

分光光度法检测葡萄酒中花青素方法可行性分析

纪鹏飞¹, 张强², 宋俊男¹, 王希平^{1*}, 孙令超³, 王芳^{1*}

(1. 青岛科创质量检测有限公司, 青岛 266100; 2. 青岛市计量技术研究院, 青岛 266100;
3. 青岛斯坦德检测股份有限公司, 青岛 266100)

摘要: 目的 分析分光光度法检测葡萄酒中花青素方法的可行性, 并对方法进行优化。**方法** 通过分析标准品和样品的全波长扫描图, 确定分光光度法的最佳检测波长; 通过检测不同储存时间时标准品吸光值, 分析标准品稳定性, 确定标准品储备液最佳使用时间; 通过检测加标回收率、检出限、定量限等参数, 同时与液相色谱法的数据作对比, 分析该方法的稳定性和准确性。**结果** 最佳检测波长为 518 nm; 标准品母液在 2 d 内吸光值比较稳定; 线性范围为 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, r^2 为 0.9998, 检出限为 0.188 mg/100 mL, 定量限为 0.625 mg/100 mL。加标水平为 4、8、12 mg/100 mL 时, 加标回收率为 102.3%~106.5%。分光光度法检测葡萄酒样品中花青素含量为(6.58±0.38) mg/100 mL, 液相色谱法检测样品中总花青素含量为(6.84±0.021) mg/100 mL。**结论** 分光光度法适用于葡萄酒中花青素含量的检测, 方法准确性较好。

关键词: 分光光度法; 葡萄酒; 花青素

Feasibility analysis for the determination of anthocyanin in wine by spectrophotometry

Ji Peng-Fei¹, ZHANG Qiang², SONG Jun-Nan¹, WANG Xi-Ping^{1*}, SUN Ling-Chao³, WANG Fang^{1*}

(1. Qingdao Sci-tech Innovation Quality Testing Co., Ltd., Qingdao 266100, China; 2. Qingdao Institute of Measurement and Technology, Qingdao 266100, China; 3. Qingdao Standard Testing Co., Ltd., Qingdao 266100, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the feasibility of spectrophotometric determination of anthocyanins in wine and optimize the method. **Methods** The best detection wavelength of spectrophotometry was optimized by analyzing the scanning diagram of the standard sample with full wavelength. By detecting the absorbance value of the standard at different storage time, the stability of the standard was analyzed, and the optimal storage time of the standard reserve liquid was analyzed. By detecting standard recovery, detection limit and quantitative limit, and comparing with the data of liquid chromatography, the stability and accuracy of the method were analyzed. **Results** The best detection wavelength was 518 nm. The absorbance of standard solution was stable within 2 d. When the linear range was 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, r^2 was 0.9998, the limit of detection was 0.188 mg/100 mL, and the limit of quantification was 0.625 mg/100 mL. The recoveries were 102.3%~106.5% when the spiked levels were 4, 8 and 12 mg/100 mL. The content of anthocyanin in wine samples was (6.58±0.38) mg/100 mL by spectrophotometry and (6.84±0.021) mg/100 mL by liquid chromatography. **Conclusion** Spectrophotometry is suitable for the

*通讯作者: 王希平, 助理工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。E-mail: 819083220@qq.com

王芳, 工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。E-mail: leaf.amam@163.com

*Corresponding author: WANG Xi-Ping, Assistant Engineer, Qingdao Sci-tech Innovation Quality Testing Co., Ltd., Qingdao 266100, China. E-mail: 819083220@qq.com

WANG Fang, Engineer, Qingdao Sci-tech Innovation Quality Testing Co., Ltd., Qingdao 266100, China. E-mail: leaf.amam@163.com

determination of anthocyanin content in wine with high accuracy.

