

花青素

(决议 Oeno 22/2003, 经 Oeno 12/2007 修订)

1 适用范围

本方法适用于分析红葡萄酒和桃红葡萄酒中花青素的相对组成。通过反相高效液相色谱分离紫外-可见光(UV-VIS)检测器进行检测。

已经有人发表了很多类似的检测方法分析红葡萄酒中花青素成分。例如 Wulf 等已经成功检测并鉴定了 21 种不同花青素, Heier et al. 借助气相色谱-质谱法检测到近 40 种花青素。但是花青素成分构成非常复杂, 因此需要一个简单的方法来分析葡萄酒中常见的主要花青素化合物相对含量。建议各成员国继续进行该领域研究, 以避免出现不科学的评估结果。

2 原理

该方法主要用于分离 5 种最重要的非酰化花青素(如图 1, 峰 1~峰 5)及 4 种酰化花青素(如图 1, 峰 6~峰 9)。红葡萄酒及桃红葡萄酒中的花青素, 用水/甲酸/乙腈梯度洗脱, 经反相高效液相色谱柱直接分离, 在 518 nm 波长下进行检测^[1,2]。

3 试剂与材料

甲酸(分析纯, 98%)。

去离子水, 色谱级。

乙腈, 色谱级。

高效液相色谱流动相:

流相 A: 去离子水: 甲酸: 乙腈=87: 10: 3(体积比);

流相 B: 去离子水: 甲酸: 乙腈=40: 10: 50(体积比)。

流动相需经滤膜过滤、脱气, 待测样品需滤膜过滤。

利用参比标准品进行色谱峰的确证。

缺少商品化高纯度的花青素标准品是使用高效液相色谱检测分析葡萄酒中花青素过程中存在的最大困难。此外, 溶液中花青素稳定性差也加大了检测的难度。

以下几种花青素色素已经商品化:

花色素-3-葡萄糖苷(或者氯化花色素); $M=484.84 \text{ g/mol}$;

花翠素-3-葡萄糖甙; $M=498.84 \text{ g/mol}$;

锦葵色素-3-葡萄糖苷(或者氯化锦葵色素-3- β -葡萄糖苷); $M=528.84 \text{ g/mol}$;

锦葵色素-3,5-二葡萄糖苷, $M=691.04 \text{ g/mol}$ 。

4 仪器设备

高效液相色谱系统:

二元梯度输液高压泵, 样品进样体积 $10 \mu\text{L} \sim 200 \mu\text{L}$ 。

二
自
柱
溶
分
例如:

5 步

5.1

注

滤, 注

F

范围

5.2

E

20 (

1.5

E

二极管阵列检测器或紫外可见光检测器。

自动积分或计算机数据采集软件。

柱温箱温度 40℃。

溶剂脱气系统。

分离色谱柱,如:LiChrospher 100 RP 18(5 μm)色谱柱以及 LiChroCart 250-4 保护柱,例如:RP 18(30 mm~40 mm)2 mm×20 mm。

5 步骤

5.1 样品制备

澄清的葡萄酒可以直接倒入进样瓶自动进样,较浑浊的样品需要用 0.45 μm 的滤膜过滤,注意弃掉最开始的滤液。

由于花青素的可检测浓度范围很广,样品进样体积可以根据葡萄酒颜色强度进行调整,范围可设置为 10 μL~200 μL。研究表明,进样体积对分析结果无明显影响。

5.2 分析方法

高效液相色谱仪测定条件:

进样体积:50 μL(红葡萄酒)至 200 μL(玫瑰葡萄酒);

流量:0.8 mL/min;

柱温:40℃;

运行时间:45 min;

延迟时间:5 min;

检测波长:518 nm。

表 1 梯度洗脱

时间/min	溶剂 A(V/V)/%	溶剂 B(V/V)/%
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

为了确保色谱柱的分离效率,方法规定测定锦葵色素-3-葡萄糖苷的理论塔板数不低于 20 000,而花翠素-3-香豆酰葡萄糖苷和锦葵色素-3-香豆酰葡萄糖苷间的分离度(*R*)不低于 1.5,否则需更换新色谱柱。

图 1 中给出了花青素分离的典型色谱图,以及各峰表示的花青素。

色谱峰编号

第一组:“非酰化花青素-3-葡萄糖苷”	飞燕草素-3-葡萄糖苷(De-3-gl)	1
	花色素-3-葡萄糖苷(Cy-3-gl)	2

(续)

