

RP-HPLC 法同时测定葡萄酒、果酒、果醋中 16 种单体酚的含量

孙翔宇^{1,2}, 杜国荣³, 马婷婷², 刘兴艳¹, 王晓宇², 战吉成¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083) (2. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西西安 710062) (3. 西安文理学院生物技术学院, 陕西西安 710065)

摘要: 新建一种同时适用于天然果蔬饮品葡萄酒、果酒、果醋中 8 种酚酸、4 种黄烷-3-醇、3 种黄酮醇、1 种芪类含量测定的 HPLC 分析方法。使用 Waters XBridge™ Shield RP18 (4.6×250 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 乙腈-冰乙酸-水溶液为流动相, 流速 0.8 mL/min, 进样量 20 μL, 梯度洗脱, 柱温 30.0 °C, DAD 检测器同时采集 280 nm 和 320 nm 下的信号。16 种单体酚均可有效分离, 各物质的含量与峰面积线性关系良好, 且回收率高, 重复性好, 具有定量准确、快速等特点。运用该方法测定了 3 种葡萄酒、3 种果酒、3 种果醋中 16 种单体酚的含量。结果表明, 干红葡萄酒、干白葡萄酒、桃红葡萄酒能被定量的单体酚分别有 14 种、14 种、9 种单体酚; 苹果酒中能被定量的单体酚有 7 种, 樱桃酒 7 种, 石榴酒 8 种; 苹果醋中能被定量的单体酚有 8 种, 柿子醋 9 种, 猕猴桃醋中 8 种。该方法准确、可靠, 可同时适于不同天然果蔬饮品葡萄酒、果酒、果醋中酚类物质含量的分析。

关键词: 葡萄酒; 果酒; 果醋; 单体酚; 反相高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2014)12-201-209

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.034

Simultaneous Determination of the Contents of 16 Types of Monophenols in Wine, Fruit Wine, and Fruit Vinegar by RP-HPLC

SUN Xiang-yu^{1,2}, DU Guo-rong³, MA Ting-ting², LIU Xing-yan¹, WANG Xiao-yu², ZHAN Ji-cheng¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

(3. Department of Life Science, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an 710065, China)

Abstract: A new method based on HPLC was established for the simultaneous determination of the contents of eight types of phenolic acids, four types of flavan-3-alcohols, three types of flavonols, and one type of stilbene in natural fruit and vegetable products, including wine, fruit wine, and fruit vinegar. Chromatographic separation was performed using a Waters XBridge™ Shield RP18 (4.6×250 mm, 3.5 μm) column at 30 °C with an acetonitrile/acetic acid/water mixture as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min. The injection volume was 20 μL; gradient elution was applied and a diode array detector (DAD) was used to monitor signals at 280 nm and 320 nm. All 16 monophenols were successfully separated and their contents showed good linear relationships with the peak areas. The method had a high recovery rate, good repeatability, good accuracy, and high speed. The contents of 16 types of monophenols in three wines, three fruit wines, and three fruit vinegars were determined using this method. The results suggested that fourteen, fourteen, and nine types of monophenols could be quantified in dry red wine, dry white wine, and rosé wine, respectively; seven, seven, and eight types could be quantified in apple wine, cherry wine, and pomegranate wine, respectively; eight, nine, and eight types could be quantified in apple vinegar, persimmon vinegar, and kiwifruit vinegar, respectively. The results indicated that the method was accurate and reliable, and was suitable for the analysis of different monophenols in various fruit and vegetable drinks including wine, fruit wine, and fruit vinegar.

Key words: wine; fruit wine; fruit vinegar; monophenol; reversed phase high performance liquid chromatography

收稿日期: 2014-05-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31301526); 国家十二五科技支撑计划 (2012BAD31B07); 国家公益性行业科研专项 (2012104019-3)

作者简介: 孙翔宇 (1988-), 男, 在读博士, 研究方向为葡萄科学与葡萄酒酿造

通讯作者: 王晓宇 (1979-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为葡萄科学与葡萄酒酿造; 战吉成 (1972-), 男, 副教授

流行病学研究结果显示: 适量消费天然果蔬类饮品可以降低癌症、血小板聚集、心脑血管疾病和动脉粥样硬化等多种疾病的发病率^[1~2]。以葡萄酒、果酒、果醋为代表的天然果蔬类饮品中含有大量的多酚类物质, 这些多酚类物质不仅与天然果蔬类饮品的色泽、风味等品质指标密切相关, 而且天然果蔬类饮品的各种保健功效也被认为由这些物质的抗氧化能力所贡献^[2~4]。所以, 对葡萄酒、果酒、果醋等天然果蔬类饮品中酚酸、黄烷-3-醇、黄酮醇、芪类等重要多酚类物质的分析检测具有重要意义。