KEY WORDS: spectrophotometry; wine; anthocyanin

1 引言

花青素是一类广泛存在于植物中的水溶性色素,属于黄酮类化合物,结构中母核为 2-苯基苯并吡喃^[1],是葡萄酒中主要的呈色物质^[2]。植物中的花青素常与单糖结合形成花色苷,葡萄酒中花青素以花色苷的形式存在^[3]。葡萄酒中主要含有 4 种花青素:飞燕草色素、矢车菊色素、芍药色素和锦葵色素。目前葡萄酒中花青素的检测方法有液相色谱法^[4]、pH 示差分光光度法^[2]、分光光度法等^[5]。由于液相色谱法的标准品比较昂贵,且花青素标准品不稳定,因此限制了该方法的广泛使用^[2]。本研究通过分析标准品和样品的全波长扫描图,确定分光光度法的最佳检测波长;通过检测不同储存时间标准品吸光值,分析标准品稳定性,优化标准品储备液最佳使用时间;通过检测加标回收率、检出限、定量限等参数,同时与液相色谱法的数据作对比,分析该方法的稳定性和准确性,对分光光度法检测葡萄酒中花青素方法的可行性进行分析。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

实验用葡萄酒为市售瓶装葡萄酒。

飞燕草色素(纯度 98%)、矢车菊色素(纯度 98.3%)、芍药色素(纯度 98%)、锦葵色素(纯度 97%)(上海源叶生物科技有限公司);矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品(纯度 98.43%,中国科学院成都生物研究所);盐酸(优级纯)、亚硫酸钠(优级纯)、柠檬酸(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇、甲醇、甲酸(色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司)。

Agilent 1260 液相色谱仪(带二级管阵列检测器)、Agilent 8453 分光光度计(美国安捷伦科技有限公司);雷磁 PHS-3C 电位滴定仪(上海仪分科学仪器有限公司);HH-6 数显恒温水浴锅(金坛区白塔新宝仪器厂);C₁₈ 液相色谱柱(柱长 250 mm,内径 4.6 mm,美国安捷伦科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 分光光度法检测葡萄酒中花青素

用 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液溶解配制矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品母液,浓度为 200 μg/mL;

标准曲线溶液配制:用 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液将标准品母液分别稀释成浓度为 1、2、4、8、16、20 μg/mL 的标准曲线溶液;

空白试剂:量取 5 mL 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液于

10 mL 比色管中,加入 0.5 mL 10%亚硫酸钠溶液,用 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液稀释至 10 mL。以试剂空白调零,在波长 518 nm 处测吸光值,并绘制标准曲线。

量取 2 mL 样品于 50 mL 容量瓶中,加 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液稀释并定容,静置 10 min。取 7 mL 上述样品溶液于 10 mL 比色管中,加入 2 mL 10%亚硫酸钠溶液,用 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液稀释并定容至 10 mL,在波长 518 nm 处测定吸光值。将样品吸光值带入标准曲线中,计算样品花青素含量。

2.2.2 加标回收实验

向 2 mL 样品中分别加入浓度为 200 μg/mL 标准品母液 0.4、0.8、1.2 mL,加标水平分别为 4、8、12 mg/100 mL。每个水平做 6 次平行。

2.2.3 检出限及定量限

测 11 次样品空白溶液的吸光值,按 GB/T 5009.1-2003 《食品卫生检验方法 理化部分 总则》^[6]的方法计算检出限及定量限。

2.2.4 pH 值对标准品及样品溶液吸光值的影响

分别测量标准曲线溶液和样品溶液的 pH 值。配制 5 份 8 μg/mL 的标准溶液,用 0.4 mol/L 的氢氧化钠分别将 5 份标准溶液的 pH 调到 1.98、2.00、2.04、2.07、2.13、2.20 并测量吸光值。

2.2.5 标准品母液的稳定性

分别于标准品母液配制完成后第 0、1、2、3、4、5、6 d 测定标准品吸光值,每次测定之前将母液稀释为浓度为 8 μg/mL 的标准品使用液,现用现配。

2.2.6 液相色谱法测定葡萄酒中 4 种花青素

用 10%盐酸-甲醇溶液(V:V)配制飞燕草色素、矢车菊色素、芍药色素和锦葵色素的混标母液,浓度为 50 μg/mL,用 10%盐酸甲醇溶液将混标母液分别稀释成浓度为 0.5、1、5、10、25、50 μg/mL 的标准曲线溶液,过 0.45 μm 滤膜后用液相色谱分析。

量取 5 mL 样品于 50 mL 水解管中,加入 20 mL 乙醇-水-盐酸(2:1:1, V:V:V)溶液,摇匀后于沸水浴中水解 1 h,取出冷却后用乙醇-水-盐酸(2:1:1, V:V:V)溶液定容至 25 mL。过 0.45 μm 滤膜后用液相色谱分析。液相色谱仪条件参照 NY/T 2640-2014 《植物源性食品中花青素的测定 高效液相色谱法》^[4]。

