

HPLC 法评估 25 种国产干红葡萄酒质量研究

李 巍, 张晓书, 辛立波, 赵余庆*

沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 对 25 种不同品牌、产地和年份的国产干红葡萄酒中 7 种活性成分(没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸)进行 HPLC 法同步检测, 为其质量评价提供科学依据。方法 采用 HPLC 法测定中国干红葡萄酒中没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸的量。色谱条件为 Kromasil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~21 min, 19%乙腈; 21~24 min, 19%~25%乙腈; 24~32 min, 25%~30%乙腈; 32~39 min, 30%~40%乙腈; 39~44 min, 40%~50%乙腈; 44~55 min, 50%~60%乙腈; 55~60 min, 60%~80%乙腈; 60~65 min, 80%~100%乙腈; 65~70 min, 100%乙腈; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长为 280 nm; 每次进样 10 μL。结果 实验所测中国干红葡萄酒中都含有没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸 7 种活性成分, 定量范围依次为 31.6~111.9、3.7~11.9、30.7~71.9、30.3~135.7、29.8~82.5、0.9~12.3、1.9~23.2 mg/L。结论 没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸 7 种活性成分可作为国产干红葡萄酒质量评价的指标, 它们的存在是干红葡萄酒品质的保障和保健作用的物质基础。

关键词: 干红葡萄酒; 活性成分; HPLC; 质量评价; 没食子酸; 原儿茶酸; 儿茶素; 表儿茶素; 原花青素 B₂; 白藜芦醇; 鞣花酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)18-2636-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.012

Quality assessment of 25 Chinese dry red wines by HPLC

LI Wei, ZHANG Xiao-shu, XIN Li-bo, ZHAO Yu-qing

College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective Using HPLC to simultaneously detect the phenolic compounds in active ingredients, such as gallic acid, protocatechuic acid, catechin, epicatechin, proanthocyanidin B₂, resveratrol, and ellagic acid, in 25 kinds of Chinese dry red wines with different brands, from different places, and in different years, and to provide the foundation for the quality assessment. **Methods** HPLC was applied to determining the content of each phenolic ingredient. The HPLC conditions were as follows: chromatographic column used as Kromasil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol (A)-H₂O-0.1% phosphoric acid (B). The gradient program was 0–21 min, 19% A; 24 min, 25% A; 32 min, 30% A; 39 min, 40% A; 44 min, 50% A; 55 min, 60% A; 60 min, 80% A; 65–70 min, 100% A. Mobile flow rate with 1 mL/min and the detective wavelength was 280 nm. **Results** The contents of gallic acid, protocatechuic acid, catechin, epicatechin, proanthocyanidin B₂, resveratrol, and ellagic acid in these wines were in the ranged of 31.6–111.9, 3.7–11.9, 30.7–71.9, 30.3–135.7, 29.8–82.5, 0.9–12.3, and 1.9–23.2 mg/L, respectively. **Conclusion** The seven phenolic compounds could be selected as the index ingredients to evaluate the quality of dry red wine from the different sources and the existence of them are guarantee of quality of dry red wine and the material basis of healthcare functions.

Key words: dry red wines; active ingredients; HPLC; quality assessment; gallic acid; protocatechuic acid; catechin; epicatechin; proanthocyanidin B₂; resveratrol; ellagic acid

葡萄酒的酿造已有几千年的历史, 葡萄酒是仅次于啤酒的第二大酒精性饮料。有研究学者报道, 长期饮用葡萄酒能够预防老年痴呆、有助于预防龋

齿^[1-3]。葡萄中含有丰富的多酚类化学成分, 这些成分在酿酒过程中大都溶入酒液中并发生纷繁复杂的变化, 这些变化不仅影响葡萄酒的外观色泽、口感

收稿日期: 2014-03-17

基金项目: 沈阳市科技计划项目 (F11-153-9-00); 辽宁省博士启动基金资助项目 (20111135)

作者简介: 李 巍 (1981—), 女, 讲师, 沈阳药科大学, 主要从事天然产物研究。Tel: (024)23986522 E-mail: wei_li1981@163.com