多酚类物质主要结构是苯环, 其结构中有一个或多个羟基。基于它们碳环结构的差异, 可将多酚类分为类黄酮和非类黄酮类物质。天然果蔬类饮品中, 非类黄酮类物质主要是酚酸(对羟基肉桂酸和对羟基安息香酸)和芪类(白藜芦醇)。酚酸类属于小分子量物质, 包括对羟基安息香酸(没食子酸、香草酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸及龙胆酸等)、对羟基肉桂酸(咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸及它们的衍生物); 芪类主要为反式和顺式白藜芦醇。类黄酮类物质主要包括花色苷、黄酮醇和黄烷-3-醇, 以及少量存在的黄酮和类黄酮醇, 它们之间的区别在于苯环上的羟基和甲氧基的数量及位置不同。这些基本结构以糖基化的形式或者以相应的糖苷形式或酯化形式存在^[1]。

目前, 常用的多酚类物质检测方法有光谱法^[1]、电化学法^[5]和色谱法^[6~9]等。其中高效液相色谱法(HPLC)是近年来最常用的分析方法。该法具有分辨率高、分析速度快、重复性好、定量分析准确和精确度高等优点。但是由于天然果蔬类饮品中酚类物质结构复杂、种类繁多, 利用HPLC分析测定天然果蔬类饮品中单体酚类物质时常常会遇到各个单体酚分离困难, 单检测波长无法检出所有单体酚等问题。国内外测定果蔬类饮品中酚类物质有一些报道^[6~9], 但多为分别测定酚酸、黄烷-3-醇、黄酮醇、芪类, 并只适用于某一类天然果蔬饮品^[6~7, 11~12]。目前尚无可广泛适用于天然果蔬类饮品葡萄酒、果酒、果醋等, 并同时检测酚酸类、黄酮醇、黄烷-3-醇和芪类的报道。因此, 本研究的目的在于建立一种广泛适用于主要天然果蔬类饮品葡萄酒、果酒、果醋的, 并可同时测定中酚酸类、黄酮醇、黄烷-3-醇和芪类的HPLC方法。以期天然果蔬类饮品分析检测提供新的参考, 促进天然果蔬类饮品产业发展。

1 材料与方 法

1.1 样 品

样品: 葡萄酒购自大型超市, 包含一款红葡萄酒、一款白葡萄酒, 一款桃红葡萄酒。果酒: 苹果酒, 樱桃酒, 石榴酒; 果醋: 苹果醋, 柿子醋, 猕猴桃醋均由本实验室酿制。

1.2 仪器与试剂

Waters Breeze 1525 二元高压液相色谱仪, 含 Waters 2487 二极管阵列检测器和 2414 视差折光检测器, 色谱工作站, 温控柱温箱; Waters XBridge™ Shield RP18 (4.6×250 mm, 3.5 μm) 色谱柱; BS 224S 天平, 0.1 mg, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; SHD-III 循环水式多用真空泵, 巩义予华仪器设备有限公司; RE-52 旋转蒸发器, 上海安亭生化仪器厂; JPCQ0328 型全数字超声波发生器, 武汉嘉鹏电子有限公司; T-50 砂芯过滤器, 天津津腾实验设备有限公司。

黄烷-3-醇类(儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素没食子酸酯)、黄酮醇类(槲皮素、芦丁、根皮苷)、对羟基肉桂酸类(咖啡酸、阿魏酸、绿原酸、对香豆酸)、对羟基苯甲酸类(香草酸、没食子酸、龙胆酸、水杨酸)、芪类(白藜芦醇)均购自美国 Sigma 公司。乙腈(色谱纯)美国 Spectrum 公司; 甲醇(色谱纯)、乙酸、乙酸乙酯(分析纯)天津天力。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制

准确称取儿茶素、表儿茶素等 16 种标准品各 20.0 mg, 分别用甲醇定容至 10 mL 棕色容量瓶中, 得到各标准品的标准储备液, -30 °C 保存备用。使用前, 根据实验需要将标准储备液甲醇稀释至适合浓度配制标准工作液和混合标准工作液。

1.3.2 样品处理

葡萄酒(30 mL) → 乙酸乙酯萃取 3 次(2 倍料液比) → 减压浓缩至干 → 提取物 → 甲醇溶解, 定容至 10 mL(白葡萄酒 1.5 mL) → -30 °C 保存待测

3 次重复, 测定样品前经 0.22 μm 微孔滤膜过滤^[10]。

果酒(30 mL) → 乙酸乙酯萃取 3 次(2 倍料液比) → 减压浓缩至干 → 提取物 → 甲醇溶解, 定容至 5 mL → -30 °C 保存待测
3 次重复, 测定样品前经 0.22 μm 微孔滤膜过滤^[10]。

果醋(100 mL) → 乙酸乙酯萃取 3 次(2 倍料液比) → 合并有机相 → 减压浓缩至干(<35 °C) → 提取物 → 色谱甲醇溶解, 定容至 5 mL → -30 °C 避光保存待测

测定样品前经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样。

1.3.3 色谱条件的优化

检测波长: 利用 Waters 2487 二极管阵列检测器对

16种单体酚标准样品进行最大吸收光谱扫描,分析最适检测波长。

柱温与流动相流速: 试验比较了不同色谱柱温度条件下16种单体酚混合标准品以及样品中色谱峰的分​​离情况。同时,实验比较了不同流动相流速条件下16种单体酚混合标准品以及样品中色谱峰的分​​离情况,分析最佳柱温与流动相流速。