3 结果与分析

3.1 方法检测波长的选定

使用分光光度计分析葡萄酒中的花青素含量。由图 1

可见矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的最大吸收波长为 512 nm; 由图 2 可见样品的最大吸收波长为 522 nm。因此将检测波长定为 518 nm。样品和标准品最大吸收波长有偏差, 是因为葡萄酒中呈色物质为花色苷的混合物^[1], 而且除了花色苷外还含有其他呈色物质。因此要通过扣除样品空白来排除其他呈色物质的影响, 样品空白中加入亚硫酸钠是为了去除样品中的花青素, 亚硫酸钠可以和花青素反应, 生成无色化合物, 使花青素在 518 nm 附近的特征吸收消失^[7]。加入亚硫酸钠后样品空白溶液仍然有颜色, 这些颜色主要来源于其他呈色物质。

3.2 花青素中 pH 对吸光值的影响

花色苷的结构会随着 pH 值的改变而变化, 溶液 pH 不同, 花色苷的存在形式也不同^[3]。花色苷在溶液中以 4 种结构存在: 蓝色的醌式碱、红色的花菁正离子、无色的甲醇假碱和查尔酮^[8]。同一 pH 时可使这 4 种结构的化合物

比例达到平衡^[8-10]。花色苷在 pH 值较低时, 溶液的颜色为较深的红色。随着 pH 值的增加花色苷的颜色逐渐变浅, 最终将变为无色^[8]。因此在使用分光光度法时需要考虑 pH 对花色苷吸光值的影响, 标准曲线溶液和样品溶液的 pH 值偏差不能太大。表 1 为标准曲线溶液和样品溶液的 pH 值, 由表 1 可以看出, 样品和标准品的 pH 值差异不显著 ($P>0.05$), 表 2 为 pH 值对标准溶液吸光值的影响, 由表 2 可以看出, 随着溶液 pH 的增加, 标准品的吸光值显著降低。但是 pH 为 1.98、2.00 和 2.04 时吸光值差异不显著 ($P>0.05$), 用柠檬酸溶液提取后样品 pH 小于 2.07, 因此样品溶液 pH 值对吸光值影响较小。与毛建霏等^[7]的研究结果一致。柠檬酸具有增色和护色作用, 有利于花青素类色素的稳定性, 且柠檬酸水溶液对 pH 的缓冲效果较好^[7,11,12]。因此本研究选择使用 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液平衡样品及标准曲线溶液的 pH 值。

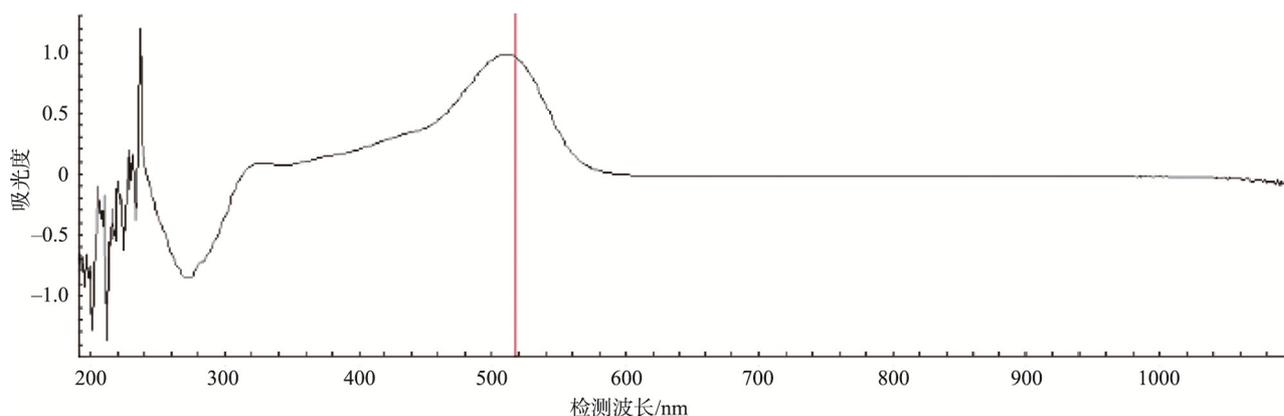


图 1 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品全波长扫描图
Fig.1 Full wavelength scan of cornflower-3-O-glucoside standard