*通信作者 赵余庆 Tel: (024)23986521 E-mail: zyq4885@126.com

风味, 而且影响其营养保健功能。干红葡萄酒是葡萄酒酿造后, 酿酒原料(葡萄汁)中的糖分完全转化成酒精, 残糖量 ≤ 4.0 g/L 的红葡萄酒。目前对于干红葡萄酒品质评价的方法多数还局限于感官分析和单一成分的化学鉴定^[4]。对国产干红葡萄酒多种活性成分的检测和科学的质量评价研究鲜见报道。

本课题组前期已对部分市售干红葡萄酒活性成分白藜芦醇、儿茶素、表儿茶素的量进行了比较分析, 发现作为干红葡萄酒中活性成分的白藜芦醇, 在中国干红葡萄酒中普遍存在, 且其量较高, 充分说明了中国干红葡萄酒的品质^[5]。基于此, 本课题组为了接续研究, 收集了 25 种市售的国产干红葡萄酒, 并对其进行 7 种活性成分(没食子酸、原儿茶酸、原花青素 B₂、鞣花酸、白藜芦醇、儿茶素和表儿茶素)的 HPLC 同步测定, 为国产干红葡萄酒

活性成分的质量和评价提供科学依据和可行的方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪、UV L-2400 紫外可见分光光度计, 日本 Hitachi 集团; Sartorius 电子天平, 北京赛多利斯天平有限公司。

没食子酸(批号 5995-86-8)、原儿茶酸(批号 99-50-3)、原花青素 B₂(批号 26106-49-8)、鞣花酸(批号 476-66-4)和白藜芦醇(批号 501-36-0)对照品, 质量分数 $>98\%$, 由天津市科曼思特医药科技发展有限公司提供; 儿茶素(批号 878-200102, 质量分数 $>99\%$)、表儿茶素对照品(批号 877-200001, 质量分数 $>99\%$)由中国食品药品检定研究院提供。乙腈为色谱纯、蒸馏水采用三重蒸馏水。各种干红葡萄酒由研究室收集, 具体信息见表 1。

表 1 25 种红酒样品基本信息

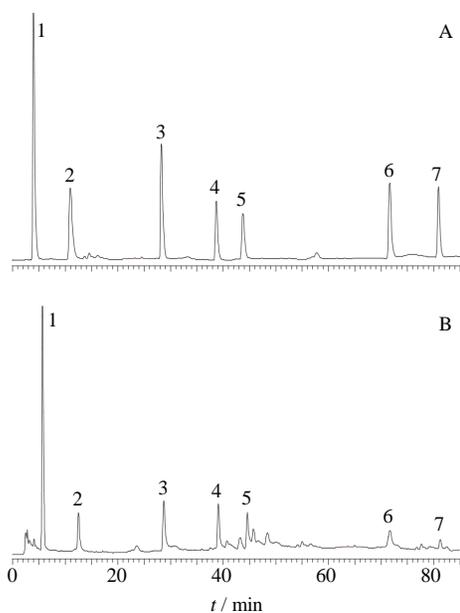
Table 1 Basic information on samples of 25 kinds of red wines