洗脱梯度: 依据待测物性质分析与并查阅相关文献,试验比较了不同流动相体系对16种酚类物质混合标准品以及不同类型样品中各种单体酚色谱峰的分​​离效果。

1.3.4 方法学考察

线性关系与检出限: 在最佳色谱条件下,选取定量下限浓度以上的不同浓度混合标准工作液进行液相分析,分别获得各自的峰面积,通过建立样品浓度与峰面积的标准曲线,计算标准曲线的回归方程及相关系数,考察线性相关性。将配制的混合标准品储备液逐步稀释,并以信噪比(R_{SN})为3时所对应标准溶液中所含组分的含量为检出限(LOD)^[13]。

精密性与加标回收率: 向已知单体酚含量的样品6份,定量精密添加标准品的混合标准工作液,充分混匀后按照1.3.2制备样品(n=6)。在最佳条件下测定16种单体酚的回收率^[13]。

$$\text{加标回收率} = \frac{(\text{加标试样测定值} - \text{试样测定值})}{\text{加标量}} \times 100\%$$

标样和样品重复性与稳定性: 取同一批次的混合标准工作液和样品溶液,在最佳条件下连续测定6次,记录峰面积与保留时间,并计算各单体酚的含量,计算RSD值^[13],分析标样与样品的重复性。

取同一批次的混合标准工作液和样品溶液,在最佳条件下分别于0、2、4、6、8、12、16、20、24、48h进样,记录峰面积与保留时间,并计算各单体酚的含量,计算RSD值,分析标样与样品的稳定性。

1.3.5 样品测定

在优化后的色谱条件分别测定3种葡萄酒、3种果酒、3种果醋16种单体酚的含量,分析方法对于样品的适用性。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的确定

最大吸收光谱扫描结果表明280nm与320nm为最合适波长(表1):在这两个波长下,单体酚能够具有较​​强的特征吸收,280nm波长下,龙胆酸无特征吸

收,在320nm波长下,儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、香草酸无特征吸收(表1)。综合考虑选择采用DAD检测器同时采集2个特征吸收波长(280nm测定龙胆酸、320nm测定其它15种单体酚)下的信号同时检测。

2.1.2 柱温与流动相流速

表1 16种单体酚检测波长

Table 1 Detection wavelength of 16 monophenols

单体酚	280 nm	320 nm
黄烷-3-醇		
儿茶素	√	×
表儿茶素	√	×
表儿茶素没食子酸酯	√	√
表没食子儿茶素没食子酸酯	√	×
黄酮醇		
槲皮素	√	√
芦丁	√	√
根皮苷	√	√
芪类		
反式白藜芦醇	√	√
对羟基肉桂酸		
咖啡酸	√	√
阿魏酸	√	√
绿原酸	√	√
对香豆酸	√	√
对羟基苯甲酸		
香草酸	√	×
没食子酸	√	√
龙胆酸	×	√
水杨酸	√	√

注:√代表有较强吸收;×代表无较强吸收。

试验比较了色谱柱温度在25.0、30.0、35.0和40.0℃4个柱温条件下16种单体酚混合标准品以及样品中色谱峰的分​​离情况。结果发现,在所考察的4个温度条件中,30.0℃的分​​离度最佳,因此本试验采用色谱柱温为30.0℃。同时,实验比较了流动相流速在0.6~1.0mL/min内16种单体酚混合标准品以及样品中色谱峰的分​​离情况,结果发现,流速0.8mL/min时出峰效果最好,确定流速为0.8mL/min。

2.1.3 洗脱梯度

试验比较了不同流动相体系,包括水:乙酸(98:2)-乙腈、甲醇:乙酸:水(10:2:88)-甲醇:乙酸:水(90:2:8)、水-10%冰乙酸(90:10)、乙酸:水(10:90)-乙酸:乙腈(10:90)、乙腈:乙酸(98:2)-水:乙酸(98:2)等,对16种酚类物质混合标准品以及不同类型样品中各种