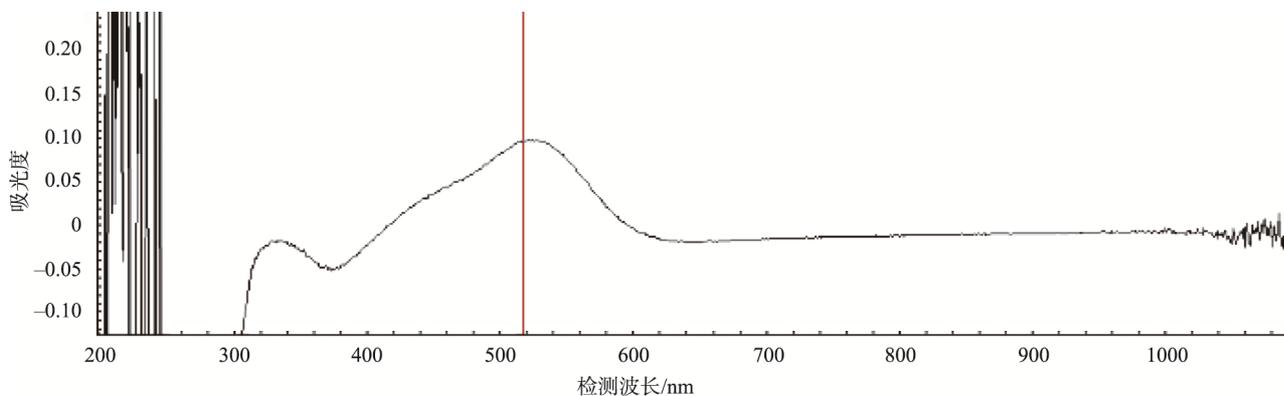


图 2 葡萄酒样品全波长扫描图
Fig.2 Full wavelength scan of wine sample

表 1 标准曲线溶液及样品溶液的 pH 值
Table 1 pH values of standard and sample solutions

	标准曲线溶液浓度/($\mu\text{g/mL}$)						样品溶液	
	1	2	4	8	16	20	样品-1	样品-2
pH 值	1.97 \pm 0.02 ^a	1.97 \pm 0.01 ^a	1.98 \pm 0.03 ^a	1.98 \pm 0.03 ^a	1.99 \pm 0.02 ^a	1.98 \pm 0.03 ^a	2.02 \pm 0.01 ^a	2.03 \pm 0.01 ^a

注: 数据右上角的字母表示同一行数值的差异显著性, 字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

表 2 pH 值对标准溶液吸光值的影响
Table 2 Effect of pH value on absorbance value of standard solution

标准溶液 pH 值	1.98	2.00	2.04	2.07	2.13	2.20
吸光值	0.387 \pm 0.005 ^a	0.382 \pm 0.004 ^a	0.380 \pm 0.005 ^a	0.372 \pm 0.002 ^a	0.351 \pm 0.010 ^b	0.332 \pm 0.006 ^c

注: 数据右上角的字母表示同一行数值的差异显著性, 字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

3.3 方法的检出限、定量限及标准曲线

按照 GB/T 5009.1-2003 的方法, 测定 11 次样品空白溶液的吸光值, 计算检出限及定量限^[6]。得出分光光度法检测花青素的检出限为 0.188 mg/100 mL, 定量限为 0.625 mg/100 mL。葡萄酒样品中花青素含量范围约为 1.2~8.1 mg/100 mL^[9], 方法定量限可以满足检测要求。图 3 为花青素标准曲线, 检测波长为 518 nm, 标准曲线线性范围为 1~20 $\mu\text{g/mL}$, 线性较好, r^2 为 0.9998, 和毛建霏等^[7]研究结果一致。

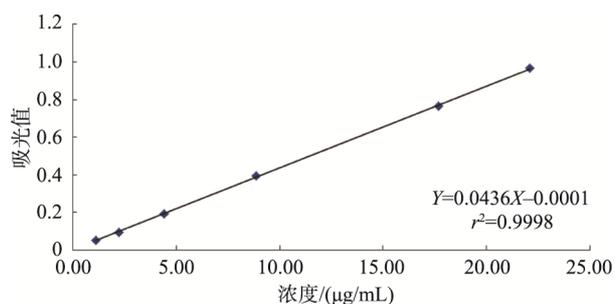


图 3 分光光度法花青素标准曲线

Fig.3 Spectrophotometric standard curve of anthocyanins

3.4 方法的加标回收率

为了验证分光光度法的准确性, 本研究分析了花青素的加标回收率。葡萄酒样品中花青素含量为(6.58 \pm 0.38) mg/100 mL, 根据样品中花青素的含量, 选择 3 个加标水平做回收率实验, 加标水平分别为 4、8、12 mg/100 mL, 表 3 为分光光度法花青素的加标回收率。GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[13]中规定待测物质含量为 1~100 mg/kg 时, 加标回收率范围要求在 90%~110% 之间。分光光度法检测葡萄酒中花青素的加标回收率符合 GB/T 27404-2008 的要求。