编号	红酒样品	生产厂家	生产年份
1	张裕干红葡萄酒 1892 (优选级)	烟台张裕葡萄酒股份有限公司	2000
2	张裕干红葡萄酒 (双星)	烟台张裕葡萄酒股份有限公司	2011
3	张裕干红葡萄酒 (5 星)	烟台张裕葡萄酒股份有限公司	2011
4	张裕干红葡萄酒解百纳 (优选级)	烟台张裕葡萄酒股份有限公司	2011
5	张裕干红葡萄酒特制百年	烟台张裕葡萄酒股份有限公司	2011
6	张裕干红葡萄酒解百纳 (特选级)	烟台张裕葡萄酒股份有限公司	2011
7	张裕干红葡萄酒 (优选级)	烟台张裕葡萄酒股份有限公司	2010
8	张裕干红葡萄酒美乐 (优选级)	烟台张裕葡萄酒股份有限公司	2010
9	长城干红葡萄酒赤霞珠 (3 星)	中粮沙城产区怀涿盆地	2011
10	长城干红葡萄酒赤霞珠 (特酿 8 年)	中粮沙城产区怀涿盆地	2011
11	长城干红葡萄酒红标	中国粮油食品有限公司	2011
12	长城海岸葡萄酒红色庄园干红 (精选级)	中国粮油食品有限公司	2010
13	华夏长城干红葡萄酒赤霞珠	中国粮油食品有限公司	2010
14	长城葡萄酒精品至醇干红	中国粮油食品有限公司	2010
15	长城海岸葡萄酒解百纳干红	中国粮油食品有限公司	2008
16	长城天赋葡萄酒赤霞珠干红	中国粮油食品有限公司	2011
17	长城干红葡萄酒长城赤霞珠	中国粮油食品有限公司	2011
18	长城干红葡萄酒赤霞珠特制	中国粮油食品有限公司	2009
19	长城干红葡萄酒解百纳 (特制 5 年)	中国粮油食品有限公司沙城产区	2011
20	长城干红葡萄酒解百纳 (3 年)	中国粮油食品有限公司沙城产区	2011
21	长城干红葡萄酒蛇龙珠	中国粮油食品有限公司沙城产区	2010
22	长城干红葡萄酒蛇龙珠 (3 年)	中国粮油食品有限公司沙城产区	2011
23	长城干红葡萄酒解百纳 (特酿 3 年)	中国粮油食品有限公司沙城产区	2011
24	长城干红葡萄酒解百纳 (5 年盛藏)	中国粮油食品有限公司沙城产区	2009
25	卡斯特金牌窖藏干红葡萄酒	烟台市埃维堡酒业公司	2011

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相采用乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~21 min, 19%乙腈; 21~24 min, 19%~25%乙腈; 24~32 min, 25%~30%乙腈; 32~39 min, 30%~40%乙腈; 39~44 min, 40%~50%乙腈; 44~55 min, 50%~60%乙腈; 55~60 min, 60%~80%乙腈; 60~65 min, 80%~100%乙腈; 65~70 min, 100%乙腈; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长为 280 nm; 每次进样 10 μL。色谱图见图 1。



1-没食子酸 2-原儿茶酸 3-儿茶素 4-原花青素 B₂ 5-表儿茶素
6-白藜芦醇 7-鞣花酸
1-gallic acid 2-protocatechuic acid 3-catchin 4-proanthocyanidin B₂
5-epicatchin 6-resveratrol 7-ellagic acid

图 1 混合对照品 (A) 和华夏长城干红葡萄酒赤霞珠样品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and Huaxia Great Wall red wine Cabernet Sauvignon (B)

2.2 标准曲线的制备

分别精确称取白藜芦醇、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、原儿茶酸、没食子酸、鞣花酸对照品各 2 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。精密吸取适量混合对照品溶液, 进样测定峰面积值。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归。没食子酸标准曲线 $Y=2\ 350\ 743 X-273\ 975$, $R^2=0.996\ 5$, 结果表明, 没食子酸在 0.2~2.8 μg 线性关系良好; 原儿

茶酸标准曲线 $Y=788\ 910 X-111\ 788$, $R^2=0.999\ 8$, 结果表明, 原儿茶酸在 0.2~2.8 μg 线性关系良好; 儿茶素标准曲线 $Y=540\ 822 X-73\ 815$, $R^2=0.999\ 7$, 结果表明, 儿茶素在 0.2~2.8 μg 线性关系良好; 表儿茶素标准曲线 $Y=602\ 376 X-99\ 405$, $R^2=0.999\ 4$, 结果表明, 表儿茶素在 0.2~2.8 μg 线性关系良好; 原花青素 B₂ 标准曲线 $Y=85\ 567 X-57\ 927$, $R^2=0.999\ 1$, 结果表明, 原花青素 B₂ 在 0.2~2.8 μg 线性关系良好; 鞣花酸标准曲线 $Y=994\ 654 X-213\ 775$, $R^2=0.999\ 7$, 结果表明, 鞣花酸在 0.2~2.8 μg 线性关系良好; 白藜芦醇标准曲线 $Y=285\ 053 X-36\ 380$, $R^2=0.999\ 1$, 结果表明, 白藜芦醇在 0.2~2.8 μg 线性关系良好。