单体酚色谱峰的分离效果,其中以流动相 A: 乙腈-冰乙酸 (98:2, V/V), 流动相 B: 水-冰乙酸 (98:2, V/V) 分离效果较好。

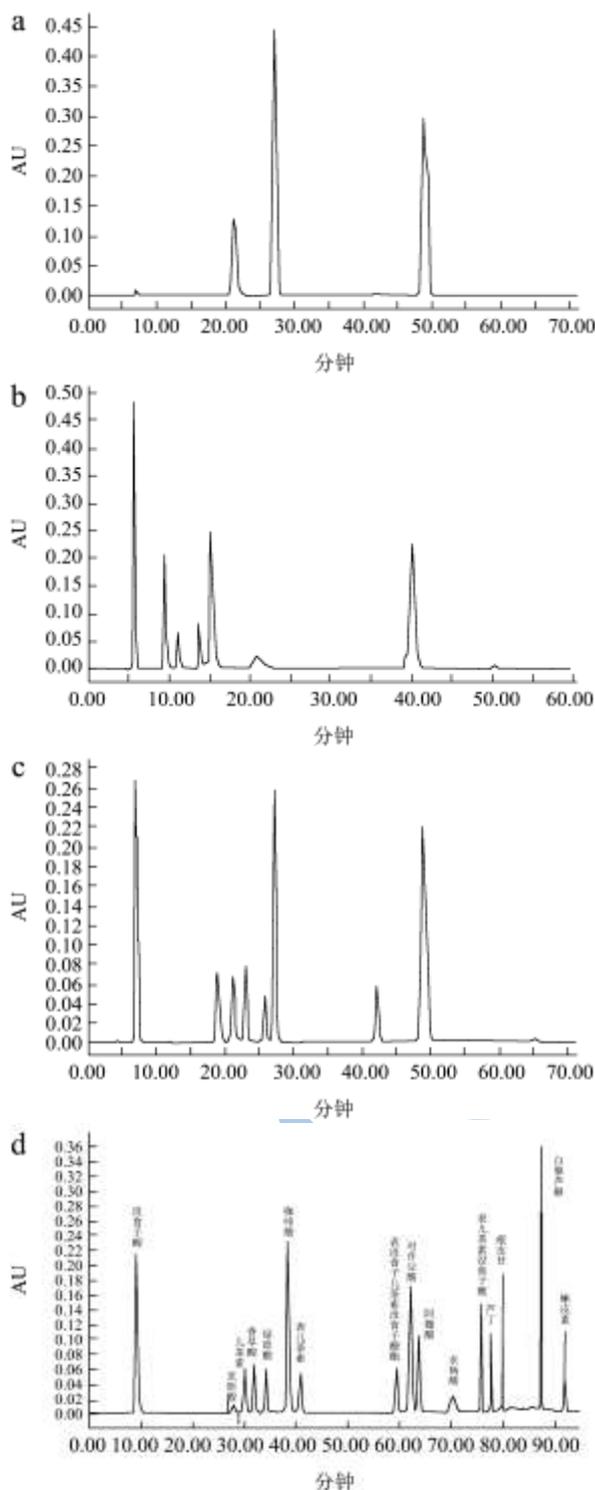


图 1 16 种单体酚标准品色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of the standards of 16 types of monophenols

注: a: 等度洗脱; b、c: 梯度洗脱优化; d: 最佳色谱条件。

由于待分离的酚类物质其化学结构、性质以及保留时间相近, 各组分极性相差很小, 采用等度洗脱不能将待测组分完全分离 (图 1a)。因此试验还摸索了不同的梯度洗脱 (图 1b、c、d), 根据试凑实验法^[14], 经多次实验确定, 按照表 2 色谱条件洗脱程序, 可使样品中各待测组分达到良好的基线分离。试验结果表明, 采用上述梯度洗脱程序条件, 所有色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 能够达到完全分离, 并且峰形尖锐, 对称性好, 可满足多 16 中单体酚的同时分离。

表 2 二元梯度洗脱程序

Table 2 Secondary gradient elution program

洗脱时间/min	流动相 A/%	流动相 B
0~60	5~15	95~85
60~65	15	85
65~66	15~20	85~80
66~73	20	80
73~74	20~30	80~70
74~80	30	70
80~81	30~40	70~60
81~93	40	60
93~95	40~5	60~95

最终优化后的色谱条件为: 色谱柱采用 Waters XBridge™ Shield RP18 (4.6×250 mm, 3.5 μm)。采用二元梯度洗脱: 流动相 A: 乙腈-冰乙酸 (98:2, V/V), 流动相 B: 水-冰乙酸 (98:2, V/V)。洗脱程序见表 2。流速 0.8 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温 30.0 °C, 采用 DAD 检测器同时采集 2 个特征吸收波长 (280 nm、320 nm) 下的信号。按照优化的色谱条件, 混合标准工作液、样品的 HPLC 图见图 1D、图 2。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系与检出限

16 种单体酚的浓度范围、线性方程、相关系数和检出限结果见表 3。从表中可以看出, 没食子酸等 16 种单体酚标准品的相关系数(R²)均大于 0.999, 质量浓度和相应峰面积呈良好线性关系。并且它们的最低检测限都较低, 能满足定量分析要求, 说明此方法灵敏度较高。

2.2.2 精密度与加标回收率

最佳色谱条件下, 16 种单体酚的回收率结果如表 4 所示。16 种单体酚的回收率为 85%~119%, 回收率的 RSD 在 4.0% 以下。该结果表明该方法精密度良好, 加标回收率符合要求。

表 3 16 种单体酚检测波长、保留时间、回归方程和检测限

Table 3 Detection wavelength, retention time, regression equation, and limit of detection of 16 monophenols

