

单一 pH 法、pH 示差法和差减法 快速测定干红葡萄酒中总花色苷含量的比较

翦 伟,韩舜愈*,张 波,祝 霞,王 婧,崔日宝

(甘肃农业大学食品科学与工程学院,甘肃兰州 730070)

摘 要:为了寻求快速、经济地测定干红葡萄酒中总花色苷含量的方法,采用单一 pH 法、pH 示差法和差减法对比分析 3 种方法测定数据的差异性。结果表明,3 种方法测定的吸光度与浓度间均具有良好的线性关系,其相关系数 R 分别为 0.9977、0.9988 和 0.9984,测定结果没有显著性差异($p < 0.05$)。3 种方法均能用于干红葡萄酒总花色苷含量的快速测定。

关键词:干红葡萄酒,总花色苷含量,分光光度法

Comparison of single pH method, pH-differential method and subtraction method for determining content of anthocyanins from red wine

JIAN Yi, HAN Shun-yu*, ZHANG Bo, ZHU Xia, WANG Jing, CUI Ri-bao

(Food Science and Engineering College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to find a quick and economical method for determining total content of anthocyanins from red wine, single pH method, pH-differential method and subtraction method were used and the difference between the results of the three methods was compared. The results indicated that linear relation between absorbance and concentration determined by that three methods were matched well, their related coefficient are 0.9977, 0.9988 and 0.9984, and there were no significant differences between them ($p < 0.05$). All of these methods could be used to determine total content of anthocyanins from red wine.

Key words: red wine; total content of anthocyanins; spectrophotometry

中图分类号:TS262.6

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)23-0323-04

花色苷为花色素的糖苷,是红葡萄酒中主要的呈色物质,决定了酒的品质。在整个酿造过程中,葡萄中的花色苷会因为醪液性质的变化而发生一定的变化,同时,花色苷还具有抗氧化、抗突变、抗癌,保护心血管及神经系统,改善视力等多种生理功能^[1]。因此,对葡萄酒中花色苷进行研究对于葡萄酒生产工业具有十分重要的意义。目前,常用的总花色苷的定量方法有高效液相色谱法和可见分光光度法。其中,高效液相色谱法定量测定花色苷含量精确度虽高,但设备仪器较昂贵,需要多种花色素标准品^[2],而分光光度法不需用花色苷标准品,且和 HPLC 具有高的相关性^[3],这使得可见分光光度法成为一种切实可行的检测方法^[4]。目前常用的分光光度法包括:pH 示差法、单一 pH 法和差减法。研究发现,花色苷的结构随 pH 改变有几种不同形式的转变,其结构的转变是 pH 的函数,而干扰物的特征光谱不随 pH 的

改变而变化^[5]。在 pH 示差法测定中,通过实验,确定两个对花色苷吸光度差别最大,但可保持其稳定的 pH,测定这两个 pH 处的吸光值差异,根据公式就可以计算出花色苷的总量^[6]。同时,在 pH 方法中,花色苷总量测定也可在一个恒定的 pH 介质条件下进行,此方法称为单一 pH 法。该方法在很少含有在花色苷的最大吸收区发生吸收的干扰物质的样品中,利用朗伯-比耳定律通过适当波长处的吸光度来测定^[7],由于操作简便,被广泛应用于花色苷含量的测定^[8]。此外,酒中的花色苷可被二氧化硫或亚硫酸盐等物质漂白,漂白后其在可见光的光谱特征消失,而酒中花色苷的干扰物吸光度则很少受影响。利用葡萄酒样品漂白前后吸光度的差值,参考标准工作曲线,便可计算出相应的含量^[7]。本文以干红葡萄酒为实验原料,讨论分光光度法测定干红酒总花色苷含量的分析条件,并比较各方法之间的差异,以期对葡萄酒中的总花色苷含量检测提供一种简单有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干红葡萄酒 市售;锦葵色素-3-葡萄糖苷标准品 美国草药药典公司;盐酸、氯化钾、乙酸、乙酸

收稿日期:2012-05-31 *通讯联系人

作者简介:翦伟(1987-),女,硕士研究生,主要从事葡萄酒挥发性风味物质分析的研究。

基金项目:甘肃省科技厅科技支撑计划(1011NKCA059);省科技厅自然科学基金(1107RJZA137)。

钠、柠檬酸、柠檬酸钠、亚硫酸钠 分析纯,天津光复科技有限公司。

pH 为 0.5~2.0 的缓冲溶液(0.1mol/L 柠檬酸溶液逐滴加入盐酸,pH 计校正配制);pH1.0 的缓冲溶液(0.2mol/L KCl:0.2mol/L HCl = 25:67, v/v);pH4.5 的缓冲溶液(0.2mol/L NaAc · 3H₂O:0.2mol/L HAc = 1:1, v/v);pH 为 3.0~6.0 的缓冲溶液(0.1mol/L 柠檬酸和 0.1mol/L 柠檬酸钠,pH 计校正配制)。