表 3 分光光度法测定花青素的加标回收率
Table 3 The standard recovery of anthocyanin determined by spectrophotometry

加标编号	加标水平/(mg/100 mL)	回收率/%
加标-1	4	106.5 \pm 3.6
加标-2	8	103.9 \pm 3.3
加标-3	12	102.3 \pm 1.7

3.5 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的稳定性分析

本研究分析了 1 周内矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品母液的稳定性。表 4 为储存时间对标准品溶液吸光度的影响。由表 4 可以看出, 在标准品配制后的 1 d 和 2 d 与 0 d 时比较, 标准品的吸光度大于 99%, 储存时间为 1 d 和 2 d 时标准品母液的稳定性较高; 储存时间大于 3 d 时标准品吸光值发生显著下降, 储存 3 d 时标准品的吸光度降低至 95.7% \pm 0.1%, 储存 6 d 时下降至 93.2% \pm 0.1%。由此可见, 标准品母液的储存时间为 2 d, 超过 2 d 时标准品溶液将发生降解。

3.6 分光光度计法与液相色谱法检测花青素的结果对比

为了验证分光光度法测定花青素含量的准确性, 本研究同时使用液相色谱法分析葡萄酒样品中的花青素。葡萄酒中主要含有 4 种花青素^[4,15]: 飞燕草色素、矢车菊色素、芍药色素和锦葵色素。表 5 为葡萄酒样品中 4 种花青素的含量, 由表 5 可以看出, 葡萄酒中飞燕草色素含量最高, 其次是矢车菊色素。分光光度计法和液相色谱法测定样品中花青素总量分别为(6.58 \pm 0.38) mg/100 mL 和(6.84 \pm 0.021) mg/100 mL, 两者相对偏差为 3.87%, 由此可见分光光度法的数据准确度较好。

表 4 储存时间对标准品溶液吸光度的影响
Table 4 Effect of storage time on absorbance of standard solution

储存时间/d	0	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.392±0.005	0.390±0.002	0.388±0.007	0.377±0.010	0.372±0.008	0.370±0.005	0.365±0.006
相对于 0 d 时吸光度降解程度/%	—	99.8±0.2 ^a	99.2±0.2 ^a	95.7±0.1 ^b	94.9±0.3 ^c	94.5±0.2 ^d	93.2±0.1 ^e

注: 数据右上角的字母表示同一行数值的差异显著性, 字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

表 5 液相色谱法检测样品中 4 种花青素的含量
Table 5 Content of 4 anthocyanins determined by liquid chromatography

项目名称	飞燕草色素	矢车菊色素	芍药色素	锦葵色素	花青素总量
含量/(mg/100 mL)	2.194±0.005	1.924±0.015	1.062±0.003	1.662±0.001	6.84±0.021

4 结论

本研究采用分光光度法分析葡萄酒中的花青素含量, 葡萄酒样品中花青素含量为(6.58±0.38) mg/100 mL, 该结果与液相色谱法检测结果差异较小。分光光度法以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷为标准品, 对标准品储备液的稳定性进行分析, 确定了标准品储备液最佳使用期限。根据标准品及样品的最大吸收波长, 将检测波长定为 518 nm。样品检测之前应该先用经亚硫酸钠溶液处理过的样品溶液调零, 消除样品中其他呈色物质的影响。对标准品和样品进行稀释时, 柠檬酸水溶液对 pH 的缓冲效果较好, 可以使标准品和样品溶液的 pH 保持一致, 不会因为 pH 差异较大影响花青素吸光值。通过对回收率的分析得出, 该方法的准确性较好, 花青素标准曲线的线性较好, 且定量限可以满足葡萄酒中花青素含量的检测。分光光度法适合用于葡萄酒中花青素含量的检测。