2.3 精密度试验

精密称取长城干红葡萄酒赤霞珠酒样 10 μL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 共 6 份, 连续进样 6 次, 测定色谱峰面积。结果显示没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸峰面积的 RSD 分别为 1.92%、1.13%、0.98%、1.02%、0.99%、1.23% 和 0.91%, 表明本实验测定方法的精密密度良好。

2.4 重复性试验

精密称取长城干红葡萄酒赤霞珠酒样 10 μL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 共 6 份, 进样, 测定色谱峰面积, 计算各成分的质量浓度。结果显示没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸质量浓度的 RSD 分别为 1.01%、1.11%、1.23%、0.82%、0.93%、1.71% 和 0.94%, 表明本实验测定方法的重复性良好。

2.5 稳定性试验

分别在 0、4、8、12、24 h 精密吸取长城干红葡萄酒赤霞珠酒样 10 μL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 进样, 测定色谱峰面积。结果显示没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸峰面积的 RSD 分别为 1.12%、1.00%、1.14%、1.42%、0.97%、1.36% 和 1.02%, 表明在 24 h 内供试品溶液性质稳定。

2.6 加样回收率试验

精密称取长城干红葡萄酒赤霞珠酒样, 共 6 份, 分别加一定量的没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸对照品, 分别精密吸取 10 μL 进样, 测定, 平均回收率分别为 99.34%、99.51%、99.79%、99.31%、99.83%、

100.12% 和 99.63%，RSD 分别为 0.94%、0.99%、0.98%、1.32%、1.61%、0.84% 和 0.97%。

2.7 样品测定

按“2.1”项色谱条件，依次取 25 种不同品牌、

生产厂家和年份的干红葡萄酒样品，过 0.22 μm 滤膜超滤后进行 7 种成分的 HPLC 测定，结果见表 2。

3 讨论

本实验采用 HPLC/UV 法首次对 25 种国产干红

表 2 25 种干红葡萄酒中 7 种活性成分的定量测定结果

Table 2 Quantitative determination of index components in 25 kinds of dry red wines

编号	质量浓度 / (mg·L ⁻¹)						
	没食子酸	原儿茶酸	儿茶素	原花青素 B ₂	表儿茶素	白藜芦醇	鞣花酸
1	65.13	3.54	27.71	25.51	29.14	0.19	1.22
2	105.49	10.35	28.82	56.67	1.41	0.10	0.64
3	75.57	5.99	10.66	47.33	2.89	0.17	0.61
4	73.40	6.17	11.93	66.58	5.86	0.16	0.49
5	46.83	5.66	14.54	16.89	4.02	0.6	0.36
6	58.72	2.78	16.33	40.27	0.85	0.19	0.43
7	34.58	4.74	11.44	6.90	5.72	0.11	0.52
8	50.42	5.27	12.09	17.72	1.27	0.15	0.36
9	42.26	5.42	20.92	22.35	8.71	0.11	0.42
10	68.93	3.96	23.07	23.27	7.85	0.07	0.36
11	50.15	2.78	8.68	7.51	6.44	0.03	0.35
12	37.45	4.30	6.12	24.30	7.65	0.12	0.41
13	28.20	3.24	7.45	11.47	3.48	0.08	0.87
14	50.68	4.07	18.08	26.32	4.06	0.11	0.46
15	47.30	4.95	13.43	16.26	2.52	0.15	0.54
16	55.48	6.97	19.88	2.53	3.89	0.11	0.51
17	74.97	3.21	26.13	23.72	7.39	0.19	0.48
18	56.94	7.22	14.38	30.31	4.88	0.19	0.56
19	172.89	29.59	127.34	123.48	1.88	0.54	0.71
20	37.73	5.20	26.37	26.10	2.62	0.02	0.39
21	48.60	6.11	21.81	16.43	1.11	0.06	0.22
22	52.94	6.33	21.94	31.31	1.58	0.12	0.58
23	50.24	5.24	51.41	41.98	3.26	0.03	0.45
24	48.94	5.88	16.68	12.43	1.64	0.34	0.55
25	60.68	3.19	13.64	18.73	11.07	0.03	0.33