UV756CRT 紫外分光光度计 上海佑科仪器仪表有限公司;CP214 型电子分析天平 奥豪斯仪器有限公司;HH-S 型恒温水浴锅 恒丰仪器制造有限公司;Metrohm 827 pH Lab pH 计 瑞士万通公司。

1.2 实验方法

1.2.1 测定波长的选择 由于本研究的样品是葡萄酒,其花色苷组成很复杂,可以选择标准品来表示干红酒样中花色苷的含量,以锦葵色素-3-葡萄糖苷为标准来表示^[9]。

将锦葵色素-3-葡萄糖苷用 pH1.0 的缓冲液配制成 25mg/L 的标准溶液,使其吸光值在分光光度计的线性范围内(0.2~1.4AU)^[9],在 200~800nm 下进行全波段(光谱)扫描,确定最大测定吸收波长。空白对照用 pH1.0 的缓冲溶液。

1.2.2 锦葵色素-3-葡萄糖苷标准曲线的绘制 将锦葵色素-3-葡萄糖苷用 pH1.0 的缓冲液分别配制成 5、10、15、20、25、30mg/L 的标准溶液。空白样品在用缓冲液定容前加入 0.5mL 10% 亚硫酸钠溶液。在最大吸收波长处测定吸光度值,绘制标准曲线。

1.2.3 pH 示差法测定条件的选定

1.2.3.1 pH 的选定 为使 pH 示差法有较好的灵敏度及准确性,pH 的选定对花色苷的定量分析具有重要的意义,由于花色苷只有在酸性介质中是稳定的,因此只测定 pH 小于 7 条件下花色苷吸光值的变化^[10]。

分别吸取 1mL 样品于 9 个试管中,再分别加入 pH 为 0.4、0.5、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的缓冲溶液 9mL,平衡 120min 后,以蒸馏水为空白对照,于最大波长下测定吸光度。

1.2.3.2 平衡时间的确定 因为花色苷在溶液介质中存在 4 种结构形式,这 4 种结构形式在某一 pH 下处于动态平衡,当 pH 改变时,动态平衡发生转移,总的趋势是:pH 降低时,平衡向红色的 2-苯基苯并吡喃阳离子移动;pH 升高时平衡向蓝色醌式移动,一定时间后达到一个新的平衡。因此,样品用缓冲液稀释后,须静置一段时间,等稳定后才能测定^[10]。

吸取样品 1mL,再加入 pH 为 1.0 的缓冲溶液 9mL,以蒸馏水为空白在室温下分别平衡 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120min,于最大波长下测定吸光度。用同样的方法测 pH 为 4.5 的缓冲溶液的平衡时间。

1.2.4 pH 示差法测定总花色苷含量 分别吸取葡萄酒 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9mL,用 pH 1.0 的缓冲液定容至 10mL。室温平衡 100min 后,以蒸馏水为空白,分别在最大吸收波长和 700nm 处测定吸

光值。用同样的方法测样品在 pH 为 4.5 的缓冲溶液中的吸光度值。

1.2.5 单一 pH 法测总花色苷含量 分别吸取葡萄酒 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9mL,用 pH 1.0 的缓冲液定容至 10mL。室温平衡 100min 后,以蒸馏水为空白,在最大吸收波长处测定吸光值。

1.2.6 差减法测总花色苷含量 分别吸取葡萄酒 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9mL,用 pH1.0 的缓冲液定容至 10mL。室温平衡 100min 后,在最大吸收波长处测定吸光值。样品的漂白处理是取相同量的葡萄酒在定容前加入 0.8mL 20% 的 Na₂SO₃ 溶液。

1.2.7 经验公式计算方法 pH 示差法^[9]:花色苷色素含量(mg/L) = $\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$,式中:A = (A_{λmax} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{λmax} - A_{700nm})_{pH4.5}; MW(分子量) = 493.2g/mol(锦葵色素-3-葡萄糖苷);DF = 稀释倍数;l = 光程的厘米数;ε = 28000 摩尔消光系数(锦葵色素-3-葡萄糖苷)单位是 L · mol⁻¹ · cm⁻¹。