参考文献

- 王欢, 谯顺彬, 田辉, 等. 高效液相色谱法测定蓝莓酒中六种花青素含量[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 280–284.
Wang H, Qiao SB, Tian H, *et al.* Determination of anthocyanins in blueberry wine by high-performance liquid chromatography [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(8): 280–284.
- 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, (11): 171–174.
Sun JC, Liu YT, Zhao YP, *et al.* Optimization of analytical condition of determining anthocyanin content in blueberry wine by pH-differential method [J]. China Brew, 2011, (11): 171–174.
- 郭浩然, 郑心怡, 张静, 等. 桑葚酒中花青素含量的测定方法优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 255–259.
Guo HR, Zheng XY, Zhang J, *et al.* Optimization of determination method of anthocyanin content in mulberry wine [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(9): 255–259.
- NY/T 2640-2014 植物源性食品中花青素的测定 高效液相色谱法[S].
NY/T 2640-2014 Determination of anthocyanins in plant origin products—High performance liquid chromatography [S].
- DB 22/T 2529-2016 紫穗玉米花青素测定 分光光度法[S].
DB 22/T 2529-2016 Determination of anthocyanins in purple-Spectrophotometry [S].
- GB/T 5009.1-2003 食品卫生检验方法 理化部分 总则[S].
GB/T 5009.1-2003 Methods of food hygienic analysis-Physical and chemical section-General principles [S].
- 毛建军, 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.
Mao JF, Fu CP, Guo LA, *et al.* Determination of total anthocyanins in purple sweet potato by vis spectrophotometry [J]. Food Ferment Ind, 2010, 46(2): 101–104.
- 刘洪海, 张晓丽, 杜平, 等. pH 示差法测定烟 73 葡萄酒中花青素含量[J]. 中国调味品, 2009, 34(4): 110–111, 117.
Liu HH, Zhang XL, Du P, *et al.* Determination the anthocyanin content in Yan 73 grape by pH differential method [J]. China Cond, 2009, 34(4): 110–111, 117.
- 葛谦, 杨春霞, 牛艳, 等. 贺兰山东麓酿酒葡萄成熟过程中花色苷组分含量及其主成分分析[J]. 北方园艺, 2017, (8): 14–19.
Ge Q, Yang CX, Niu Y, *et al.* Determination and principal component analysis of anthocyanins in mature process of wine grapes in eastern Helan mountain [J]. North Hort, 2017, (8): 14–19.
- 陈洪玉, 迟彩霞, 王德新, 等. 柳树叶中原花青素含量测定[J]. 应用化工, 2012, 41(8): 1456–1457, 1461.
Chen HY, Chi CX, Wang DX, *et al.* Determination of procyanidins content of willow leaves [J]. Appl Chem Ind, 2012, 41(8): 1456–1457, 1461.
- 杨兆艳. pH 示差法测定桑椹红色素中花青素含量的研究[J]. 食品科技, 2007, (4): 201–203.
Yang ZY. Anthocyanin content in mulberry red pigment by pH-differential spectrophotometry [J]. Food Sci Technol, 2007, (4): 201–203.
- 鲁明, 付欣, 迟吉捷. pH 示差法测定黑米发酵饮料中花色苷的含量[J]. 黑龙江农业科学, 2017, (4): 100–103.

Lu M, Fu X, Chi JJ. Determination of anthocyanins content in black rice fermented beverages by pH differential method [J]. Heilongjiang Agric Sci, 2017, (4): 100–103.

[13] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].

GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

[14] 陈长应. 微波消解-可见分光光度法测定紫甘薯中花青素[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(4): 158–160.

Chen CY. Determination of anthocyanins in purple sweet potato by microwave digestion and visible spectrophotometric [J]. Food Res Dev, 2016, 37(4): 158–160.

[15] 余欢, 张劲, 周咏梅, 等. 不同叶幕夹角对不同瓶储期桂葡 6 号葡萄酒花色苷组成及含量的影响[J]. 南方农业学报, 2020, 51(2): 394–403.

Yu H, Zhang J, Zhou YM, *et al.* Effects of opening degree of canopy on the profiles and contents of anthocyanins in Guipu No.6 wine after bottle storage periods [J]. J South Agric, 2020, 51(2): 394–403.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



纪鹏飞, 主要研究方向为食品分析与检测。

E-mail: 1059762192@qq.com



王希平, 助理工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。

E-mail: 819083220@qq.com



王芳, 工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。

E-mail: leaf.amam@163.com