单体酚	检测波长/nm	保留时间/min	线性范围 w/(mg/L)	线性方程	R ²	检出限/(mg/L)
没食子酸	280	8.939	1-100	y = 66331x - 19795	0.9997	0.0548
龙胆酸	320	27.554	1.4-140	y = 35276x - 42695	0.9998	0.0988
儿茶素	280	29.543	1.5-150	y = 16851x - 17454	0.9995	0.2215
香草酸	280	31.458	0.5-50	y = 45101x - 12245	0.9993	0.0755
绿原酸	280	33.690	0.5-50	y = 72015x - 29033	0.9996	0.0439
咖啡酸	280	37.771	1-100	y = 135044x - 52606	0.9996	0.0251
表儿茶素	280	40.058	1-100	y = 17878x - 10643	0.9996	0.1683
表没食子儿茶素没食子酸酯	280	58.524	0.5-50	y = 34463x - 17113	0.9996	0.0872
对香豆酸	280	61.335	0.5-50	y = 164593x - 34824	0.9997	0.0233
阿魏酸	280	63.033	0.5-50	y = 142000x - 37844	0.9997	0.0249
水杨酸	280	69.563	1-100	y = 14238x - 25355	0.9994	0.4176
表儿茶素没食子酸酯	280	75.277	0.5-50	y = 35810x - 5208	0.9996	0.0484
芦丁	280	77.385	1-100	y = 23730x - 4750.9	0.9996	0.0682
根皮苷	280	80.002	0.5-150	y = 44172x - 8625.5	0.9998	0.0443
反式白藜芦醇	280	87.284	0.5-50	y = 186103x - 11800	0.9992	0.0069
槲皮素	280	91.742	0.5-50	y = 66331x - 19795	0.9997	0.0427

表 4 16 种单体酚精密度和加标回收率实验结果

Table 4 Accuracy and recoveries of standard addition of 16 monophenols

单体酚	本底值/(mg/L)	加标浓度/(mg/L)	测定值/(mg/L)	RSD/%	回收率/%
没食子酸	34.1488	10.9752	51.3697	2.1883	113.8412
龙胆酸	4.5110	22.5815	25.6682	1.7388	94.7426
儿茶素	49.1632	16.8061	78.7163	2.1952	119.3225
香草酸	1.8600	8.0233	9.7685	1.3484	98.8379
绿原酸	7.3396	7.1100	14.1948	3.5245	98.2360
咖啡酸	7.6685	7.0552	16.7434	1.2421	113.7171
表儿茶素	20.8318	13.1947	29.5151	0.6580	86.7415
表没食子儿茶素没食子酸酯	1.2528	8.1245	8.6386	1.6834	92.1213
对香豆酸	4.4317	7.5947	13.7529	0.8649	114.3557
阿魏酸	0.3967	8.2672	9.0164	0.4922	104.0685
水杨酸	1.8085	16.3653	15.4696	1.8593	85.1206
表儿茶素没食子酸酯	0.3420	7.3572	8.2164	0.4922	106.7176
芦丁	1.6074	16.3988	19.1177	1.5702	106.1728
根皮苷	1.760	8.0000	8.7785	2.532	100.212
反式白藜芦醇	1.8455	8.0258	9.5520	0.7713	96.7662
槲皮素	0.2218	8.2964	9.3502	0.7230	109.7673

2.2.3 标样和样品重复性与稳定性

最佳色谱条件下，标样和样品重复性结果见表 5。经计算，峰面积和保留时间的 RSD(n=6)值均较低，表明该测定方法的重复性良好。同时，在最佳色谱条件下标样和样品稳定性结果见表 5，经计算，峰面积和保留时间的 RSD(n=6)值均较低，表明供试品溶液在 48 h 内稳定，该测定方法的稳定性良好。

2.3 样品中单体酚含量的分析结果

按上述优化条件分别测定 3 种葡萄酒、3 种果酒、3 种果醋 16 种单体酚的含量，结果见表 6。

测定结果表明，葡萄酒所含单体酚含量较高。干红葡萄酒中、干白葡萄酒、桃红葡萄酒分别可检出 14 种、14 种、9 种单体酚；红葡萄酒单体酚总和达 287.71 mg/L；桃红葡萄酒次之，为 96.6 mg/L；白葡萄酒最低，为 22.03 mg/L。没食子酸、儿茶素、表儿茶素是葡萄酒中的主要单体酚。表没食子儿茶素没食子酸酯、根皮苷在红、白、桃红葡萄酒中均未检测到。测定结果与文献报道结果基本一致^[6-7]，但本试验葡萄酒样品均未检测出表没食子儿茶素没食子酸酯，而温鹏飞^[6]报道红葡萄酒 1.45~6.22 mg/L，白葡萄酒 0.04~0.19 mg/L，这可能与葡萄酒样品的品种、产地等不同有关。

与红葡萄酒相比，所测三种果酒中单体酚含量较低，与白葡萄酒单体酚含量处于同一数量级。苹果酒、樱桃酒、石榴酒单体酚总和分别为 8.6 mg/L、30.38

mg/L 和 19.65 mg/L。苹果酒中能被定量的单体酚有 7 种，樱桃酒有 7 种。石榴酒中有 8 种。Sun^[12]报道苹果中富含绿原酸、表儿茶素及根皮苷，本实验也证实苹果酒中富含绿原酸、表儿茶素，但没有检测到根皮苷的存在。Sun^[8]报道樱桃酒中含有绿原酸、新绿原酸、羟基苯甲酸、对香豆酸、肉桂酰奎尼酸、咖啡酸等，与之相比，本实验结果不尽相同，我们同样发现樱桃酒中含有绿原酸、咖啡酸，与 Sun^[8]不同的是，本实