单一 pH 法^[11]:

$$\text{花色苷色素含量 (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

式中:A = A_{λmax};其他与 pH 示差法相同。

差减法^[7]:

$$\text{花色苷色素含量 (mg/L)} = \frac{(A_1 - A_2) \times DF}{k}$$

式中:A₁ 和 A₂ 分别为亚硫酸钠漂白前后的溶液吸光度;k 为采用锦葵色素-3-葡萄糖苷标准品绘制的标准曲线的斜率。

2 结果与分析

2.1 测定波长的选择

利用可见分光光度计进行全波段扫描,扫描结果见图 1。由资料可知,花色苷的最大吸收区通常在 500~550nm^[12] 范围内,故锦葵色素-3-葡萄糖苷的最大吸收峰波为 521nm。

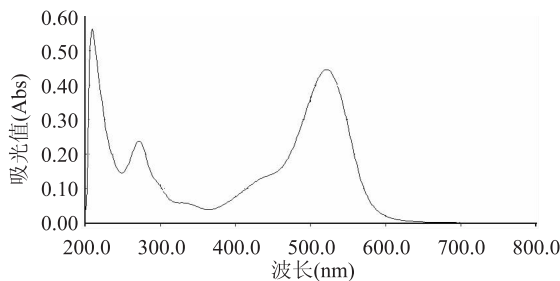


图1 锦葵色素-3-葡萄糖苷光谱图

Fig.1 UV-Vis absorption spectrum of alvidin-3-glucoside

2.2 锦葵色素-3-葡萄糖苷标准曲线

在最大吸收波长 521nm 下,检测不同浓度锦葵色素-3-葡萄糖苷的吸光值,如图 2 所示,其线性方程为 y = 0.0425x - 0.0067,线性相关系数 R 为 0.9989。

2.3 pH 示差法测定条件的选定

2.3.1 pH 的选定 根据示差法测定的原理,对 pH 进行选择。在选择时应考虑以下三个因素:a.两个不同 pH 处测定的花色苷吸光值差异应最显著;b.单一

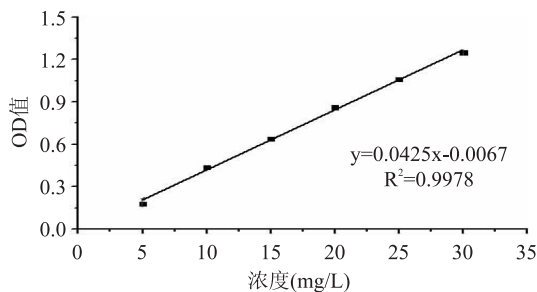


图2 锦葵色素-3-葡萄糖苷标准曲线
Fig.2 Standard curve of alvidin-3-glucoside

pH 的轻微变动,对花色苷吸光值的影响较小;c.花色苷在两个 pH 下应相当稳定^[13]。根据以上的因素,结合图3数据可知,葡萄酒花色苷在 pH 为 1.0 和 4.5 处时吸光度的差值最大,并且在此两处 pH 附近吸光度变化较小,因此选择 1.0 和 4.5 为示差法测定花色苷的 pH。

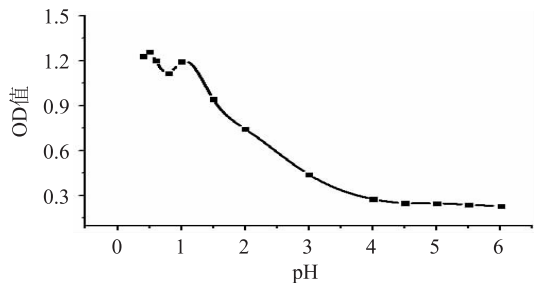


图3 样品在不同 pH 下测定的吸光值

Fig.3 Absorbance value of samples under different pH

2.3.2 平衡时间的确定 图4和图5分别反映 pH 为 1.0 和 4.5 时,干红葡萄酒在不同时间下吸光度的变化情况。结果表明,葡萄酒中的花色苷在缓冲液中的吸光度值随时间的延长而变化,并呈现不同的趋势。在 pH1.0 的缓冲液中,花色苷的吸光值随时间的延长而逐渐上升,在 100min 时基本稳定。在 pH4.5 的缓冲液中,花色苷的吸光值随时间的延长而快速下降,在 50min 时趋于稳定。因此,根据上述的数据进行综合考虑,平衡时间选择为 100min。