色谱峰编号

第一组：“非酰化花青素-3-葡萄糖苷”	矮牵牛花素-3-葡萄糖苷	3
	花翠素-3-葡萄糖苷	4
	锦葵色素-3-葡萄糖苷	5
第二组：“乙酰化花青素-3-葡萄糖苷”	花翠素-3-乙酰葡萄糖苷	6
	锦葵色素-3-乙酰葡萄糖苷	7
第三组：“香豆酰花青素-3-葡萄糖苷”	花翠素-3-香豆酰葡萄糖苷	8
	锦葵色素-3-香豆酰葡萄糖苷	9

6 结果表示

本方法中所检测的结果为9种花青素的相对含量。

7 检出限与定量限

方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)是根据葡萄酒工艺手册决议 OENO 7-2000 中所规定的“分析方法检测限和定量限的估算方法”进行估算的。使用 4.2.2 中“决策逻辑图”延长线 N°3 图表的方法,在色谱图中,从相关的色谱峰部分画一个封闭的图框,延伸到 10 倍的半峰高的宽度(W1/2)。另外画两条平行线正好包含了信号窗口的最大振幅。这两条线之间的距离表示为 h_{max} ,以毫吸光单位(mAU)表示。

分析的条件和操作者所使用的方法对 LOD 和 LOQ 都有影响。附表中举例说明了这些影响因素:

$$h_{max} = 0.208[\text{mAU}]$$

$$LOD = 3 \times 0.208[\text{mAU}] = 0.62[\text{mAU}]$$

$$LOQ = 10 \times 0.208[\text{mAU}] = 2.08[\text{mAU}]$$

建议:

如果某一组分的含量低于定量检测限(LOQ),则由总花色素组成所得到的酰化花色素总量或乙酰化与香豆酰化花色苷的比值计算无效。但低于定量限(LOQ)的检测值也能提供相应的信息。

8 精密度参数

根据峰面积值,计算出9种花青素的重复性限(r)和再现性(R)值,详见附 A 表 A.2。根据表 A.2,一个特定峰的不确定度为最接近于该峰积值所对应的 r 和 R 。验证数据的值可以按照相关的统计规则计算。例如,乙酰化花色素总量的总误差(S_r),特定的总误差比率的方差(S_r^2),如乙酰化花色素与香豆酰化花色素的相对误差的平方(S_r/a_i)等。按照这些规则,表 A.2 中的数据可以用来计算所有的准确度参数。

