

山葡萄果实发育过程中花色苷和非花色苷酚成分及其含量的变化

赵权^{1,3}, 王军^{1,2,*}, 段长青²

¹东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040; ²中国农业大学食品科学与营养工程学院葡萄与葡萄酒研究中心, 北京 100083; ³吉林农业科技学院中药学院, 吉林 132101

Changes in Components and Content of Anthocyanin and Non-Anthocyanin Phenolic Compounds during Fruit Development of *Vitis amurensis* Rupr.

ZHAO Quan^{1,3}, WANG Jun^{1,2,*}, DUAN Chang-Qing²

¹Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Center for Viticulture and Enology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; ³Traditional Chinese Medicine Department, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China

摘要:以‘双红’山葡萄果实为试材,采用 HPLC-MS/MS 技术,分析山葡萄果实发育过程中果皮中花色苷和非花色苷酚成分及其含量的变化。结果表明,转色期前果皮内没有花色苷积累,随着果实的成熟,花色苷含量逐渐增加,成熟期的含量最高;非花色苷酚自花后2周至成熟期间的含量变化呈下降趋势。在山葡萄果实发育过程中检测出花色苷10种,其中双糖苷5种、单糖苷5种;非花色苷酚类物质检测到14种,其中苯甲酸类2种、肉桂酸类3种、黄烷-3-醇类2种、黄酮醇类5种、白藜芦醇类2种。

关键词:山葡萄;果皮;花色苷;非花色苷酚

酚类物质是葡萄浆果中一种次生代谢产物,对葡萄浆果和葡萄酒的感官质量有影响,尤其是对红葡萄酒的色泽、苦味、收敛性、澄清度和稳定性等有作用(Picinelli等2000; Gawel 1998; Hardie和Considine 1976)。葡萄浆果中含有大量的酚类物质,主要分布在果皮、种子和果梗中,在葡萄酒酿造过程中这些物质均浸渍到葡萄酒内。葡萄中的酚类物质主要包括花色苷和非花色苷酚两大类。葡萄浆果中的花色素作为红葡萄的主要呈色物质,常与葡萄糖结合,以糖苷的形式存在于葡萄果皮中(Barance等1996)。非花色苷酚类物质是指除花色苷以外的酚类物质,包括苯甲酸类、肉桂酸类、黄烷-3-醇类、黄酮醇类、白藜芦醇类。山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)原产我国东北、华北及朝鲜、前苏联远东地区,是葡萄属中最抗寒的一个种,是东北地区酿造葡萄酒的主要原料。目前有关山葡萄在品种选育(宋润刚等1999)、抗寒育种(林兴桂2007)、人工栽培及酿酒技术(沈玉杰和郭太君2000)、果实糖和酸遗传分析(宋润刚等2007)等方面的研究报道较多,但对山葡萄果实发育过程中花色苷和非花色苷酚成分及其含量变化的研究未见报道。本文以‘双红’山葡萄果实为试材,用HPLC-

MS/MS技术测定山葡萄果实发育过程中果皮中花色苷和非花色苷酚成分及其含量的变化,并探讨其变化规律,以期确定山葡萄果实的最佳收获期、提高山葡萄与山葡萄酒质量奠定一定的基础。

材料与方法

山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)品种为‘双红’,两性花,‘通化3号’×‘双庆’(Shuanghong, hermaphroditic, *V. amurensis* cv. Tonghua No.3×Shuangqing)。2008年6~9月采自中国农业科学院特产研究所国家山葡萄种质资源圃。采样时期分别为花后2周(6月19日)、花后4周(7月3日)、花后6周(7月17日)、花后8周(7月31日)、转色期(8月12日)、20%着色(8月20日)、50%着色(8月26日)、100%着色(9月3日)、成熟(9月14日)。测定用的流动相甲醇(HPLC)、甲酸(HPLC)、乙腈(HPLC)和冰醋酸(HPLC)均购于

收稿 2009-11-23 修定 2009-12-23

资助 黑龙江省留学归国人员科学基金(LC08C07)。

* 通讯作者(E-mail: junwang1966@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82191829)。

Fisher 公司(Fairlawn, NJ, USA), 采用 Milli-Q (Milipore, Bedford, MA)系统制备的超纯水。标准样品二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷(malvidin-3-O-glucoside)、没食子酸(gallic acid)、儿茶素[(+)-catechin, C]、咖啡酸(caffeic acid)、白藜芦醇(*trans*-resveratrol)、槲皮素(quercetin)均由 Sigma 公司(Chemical Co., St. Louis, USA)购买。仪器有: KG2200B 型超声波清洗器; RE-52AA 型旋转蒸发器; SHZ-III 型循环水真空泵。Agilent 1200 系列 LC/MSD 离子阱液相色谱-质谱联用仪进行标准物质以及样品的 LC-UV-MS 分析, 包括在线 G1379A 真空溶剂脱气机、G1311A 四元高压梯度泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315A 二极管阵列检测器(DAD), 所有仪器均由 Agilent 5.3 版本的化学工作站控制。