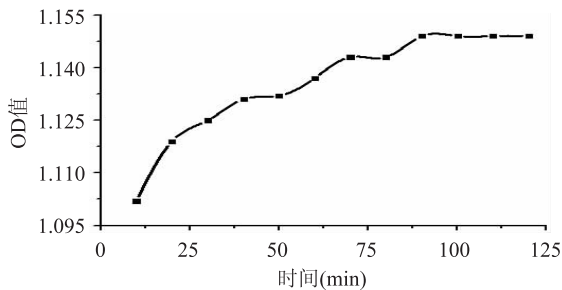


图4 样品吸光度随时间的变化(pH=1.0)

Fig.4 Change of sample absorbance with time

2.4 三种测定方法的比较

经测算由经验公式^[9]得葡萄酒花色苷含量为 231.8mg/L,在葡萄酒总花色苷浓度的线性范围内,将原液分别稀释为 10 到 100 倍。

由图6~图8可知,当用 pH 示差法、单一 pH 法及差减法测定干红葡萄酒中总花色苷浓度时,其相

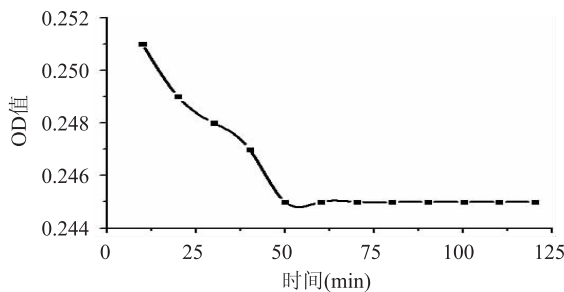


图5 样品吸光度随时间的变化(pH4.5)

Fig.5 Change of sample absorbance with time

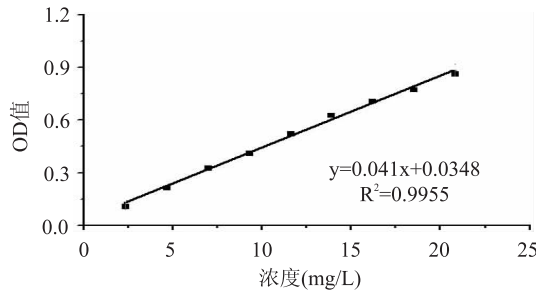


图6 pH 示差法测总花色苷的含量

Fig.6 Determination of total anthocyanins by pH-differential method

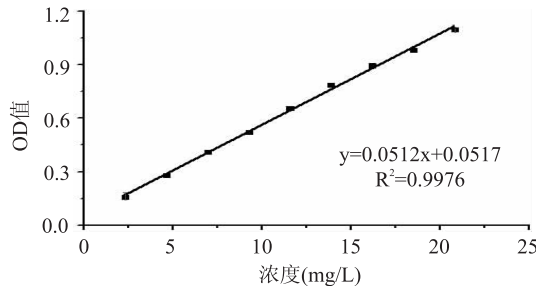


图7 单一 pH 法测总花色苷的含量

Fig.7 Determination of total anthocyanins by single pH method

关系数均接近 1 (R 分别为 0.9977, 0.9988 和 0.9984),表明变量之间的线性相关程度较高,可见这 3 种方法能比较准确的测定干红酒中总花色苷含量。

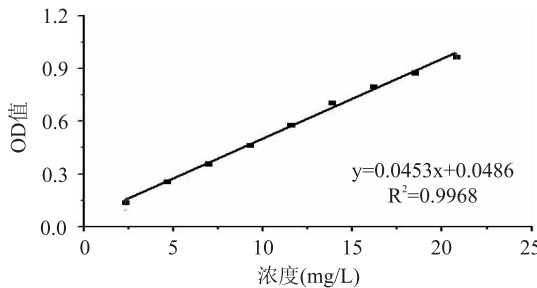


图8 差减法测总花色苷的含量

Fig.8 Determination of total anthocyanins by subtraction method

2.5 三种方法测定结果的差异性

用 DPS 软件,采用 Bonferroni 测验比较 3 种方法的差异性(表 1)。由表中数据可知,三种方法的标准

(下转第 423 页)

al.Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins[J].Analytica Chimica Acta,2005,551(1-2):105-114.

[28]秦倩茹,高宏伟,马洪明.过敏原小麦醇溶蛋白 ELISA 定量检测方法的建立[J].食品工业科技,2010,31(11):360-365.

[29]Constantin C,Touraev A,Heberle-Bors E,et al.Detection of antigens reactive to IgE and IgA during wheat seed maturation and in different wheat cultivars[J].International Archives of Allergy and Immunology,2009,149:181-187.

[30]van den Broeck H,Chen H B,Lacaze X,et al.In search of tetraploid wheat accessions reduced in celiac disease-related gluten epitopes[J].Molecular Bio Systems,2010,6(11):2206-2213.