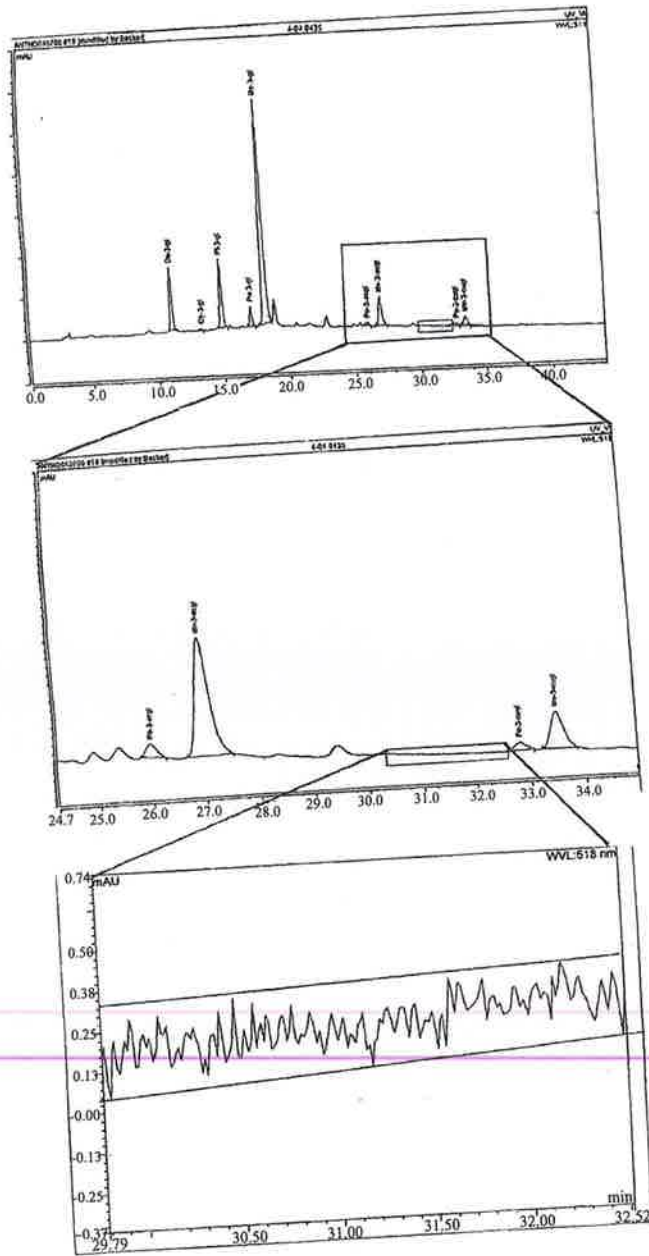


图 1

附录 A

方法准确度研究与评价数据统计结果

在德国特里尔食品化学国家实验室协助下,来自欧洲 5 个国家的 17 个实验室参与了该方法的验证工作。方法性能评价结果汇总见表 A.1。参与者名单见表 3。图 A.1 为色谱图,详细结果见表 A.2。统计评价依据为决议 6/99 和 ISO 5725-2:1994。

从实验室收回的色谱图和数据结果来看均满足分析的要求。根据“1994 IUPAC”协议和 OIV 决议 OENO 19/2002,采用 Dixon 和 Grubbs 离群值测试方法对离群值进行判定。

对 9 种主要的花青素在 5 个不同含量水平上的 S_r , S_R , r 和 R 值进行了计算。使用实验结果中含量水平相近的数值进行分析。为了得到该方法性能的总体概况,所有的 RSD_r 和 RSD_R 值根据相对的峰面积范围进行分组,具体如下表所示:

表 A.1 方法性能评价研究结果汇总表

相对峰面积范围 ^a /%	RSD_r 范围/%	RSD_R 范围/%
>0.4~1.0	6.8~22.4	20.6~50.9
>1.1~1.5	4.2~18.1	11.8~28.1
>1.5~3.5	2.1~7.7	10.6~15.6
>3.5~5.5	2.7~5.7	18.7~7.5
>5.5~7.5	2.4~3.9	6.5~10.0
>10~14	1.1~2.9	3.7~9.2
>14~17	1.0~3.9	3.2~5.4
>50~76	0.3~1.0	2.1~3.1

^a独立花青素。

结果显示,重复性和再现性取决于相对峰面积的总和。相对峰面积值总和越高, RSD_r 和 RSD_R 越接近理想值。但当花青素的含量接近于检出限(如花青素-3-葡萄糖苷)时,相对峰面积较小(<1%), RSD_r 和 RSD_R 值会显著增大,而对于相对面积值大于 1%的花青素, RSD_r 和 RSD_R 值会趋于合理。