验中还在樱桃酒检测到龙胆酸、儿茶素、香草酸、白藜芦醇和槲皮素。Qu^[4]报道石榴饮品中含有没食子酸、鞣花酸、安石榴甙 A，安石榴甙 B 等，与之相比，我们还发现石榴酒中含有儿茶素、香草酸、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯和槲皮素，其中石榴酒所含表没食子儿茶素没食子酸酯含量为 3.51 mg/L，为本实验所检测九种天然果蔬类饮品中含量最高。

表 5 标样和样品测定重复性和稳定性实验结果

Table 5 Reproducibility and stability tests for standard and sample measurements

单体酚	重复性				稳定性			
	标准品		样品		标准品		样品	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
没食子酸	0.3650	3.3020	0.6498	3.3500	0.1435	2.4362	0.8321	3.4583
龙胆酸	0.3571	3.6033	0.5253	3.1202	0.2554	2.6235	0.7434	4.2727
儿茶素	0.5952	3.3755	0.6375	3.1007	0.6839	3.5423	0.9523	3.7648
香草酸	0.4291	4.8976	0.5595	2.7016	0.4462	3.8654	0.3575	3.2627
绿原酸	0.6166	1.1845	0.5834	2.9488	0.6561	0.5232	0.5462	2.3577
咖啡酸	0.4810	1.5109	0.5951	3.2679	0.3524	1.4563	0.7654	4.6245
表儿茶素	0.6009	3.2679	0.5972	2.2999	0.3630	2.7657	0.2743	3.6466
表没食子儿茶素没食子酸酯	0.4344	2.9744	0.3899	1.2228	0.2637	1.8721	0.6544	2.2648
对香豆酸	0.3206	1.8095	0.1706	2.2803	0.5265	1.5321	0.3622	4.2456
阿魏酸	0.2941	1.6929	0.0829	1.8176	0.1346	0.5472	0.1536	2.4575
水杨酸	0.2813	4.6708	0.1182	2.5710	0.2346	3.9432	0.1532	4.5773
表儿茶素没食子酸酯	0.1741	4.4593	0.0961	3.5215	0.7264	4.6577	0.0823	3.5352
芦丁	0.0879	3.4672	0.6645	2.2788	0.0153	2.4853	0.1753	2.3246
根皮苷	0.0465	2.3652	0.4545	3.3658	0.0425	1.8568	0.0543	3.3437
反式白藜芦醇	0.0526	1.4795	0.0435	3.9515	0.0132	0.8437	0.2366	2.9552
槲皮素	0.0766	3.5016	0.0327	2.1351	0.0544	2.6592	0.1643	2.3426

所测三种果醋中单体酚含量与果酒和白葡萄酒类似。苹果醋、柿子醋、猕猴桃醋单体酚总和分别为 13.1 mg/L、24.77 mg/L 和 16.97 mg/L。苹果醋中能被定量的单体酚有 8 种，分别为没食子酸、香草酸、绿原酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、表儿茶素没食子酸酯和根皮苷。与苹果酒相比，苹果醋比其多检测到两种单体酚表儿茶素没食子酸酯和根皮苷。柿子醋中能被定量的单体酚有 9 种。柿子醋检测到没食子酸、儿茶素、香草酸、绿原酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、表儿茶素没食子酸酯和根皮苷。Chen^[9]报道柿子中存在五种单体酚：没食子酸、绿原酸、表儿茶素没食子酸酯、儿茶素、表儿茶素，与之相比，本实验还检测到香草酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、表儿茶素没食子酸酯和根皮苷的存在。猕猴桃醋中检测到没食子酸、儿

茶素、香草酸、绿原酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸和根皮苷共 8 种单体酚。这与 Dawes^[9]报道猕猴桃多酚组成基本一致。

3 结论

3.1 多酚类化合物是一类分布十分广泛的植物次生代谢产物，是一类具有重要药理活性的天然产物。但因为许多单体酚其化学结构和性质相似，使其分离较难。高效液相色谱由于其灵敏度高、选择性强、色谱柱的选择范围宽、样品预处理简单和谱图简单等使其成为检测类黄酮化合物最常用的方法之一。目前，采用高效液相色谱法分离检测天然果蔬类饮品中单体酚组成有一些报道，但多数为分别测定酚酸、黄烷-3-醇、黄酮醇、芪类，并只适用于某一类天然果蔬饮品。