提取花色苷时, 将山葡萄皮于液氮中研磨, 冷冻干燥后称取 2.000 g 干葡萄皮粉, 加入 40 mL 1% 盐酸甲醇溶液, 于 30 °C 避光提取 2 h, 离心(4 000 r·min⁻¹, 5 min), 重复提取 5 次, 合并提取液, 35 °C 旋转蒸发至干, 残留物用甲醇定容到 5 mL, 于 -40 °C 下保存待测。

提取非花色苷酚时, 将山葡萄皮于液氮中研磨, 冷冻干燥。称取 5.000 g 干葡萄皮粉, 加入 50 mL 90% (V/V)的丙酮水溶液, 在室温条件下, 水浴摇床浸提 30 min, 离心(4 000 r·min⁻¹, 5 min), 重复提取 5 次, 合并提取液, 30 °C 旋转蒸发至干, 残留物用甲醇定容到 5 mL, 于 -40 °C 下保存待测。

花色苷高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)仪的色谱柱采用 Zorbax Eclipse SB C-18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm 粒度色谱柱); 流动相 A: 水:甲酸=90:10 (V/V); 流动相 B: 水:甲醇:甲酸=40:50:10。洗脱程序为: 0~4 min, 6%~15% B (流动相 B); 4~13 min, 15%~25% B; 13~20 min, 25%~50% B; 20~35 min, 50%~80% B; 35~40 min, 80%~100% B; 40~45 min, 100%~6% B; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 525 nm; 进样量: 10 μL。MSD 参数: 质谱采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 粒子扫描范围: 100~1 500 m·z⁻¹; 雾化器压力为 30 psi; 干燥气流速为 12 L·min⁻¹; 干燥气温度为 300 °C。样品 0.45 μm 膜过滤后直接进样分析, 每样品重复 2 次。用二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷的标样制作 9 点标准曲线。花色苷标

准曲线为峰面积=50.5674×浓度(mg·L⁻¹)+6.3822, 相关系数达 0.9998, 表明标样在 1~500 mg·L⁻¹ 内有良好的线性关系, 可以满足花色苷的定量检测。

测定非花色苷酚用的高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)仪的色谱柱采用反相 250 mm×4.6 mm, 5 μm 的 Zorbax Eclipse SB C-18 柱(agilent technologies), 流动相 A: 1.0% 的醋酸水溶液; 流动相 B: 1.0% 醋酸甲醇溶液; 洗脱程序: 0~15 min, 10%~26% B; 15~30 min, 26%~40% B; 30~50 min, 40%~65% B; 50~60 min, 65%~95% B; 60~63 min, 95%~10% B; 63~66 min, 10% B isocratic; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μL。MSD 参数: 离子源为 ESI, 采用负离子模式; 雾化气压力为 30 psi; 干燥气流速为 10 mL·min⁻¹; 干燥气温度为 325 °C; 离子扫描范围为 100~1 500 m·z⁻¹。CID 的 MS/MS 诱导碰撞能量为 1.0 V。

配制 8 个浓度水平的 5 种混标, 每个水平重复 3 次, 以各组分的平均峰面积对浓度(mg·L⁻¹)在工作站中建立标准曲线。苯甲酸类采用没食子酸为标准品, 标准曲线为峰面积=6.04767×浓度(mg·L⁻¹)+37.6951, 相关系数为 0.99837; 肉桂酸类采用咖啡酸为标准品, 标准曲线为峰面积=6.94488×浓度(mg·L⁻¹)+24.3721, 相关系数为 0.99875; 黄酮醇类采用槲皮素为标准品, 标准曲线为峰面积=3.230747×浓度(mg·L⁻¹)+9.9427, 相关系数为 0.99885; 黄烷-3-醇类采用儿茶素为标准品, 标准曲线为峰面积=1.15779×浓度(mg·L⁻¹)+4.85762, 相关系数为 0.99878; 白藜芦醇类采用白藜芦醇为标准品, 标准曲线为峰面积=9.97568×浓度(mg·L⁻¹)+17.0442, 相关系数为 0.99876。5 种标准非花色苷酚类化合物在相应的线性范围内相关系数均在 0.998 以上, 说明线性良好, 可以满足定量的需要。

结果与讨论

1 花色苷种类及含量的变化

1.1 总花色苷的含量变化 葡萄与葡萄酒中的花色苷种类很多, 但是可以利用的商业标样很少。目前, 国际上对花色苷定性的方法主要是根据花色苷的质谱信息对其进行进行鉴定。花色苷的定量分析则主要是用二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷进行相对定量分析, 即其他花色苷都用这一种花色苷定量。