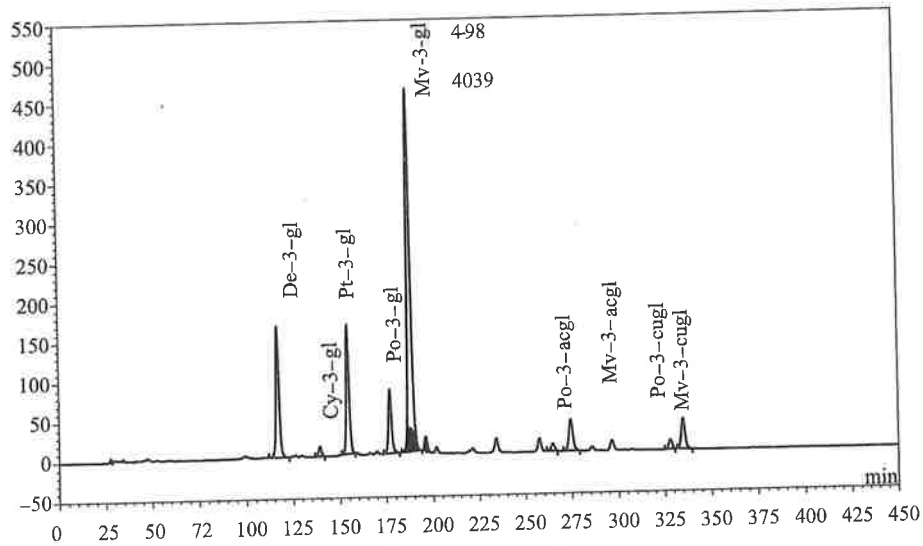


图 A.1 红酒中 9 种不同的花青素的分析图谱

表 A.2 方法评价研究结果

花青素	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
飞燕草素-3-葡萄糖苷					
<i>n</i>	14	14	16	15	16
平均值	6.75	14.14	3.45	16.68	3.54
S_r	0.163	0.145	0.142	0.142	0.108
RSD _r /%	2.4	1.0	4.1	0.8	3.1
<i>r</i>	0.46	0.41	0.40	0.40	0.30
S_R	0.544	0.462	0.526	0.704	0.490
RSD _R /%	8.1	3.3	15.2	4.2	13.8
<i>R</i>	1.52	1.29	1.47	1.97	1.37
花色素-3-葡萄糖苷					
<i>n</i>	16	17	16	15	14
平均值	2.18	1.23	0.61	1.46	0.34
S_r	0.086	0.053	0.043	0.110	0.031
RSD _r /%	4.0	4.3	7.1	7.5	9.2
<i>r</i>	0.24	0.15	0.12	0.31	0.09
S_R	0.460	0.211	0.213	0.180	0.158
RSD _R /%	21.2	17.2	34.9	12.3	46.7
<i>R</i>	1.29	0.59	0.60	0.50	0.44
矮牵牛花素-3-葡萄糖苷					
<i>n</i>	15	17	16	14	15
平均值	10.24	14.29	5.75	12.21	6.19
S_r	0.233	0.596	0.157	0.097	0.196
RSD _r /%	2.3	4.2	2.7	0.8	3.2
<i>r</i>	0.65	1.67	0.44	0.27	0.55
S_R	0.431	0.996	0.495	0.469	0.404

表 A.2(续)

花青素	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
RSD _R /%	4.2	7.0	8.6	3.8	6.5
R	1.21	2.79	1.39	1.31	1.13
花翠素-3-葡萄糖苷					
<i>n</i>	16	15	17	17	16
平均值	11.88	6.23	13.75	7.44	4.12
<i>S_r</i>	0.241	0.166	0.144	0.232	0.174
RSD _r /%	2.0	2.7	1.0	3.1	4.2
<i>r</i>	0.68	0.47	0.40	0.65	0.49
<i>S_R</i>	0.981	0.560	1.227	0.602	0.532
RSD _R /%	8.3	9.0	8.9	8.1	12.9
R	2.75	1.57	3.44	1.69	1.49
锦葵色素-3-葡萄糖苷					
<i>n</i>	16	15	17	16	16
平均值	55.90	55.04	76.11	52.60	61.04
<i>S_r</i>	0.545	0.272	0.251	0.298	0.377
RSD _r /%	1.0	0.5	0.3	0.6	0.6
<i>r</i>	1.53	0.76	0.70	0.83	1.06
<i>S_R</i>	2.026	2.649	2.291	1.606	1.986
RSD _R /%	3.6	4.8	3.0	3.1	3.3
R	5.67	7.42	6.41	4.50	5.56
<p><i>n</i> = 剔除异常值后的有效数据数目</p> <p><i>S_r</i> = 重复性标准偏差</p> <p>RSD_r/% = 相对重复性标准偏差</p> <p><i>r</i> = 重复性限</p> <p><i>S_R</i> = 再现性标准偏差</p> <p>RSD_R/% = 相对再现性标准偏差</p> <p>R = 再现性限</p>					
A 花青素	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
花翠素-3-乙酰葡萄糖苷					
<i>n</i>	14	16		14	16
平均值	1.16	1.44		0.59	3.74
<i>S_r</i>	0.064	0.062		0.059	0.215
RSD _r /%	5.5	4.3		10.1	5.8
<i>S_R</i>	0.18	0.17		0.17	0.60
RSD _R /%	43.9	27.2		46.4	10.0
R	1.43	1.10		0.76	1.05

n =
S_r
RSD_r
r =
S_R
RSD_R
R =
A
C
I_r
I_R

表 A. 2(续)

花青素	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
锦葵色素-3-乙酰葡萄糖苷					
n	16	17		17	16
平均值	5.51	4.84		3.11	15.07
S_r	0.176	0.167		0.088	0.213
RSD _r /%	3.2	3.4		2.8	1.4
r	0.49	0.47		0.25	0.60
S_R	0.395	0.366		0.496	0.617
RSD _R /%	7.2	7.6		16.0	4.1
R	1.11	1.02		1.39	1.73
花翠素-3-香豆酰葡萄糖苷					
n	16	14		17	16
平均值	1.26	0.90		0.89	1.32
S_r	0.130	0.046		0.060	0.058
RSD _r /%	10.3	5.1		6.8	4.4
r	0.36	0.13		0.17	0.16
S_R	0.309	0.109		0.204	0.156
RSD _R /%	24.5	12.2		23.0	11.8
R	0.86	0.31		0.57	0.44
锦葵色素-3-香豆酰葡萄糖苷					
n	17	17		17	16
平均值	4.62	2.66		4.54	4.45
S_r	0.159	0.055		0.124	0.048
RSD _r /%	3.4	2.1		2.7	1.1
r	0.45	0.15		0.35	0.13
S_R	0.865	0.392		0.574	0.364
RSD _R /%	18.7	14.7		12.6	8.2
R	2.42	1.10		1.61	1.02
n = 剔除异常值后的有效数据数目 S_r = 重复性标准偏差 RSD _r /% = 相对重复性标准偏差 r = 重复性限 S_R = 再现性标准偏差 RSD _R /% = 相对再现性标准偏差 R = 再现性限					