葡萄酒中 7 种活性成分（没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、白藜芦醇和鞣花酸）进行同步测定，该方法简单、准确、有效，各活性成分均得到较好的分离。测定结果显示，25 种酒样均检测到 7 种活性成分，各酒样间 7 种活性成分的量差异不大，仅酒样 19[长城干红葡萄酒解百纳(特制五年)]各活性成分的量均较其他酒样高，排除同一产地葡萄酒生产工艺影响，推测其与所使用的葡萄原料的品种及质量有关。

大量研究表明，没食子酸衍生物具有抗胃溃疡、抗病毒、预防冠心病等作用^[6]，儿茶素、表儿茶素类化合物具有明显的抗氧化、抗衰老及改善肝功能等生物活性^[7]，鞣花酸具有抗癌、抗突变、抗氧化和降压等作用^[8-9]，原儿茶酸及衍生物具有抗氧化、降低心肌耗氧量、减慢心率等作用^[10]，白藜芦醇具有调血脂、抑制血小板、改善非酒精性脂肪肝及抑制脂肪氧化酶活性的作用，并可通过保护细胞线粒体中 DNA 免遭化学损害而发挥延缓衰老功效^[11-13]，

原花青素更早已被证实具有抗氧化、抗突变、抗癌、预防和治疗心血管疾病等作用^[14-16]。同时,由测定结果可知,25种干红葡萄酒中都含有没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂、鞣花酸、白藜芦醇 7 种酚类物质,各酒样之间仅存在量高低的差异,说明这 7 种活性成分可以作为葡萄酒质量评价的测定指标和其发挥保健作用的物质基础,也为长期适量的饮用红葡萄酒可以调节人体的各项生理功能提供了科学依据。

参考文献

- [1] Maria D. Isolation of red wine components with anti-adhesion and anti-biofilm activity against *Streptococcus mutans* [J]. *Food Chem*, 2010, 119: 1182-1188.
- [2] Giulio M P. Novel Role of Red Wine-derived polyphenols in the prevention of Alzheimer's Disease dementia and brain pathology: Experimental approaches and clinical implications [J]. *Planta Med*, 2012, 78: 1614-1619.
- [3] Shang J. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(6): 698-706.
- [4] Carsten R E. Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells [J]. *Radiat Res*, 2008, 169(6): 633-638.
- [5] 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.
- [6] 赵国强. 没食子酸衍生物及其生理活性综述 [J]. *天津药学*, 1990, 2(1): 20-23.
- [7] 杜 特. 儿茶素及其聚合物的生物学活性及其应用前景概述 [J]. *生物技术世界*, 2013(3): 89-90.
- [8] 李素琴, 袁其朋, 徐建梅. 鞣花酸的生理功能及工艺研究开发现状 [J]. *天然产物研究与开发*, 2001, 13(5): 71-73.
- [9] 郭增军, 谭 林, 徐 颖, 等. 鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性 [J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(3): 519-524.
- [10] 李取胜, 王 伟, 韩秋俊, 等. 原儿茶酸衍生物的合成及活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(2): 208-211.
- [11] Dani C, Bonatto D, Salvador M, et al. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Agric Food Chem*, 2008, 56(11): 4268-4272.
- [12] Ngoc T M. Lipoygenase inhibitory constituents from rhubarb [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(5): 598-605.
- [13] 闫少芳, 李 勇, 吴 娟, 等. 葡萄籽提取物原花青素调节血脂作用及机理研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2003, 15(4): 302-304.
- [14] Sharma S D, Katiyar S K. Dietary grape-seed proanthocyanidin inhibition of ultraviolet B₂ induced immune suppression is associated with induction of IL-12 [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(1): 95-102.
- [15] Zhu Q Y, Holt R R, Lazarus S A, et al. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002, 227(5): 321-329.
- [16] 闫少芳, 李 勇, 吴 娟, 等. 葡萄籽提取物原花青素调节血脂作用及机理研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2003, 15(4): 302-304.