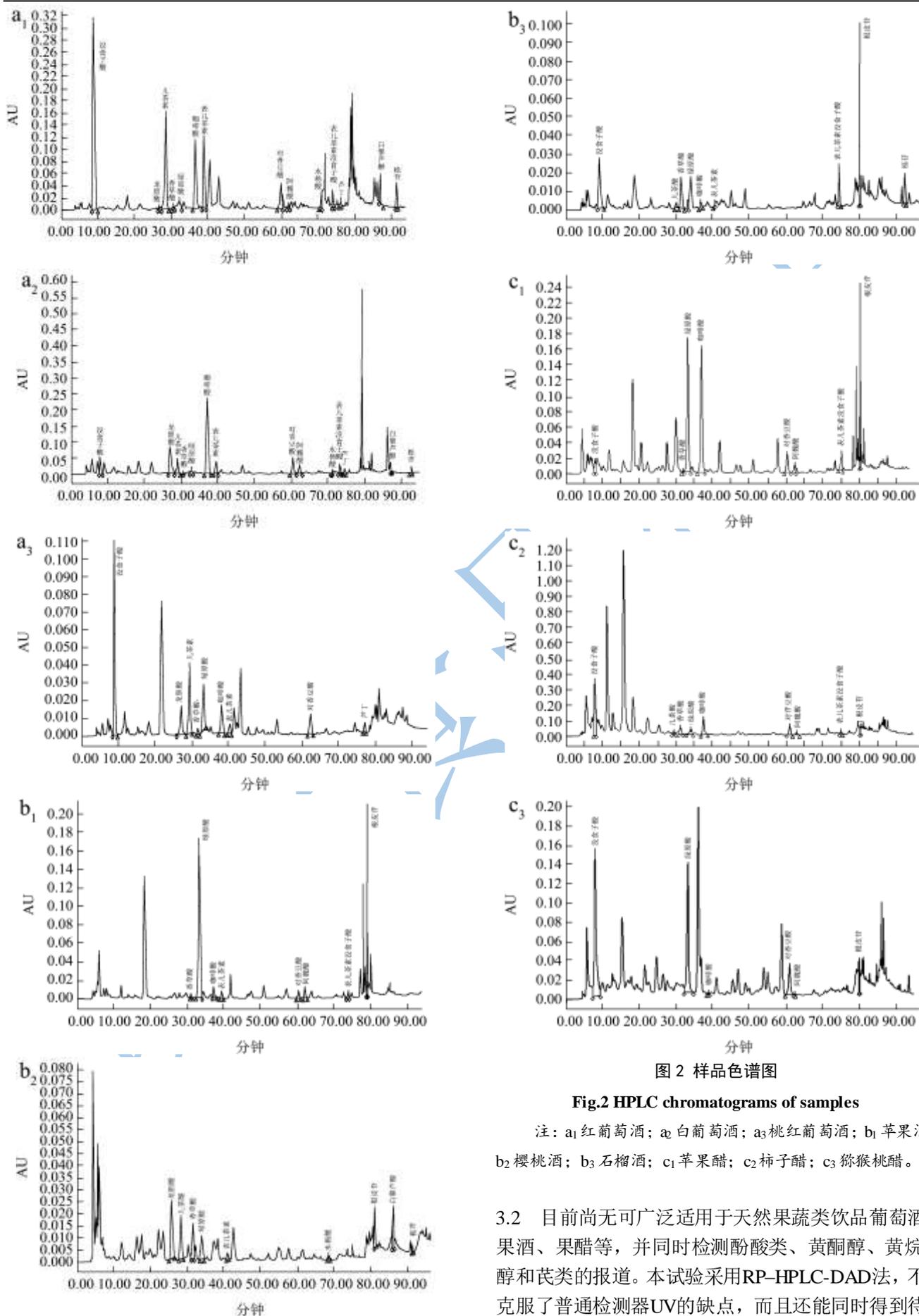


图 2 样品色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of samples

注: a₁ 红葡萄酒; a₂ 白葡萄酒; a₃ 桃红葡萄酒; b₁ 苹果酒; b₂ 樱桃酒; b₃ 石榴酒; c₁ 苹果醋; c₂ 柿子醋; c₃ 猕猴桃醋。

3.2 目前尚无广泛适用于天然果蔬类饮品葡萄酒、果酒、果醋等,并同时检测酚酸类、黄酮醇、黄烷-3-醇和芪类的报道。本试验采用RP-HPLC-DAD法,不仅克服了普通检测器UV的缺点,而且还能同时得到待测

组分的色谱和光谱信息,从而为样品分析提供了较为丰富的定性和定量信息;并通过对流动相、洗脱条件、柱温、流速等色谱条件的优化,在最有色谱条件下16种单体酚均得到了很好的分离。天然果蔬类饮品中含有丰富的酚类物质,但不同天然果蔬类饮品中酚类物质组成有一定差异,因此需建立一种快速的高效液相色谱法来同时检测天然果蔬类饮品中酚类物质组成。本实验建立了一种新的、同时测定葡萄酒、果酒、果

醋中16种单体酚含量的高效液相色谱分析方法,16种单体酚成分达到基线分离,分离度较好。经方法学验证,各单体酚的线性关系良好,检测限低,加样回收率准确度较高,相对标准偏差较好,将方法用于葡萄酒、果酒、果醋样品的测定,结果表明该方法准确、可靠,适于天然果蔬类饮品葡萄酒、果酒、果醋中酚类物质含量的分析。

表 6 样品中单体酚种类和含量分析

Table 6 The analysis of monophenol types and contents in samples (mg/L)