表 A. 3 参与研究实验室名单

ABC Labor Dahmen, Mülheim/Mosel	D
Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster	D
Institut für Lebensmittelchemie Koblenz	D
Institut für Lebensmittelchemie Speyer	D

表 A. 3(续)

Institut für Lebensmittelchemie Trier	D
Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittel Mainz	D
Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach	D
Labor Dr. Klaus Millies, Hofheim-Wildsachsen	D
Labor Heidger, Kesten	D
Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Halle	D
Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Neustadt/Weinstraße	D
Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt, Saarbrücken	D
Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt, Wiesbaden	D
Laboratoire Interrégional de la D. G. C. C. R. F de Bordeaux, Talence/France	F
Unidad de Nutricion y Bromotologia, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca/Espana	E
University of Glasgow, Div. of Biochem. and Molek. Biology	UK
Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau, Klosterneuburg	A

共 17 个实验室,其中德国 13 个,奥地利 1 个,法国 1 个,西班牙 1 个,英国 1 个。

参 考 文 献

- [1] Marx, R., B. Holbach, H. Otteneder; Determination of nine characteristic Anthocyanins in Wine by HPLC; OIV, F. V. N°1104 2713/100200.
- [2] Holbach, B., R. Marx, M. Ackermann; Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung von Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie(HPLC). Lebensmittelchemie(1997)51:78-80.
- [3] Eder, R., S. Wendelin, J. Barna; Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie(HPLC). Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. Mitt. Klosterneuburg(1990)40:68-75.
- [4] ISO 5725-2:1994 Accuracy(trueness and precision)of measurement methods and results—Part 2; Basic method for the determination of repeatability and reproducibility.
- [5] Otteneder, H., Marx, R., Olschimke, D.; Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. O. I. V. F. V. N°1130(2001).
- [6] Mattivi F.; Scienza, A.; Failla, O.; Vika, P.; Anzani, R.; Redesco, G.; Gianazza, E.; Righetti, P. Vitis vinifera-a chemotaxonomic approach; Anthocyanins in the skin. *Vitis (special issue)*1990,119-133.
- [7] Roggero, I. P.; Larice, I. L.; Rocheville-Divorne, C.; Archier, P.; Coen, V. Composition Antocyanique des cepages. *Revue Francaise d'Oenologie* 1998,112,41-48.
- [8] Eder, R.; Wendelin, S; Barna, J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanin analysis. *Mitt. Klosterneuburg* 1994,44,201-212.
- [9] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *Eur. Food Res. Technol.* 2000,212,108-112.

- [10] Garcia-Beneytez, E. ;Revilla, E. ;Cabello, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 215, 32-37.
- [11] Arozarena, I. ;Ayestarán, B. ;Cantalejo, M. J. ;Navarro, M. ;Vera, M. ;Abril, K. ;Casp, A. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 214, 313-309.
- [12] Revilla, E. ;Garcia-Beneytez, E. ;Cabello, F. ;Martin-Ortega, G. ;Ryan, J-M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr A* 2001, 915, 53-60.
- [13] Heier, A. ;Blaas, W. ;Droß, A. ;Wittkowski, R. ;Anthocyanin Analysis by HPLC/ESI-MS, *Am. J. Enol. Vitic*, 2002, 53, 78-86.
- [14] Arozarena, I. ;Casp, A. ;Marin, R. ;Navarro, M. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *J. Sci. Food Agric*, 2000, 80, 1909-1917.
- [15] Anonymous. Bekanntmachung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz*, 2001, 44, 748.
- [16] Burns, I. ;Mullen, W. ;Landrault, N. ;Teissedre, P. -L. ;Lean, M. E. I. ;Crozier, A. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4096-4102.
- [17] Otteneder, H. ;Holbach, B. ;Marx, R. ;Zimmer, M. Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthocyaninspektrum. *Mitt. Klosterneuburg*, 2002, 52, 187-194.
- [18] L. W. Wulf and C. W. Nagel; High-Pressure liquid chromatographic separation of Anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic* 1978, 29, 42-49.
- [19] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze. *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography.* *Journal of Chromatography A*, 864 (1999)89-101.
- [20] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51.