的花色素苷主要成分和含量呈现出相同的趋势。在'Granoir'葡萄果实及葡萄酒中测得的 9 种花色素苷中,均以二甲花翠素 3-O-葡萄糖苷含量最高,分别占总成分的 39.71%和 69.55%,其次为二甲花翠素 3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷,其他 7 种花色素苷的相对含量较低,相对含量均低于 10%,不能构成该果实与酒的主要花色素苷。

参考文献:

- [1] 任玉华. 葡萄酒新品系 8804 和瑞引品种'Granoir'特性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2000.
- [2] 郝峰鸽. 瑞引酿酒葡萄 Granoir 品种特性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [3] 孙明霞,王宝增,范海,等. 叶片中的花色素苷及其对植物适应环境的意义[J]. 植物生理学通讯,2003,39(6):688-694.
- [4] 唐传核,彭志英. 天然花色素苷类色素的生理功能及应用前景[J]. 食品添加剂,2000(1):26-28.
- [5] 唐传核,杨晓泉. 葡萄及葡萄酒生理活性物质的研究概况(一)生理活性物质[J]. 中国食品添加剂,2003(1):41-48.
- [6] Heier A, Blaas W, Dro A, et al. Anthocyanin analysis by HPLC/MS[J]. Am J Enol Vitic, 2002,53(1):78-86.
- [7] Alessandro Baldi, Annalisa Romani, Nadia Mulinacci, et al. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. [J]. J Agric Food Chem,1995,43:2104-2109.
- [8] 李华. 葡萄酒小容器酿造[C]//葡萄与葡萄酒研究进展——葡萄酒学院年报. 西安:西安地图出版社,2002:97-99.
- [9] N ú ez V, Monagas M, Gomez - Cordov é M C, et al. *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile [J]. Postharvest Biology and Technology,2004(31):69-79.

(下转第 82 页)

常蛋白质合成受到抑制,而长期的干旱胁迫诱导出了新蛋白。这在许多试验中已经得到了证实^[15-16]。

干旱胁迫后复水,紫叶矮樱的抗氧化酶 SOD 和 POD 活性均显著高于 CK,渗透调节物质脯氨酸的含量也显著高于 CK,表明经过抗旱锻炼提高了紫叶矮樱的抗旱性。

参考文献:

- [1] 苏德荣,韩烈保,尹淑霞,等. 解决城市生态绿地灌溉用水的途径[J]. 节水灌溉, 2005, 4:10 - 13.
- [2] 郝峰鸽,李保印,杨立峰,等. 几种彩叶植物长期色素含量研究[J]. 华北农学报, 2007, 22 (1): 161 - 163.
- [3] 李亚蒙,王庆菊,沈向. 四种李属彩叶树种枝叶花色苷分布的解剖研究[J]. 山东农业大学学报:自然科学版, 2006, 37(4): 489 - 494.
- [4] 刘从霞,邓明净,王文凤,等. 5种李属彩叶植物抗寒性研究[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30 (5): 36 - 39.
- [5] 李合生. 植物生理生化实验原理和测定技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2003.
- [6] 张木清,陈如凯,余松烈. 水分胁迫下蔗叶活性氧代谢的数学分析[J]. 作物学报, 1996, 22 (6): 729 - 734.
- [7] 夏新莉,郑彩霞,尹伟伦. 土壤干旱胁迫对樟子松针叶膜脂过氧化、膜脂成分和乙烯释放的影响[J]. 林业科学, 2000, 36(3): 3 - 12.
- [8] 田小磊,吴晓岚,李云,等. 盐胁迫条件下 - 氨基丁酸对玉米幼苗 SOD、POD、及 CAT 活性的影响[J]. 实验生物学报, 2005, 38(1): 75 - 79.
- [9] 李明,王根轩. 干旱胁迫对甘草幼苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响[J]. 生态学报, 2002, 22(4): 503 - 507.
- [10] 吕斌,陈学年,李质怡,等. 不同砧木先锋橙叶片 POD 活性与树体生长势的关系[J]. 西南农业大学学报, 1999, 12(2): 63 - 67.
- [11] 周怀军,张晓曼,赵玉辉,等. 不同砧木大石早生李 POD 与树体生长势的关系[J]. 西北林学院学报, 2003, 18 (2): 6 - 8.
- [12] 孙彩霞,沈秀英,刘志刚. 作物抗旱生理生化机制的研究现状和进展[J]. 杂粮作物, 2002, 22(5): 285 - 288.
- [13] 王霞,侯平,尹林克,等. 干旱胁迫对柽柳植物可溶性物质的影响[J]. 干旱地区农业研究, 1999, 16 (2): 6 - 11.
- [14] 王启明,徐心诚,马原松,等. 干旱胁迫下大豆开花期的生理生化变化与抗旱性的关系[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(4): 98 - 102.
- [15] 李妮亚,高俊凤,汪沛洪. 小麦幼苗水分胁迫诱导蛋白的特征[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 65 - 71.
- [16] 徐民俊,刘桂茹,杨学举,等. 水分胁迫对抗旱性不同的冬小麦品种可溶性蛋白质的影响[J]. 河北农业大学学报, 2002, 20(3): 85 - 88.

(编辑:宗淑萍)

(上接第 61 页)

- [10] Eugenio Revilla, Eva Garc ía - Beneytez, Félix Cabello. Value of high - performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 915: 53 - 60.
- [11] Spayd S E, Tarara J M, Mee D L, et al. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries[J]. Am J Enol Vitic, 2002, 53(3): 171 - 182.
- [12] 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.
- [13] Maria Pilar Mart í, Montserrat Mestres, Cristina Sala. Solid - phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 7861 - 7865.
- [14] Eva Garc ía - Beneytez, Eugenio Revilla, Félix Cabello. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them [J]. Eur Food Res Technol, 2002, 215: 32 - 37.
- [15] José - María Ryan, Eugenio Revilla. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 3372 - 3378.
- [16] Eugenio Revilla, José - María Ryan, Guillermo Martí - Ortega. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes [J]. Agric Food Chem, 1998, 46(11): 592 - 4597.
- [17] G óñez - Plaza E, Gil - Muñoz R, López - Roca J M. Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminating variables of its ageing status [J]. Food Research International, 1999, 32: 503 - 507.

(编辑:张月清)