[31]Camafeita E,Alfonso P,Mothes T,et al.Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: the first non-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples[J].Journal of Mass Spectrometry,1997,32(9):940-947.

[32]Hernando A,Valdes I,Méndez E. New strategy for the

determination of gliadins in maize-or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: fractionation of gliadins from maize or rice prolamins by acidic treatment[J].Journal of Mass Spectrometry,2003,38(8):862-871.

[33]Sealey-Voyksner J A,Khosla C,Voyksner R,et al.Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[J].Journal of Chromatography A,2010,1217(25):4167-4183.

[34]Debnath J,Martin A,Gowda L R A. polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling[J].Food Research International,2009,42(7):782-787.

[35]柯燕娜,葛宇,巢强国,等.食品中小麦致敏成分的常规 PCR 检测方法的建立[J].食品与发酵工业,2011,37(7):184-187.

[36]Mujico J R,Lombardía M,Mena M C,et al.A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients[J].Food Chemistry,2011,128(3):795-801.

(上接第 325 页)

偏差均较低,说明方法的重现性较高,且各方法之间置信区间均包括 0,故 3 种处理方法的差异不显著($p < 0.05$)。

表 1 三种方法测定结果的差异性比较

Table 1 Comparison of difference between the results of three methods

处理	平均值	标准差
处理 1	0.6637	0.3370
处理 2	0.5191	0.2669
处理 3	0.6081	0.2958
MSE = 0.0831	t = 2.5736 p 值 = 0.05	
比较组	均值差	95% 置信区间
1 <- > 2	0.1420	-0.2126~0.4870
1 <- > 3	0.0669	-0.2852~0.4143
2 <- > 3	-0.0755	-0.4225~0.2771

注:处理 1 为单一 pH 法;处理 2 为 pH 示差法;处理 3 为差减法。

3 结论

3.1 用分光光度法测定干红葡萄酒中的花色苷含量,最大吸收波长为 521nm。

3.2 在 pH 示差法测定中,选择 pH1.0、pH4.5 和室温下平衡 100min 为其测定的条件。

3.3 单一 pH 法、pH 示差法和差减法测定溶液的吸光度与花色苷浓度的线性关系良好,相关系数 R 分别为 0.9988、0.9977 和 0.9984。

3.4 通过 Bonferroni 检验表明三种方法的测定结果没有显著性差异($p < 0.05$),均可用于干红葡萄酒中总花色苷含量的测定。

参考文献

- [1]陈颖秋,黄永俊,马小星,等.红葡萄酒花色苷的研究[J].云南农业,2011(9):33-35.
- [2]杨兆艳.pH 示差法测定桑葚红色素中花青素含量的研究

[J].食品科技,2007(4):201-203.

[3]LEE J M,RENNAKER C,RONALD E W.Correlation of two antho-cyanin quantification methods:HPLC and spectrophotometric methods[J].Food Chemistry,2008,110:782-786.

[4]毛建霏,付成平,郭灵安,等.可见分光光度法测定紫甘薯总花青素含量[J].食品与发酵科技,2010,46(2):101-104.

[5]孙婧超,刘玉田,赵玉平,等.pH 示差法测定蓝莓酒中花色苷条件的优化[J].中国酿造,2011,236(11):171-174.

[6]Dangles O,Saito N,Brouillard R.Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation.Origin of the extraordinary flower color diversity of Pharbitis nil[J].J Am Chem Soc,1993,115:3125-3132.

[7]刘玉芹,王晓,杜金华.花色苷的分离纯化及定性定量方法研究进展[J].中国食品添加剂,2010:178-212.

[8]FULEKI T,FRANCIS F J.Quantitative methods for anthocyanins: 1 Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries[J].J of Food Science,1968,33:72-77.

[9]Jungmin LEE,Robert W Durst,Ronald E Wrolstad.Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices,beverages,natural colorants,and wines by the pH differential method: collaborative study [J].AOAC INTERNATIONAL,2005,88(5):1269-1278.

[10]刘洪海,张晓丽,杜平,等.pH 示差法测定烟 73 葡萄中花青素含量[J].中国调味品,2009,34(4):110-117.

[11]张秀丽,李劲涛,杨军.植物花色苷定性定量研究方法[J].西华师范大学学报,2006,27(3):300-303.

[12]卢钰,董现义,杜景平,等.花色苷研究进展[J].山东农业大学学报,2004,35(2):315-320.

[13]冯建光,谷文英.葡萄皮红色素的示差法测定[J].食品工业科技,2002,23(9):85-86.