单体酚	葡萄酒			果酒			果醋		
	红葡萄酒	白葡萄酒	桃红葡萄酒	苹果酒	樱桃酒	石榴酒	苹果醋	柿子醋	猕猴桃醋
黄烷-3-醇									
儿茶素	124.11±2.49	4.68±0.11	31.94±3.27	tr	11.14±1.52	1.57±0.00	tr	0.16±0.05	1.47±0.25
表儿茶素	62.08±0.75	2.68±0.11	8.83±8.52	0.44±0.09	1.05±0.14	1.18±0.02	tr	tr	tr
表儿茶素	3.90±0.18	0.62±0.00	tr	tr	tr	tr	0.77±0.13	0.13±0.00	tr
没食子酸酯									
表没食子儿茶素	tr	tr	tr	0.19±0.04	tr	3.51±0.03	tr	tr	tr
素没食子酸酯									
黄酮醇									
槲皮素	4.58±0.06	0.40±0.02	tr	tr	0.50±0.06	3.09±0.02	tr	tr	tr
芦丁	3.61±0.02	0.36±0.02	2.26±0.53	tr	tr	tr	tr	tr	tr
根皮苷	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1.76±0.44	0.38±0.12	0.49±0.14
对羟基肉桂酸									
咖啡酸	13.92±0.24	4.63±0.31	7.09±6.12	0.24±0.05	tr	0.63±0.01	3.03±0.35	0.04±0.01	0.04±0.02
阿魏酸	0.54±0.01	0.48±0.03	tr	0.17±0.04	tr	tr	0.24±0.05	0.09±0.01	0.06±0.01
绿原酸	2.70±0.06	0.56±0.05	7.85±0.59	7.36±1.54	1.98±0.24	0.72±0.00	6.56±1.13	0.06±0.02	3.12±0.63
对香豆酸	3.07±0.05	0.58±0.03	2.35±1.99	0.10±0.02	tr	tr	0.33±0.12	0.03±0.01	0.34±0.10
对羟基苯甲酸									
香草酸	0.92±0.06	0.03±0.00	1.50±1.26	0.10±0.03	3.81±0.50	3.86±0.01	0.06±0.03	0.96±0.33	1.78±0.45
没食子酸	47.33±0.98	0.96±0.07	28.76±19.85	tr	tr	5.09±0.49	0.35±0.01	22.92±0.15	9.67±1.03
龙胆酸	2.03±0.00	5.69±0.34	6.02±1.40	tr	11.49±1.49	tr	tr	tr	tr
水杨酸	11.37±0.55	0.26±0.03	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
芪类									
反式白藜芦醇	1.55±0.06	0.10±0.01	tr	tr	0.41±0.05	tr	tr	tr	tr
总和	281.71	22.03	96.6	8.6	30.38	19.65	13.1	24.77	16.97

注: tr 代表痕量。

参考文献

[1] Li H, Wang X Y, Li Y, et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines [J]. Food Chemistry, 2009, 112(2): 454-460

[2] Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. Science, 1997, 275(5297): 218

[3] Chen X N, Fan J F, Yue X, et al. Radical scavenging activity and phenolic compounds in persimmon (Diospyros kaki L. cv. Mopan) [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(1): C24-C28

[4] Qu W J, Breksa A W, Pan Z L, et al. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products [J]. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1585-1591

- [5] 胡博然, 闻雯, 阴淑贞, 等. 电子顺磁共振波谱仪分析干红葡萄酒 DPPH 清除能力及其与总酚含量的关系[J]. 中国农业科学, 2012, 45(1): 135-141
HU Bo-ran, WEN Fei, YING Shu-zhen, et al. EPR spectroscopy studies on DPPH free radical scavenging activity of dry red wines and their relationship with total polyphenols content [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(1): 135-141
- [6] 王猛, 王敏, 李环宇, 等. 海红果酚类物质种类及其抗氧化能力的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(11): 2633-2637
WANG Meng, WANG Min, LI Huan-yu, et al. Malus micromalus makino polyphenols and its antioxidant activity [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(11): 2633-2637
- [7] 刘聪, 海妮, 张英. 红枣不同部位中有效成分含量的比较研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 258-261
LIU Cong, HAI Ni, ZHANG Ying. The content variation of phytochemicals in different parts of chinese jujube from different cultivars [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(3): 258-261
- [8] Sun S Y, Jiang W G, Zhao P Y. Comparison of aromatic and phenolic compounds in cherry wines with different cherry cultivars by HS-SPME-GC-MS and HPLC [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2012, 47(1): 100-106
- [9] Dawes H M, Keene J B. Phenolic composition of kiwifruit juice [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47: 2398-2403
- [10] María J C, Enrique D, Ramón N, et al. Characterisation of commercial aromatised vinegars: phenolic compounds, volatile composition and antioxidant activity [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(6): 1284-1302
- [11] 姜志奇, 王秀芹, 战吉成, 等. 苹果酒中酚酸、黄烷-3-醇的检测[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(10): 176-181
JIANG Zhi-qi, WANG Xiu-qi, ZHAN Ji-cheng, et al. Determination of phenolic acids and flavan-3-ols in dry cider of both fuji and ralls apples (*malus pumila mill.*) [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(10): 176-181
- [12] Sun L J, Guo Y R, Fu C C, et al. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(2): 1022-1029
- [13] 奉夏平, 曾宪远, 付丽敏, 等. 高效液相色谱法测定柑橘中 6 种防腐保鲜剂的残留[J]. 现代食品科技, 2013, 29(8): 2025-2029
FENG Xia-ping, ZHEN Xian-yuan, FU Li-min, et al. Detection of 6 preservative residues of in orange by high performance liquid chromatography [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(8): 2025-2029
- [14] Merken H M, Beecher G R. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 897: 177-184