(Heier等2002; Han等2008; He等2006; Alcalde-Eon等2006; García-Beneytez等2002)。应用HPLC-MS/MS技术, 从山葡萄果皮中鉴定出10种花色苷, 分别为花翠素-3-*O*-葡萄糖苷、花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷、花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷、甲基花翠素-3-*O*-葡萄糖苷、甲基花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷、甲基花青素-3-*O*-葡萄糖苷、甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷、甲基花青素-3-*O*-葡萄糖苷-丙酮酸、二甲花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷、二甲花翠

素-3-*O*-葡萄糖苷-乙醛。由图1可知, 从花后2周到花后8周末检测到花色苷类物质, 从花后8周开始有花色苷类物质积累, 但含量上升缓慢, 变化不大; 从果实20%着色起其含量开始急剧上升, 一直持续到果实成熟, 且在果实成熟期花色苷类物质的含量最高达到11.351 mg·g⁻¹ (DW)。果实成熟期双糖苷5种, 含量为8.979 mg·g⁻¹ (DW), 占总花色苷的79.09%, 单糖苷5种, 含量为2.372 mg·g⁻¹ (DW), 占总花色苷的20.91%。

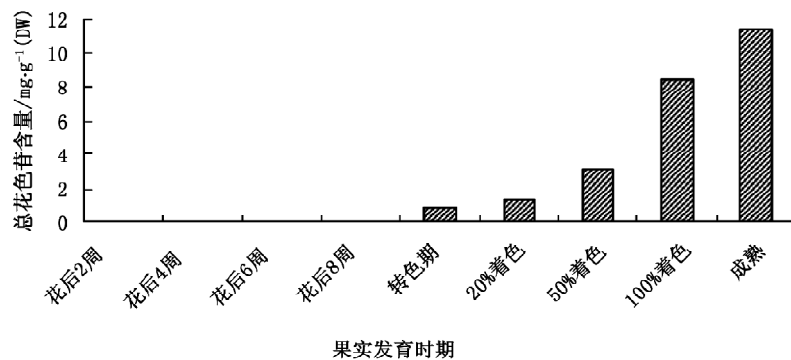


图1 山葡萄果实发育过程中总花色苷含量的变化

1.2 不同种类花色苷含量变化 葡萄中的花色苷主要是花翠素(Dp)、花青素(Cy)、甲基花翠素(Pt)、甲基花青素(Pn)、二甲花翠素(Mv)的单糖苷、双糖苷和酰化糖苷。花色苷通过糖苷化、酰化和甲基化形成聚合花色苷(唐传核和杨晓泉

2003)。山葡萄果实发育过程5类花色苷的含量变化见图2。

在果实整个发育过程中, 花翠素类物质检测到2种, 分别为花翠素-3-*O*-葡萄糖苷和花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷。在果实50%着色时检测到花翠素-

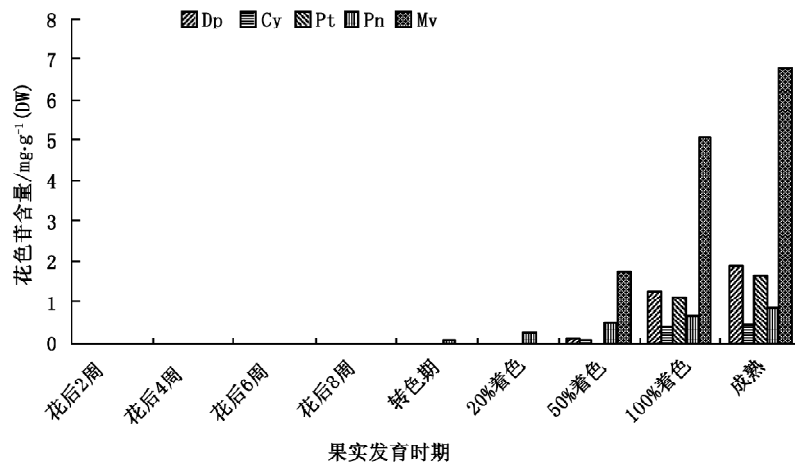


图2 山葡萄果实发育过程中不同种类花色苷含量变化

Dp: delphinidin, 花翠素; Cy: cyanidin, 花青素; Pt: petunidin, 甲基花翠素; Pn: peonidin, 甲基花青素; Mv: malvidin, 二甲花翠素。

3,5-*O*-双葡萄糖苷, 含量为 $0.141 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW); 100%着色时检测到花翠素-3-*O*-葡萄糖苷, 其含量为 $1.273 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。在果实成熟时, 花翠素类物质达到 $2.052 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 占果皮总花色苷的18.62%。花青素类物质检测到1种, 为花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷。花后2周至20%着色, 没有花青素的积累, 在50%着色时花青素的含量为 $0.111 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 随着果实的成熟, 100%着色时含量最高达到 $0.482 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 而后含量呈下降的趋势, 至成熟时含量降低到 $0.317 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 占果皮总花色苷的4.23%。甲基花翠素类物质共检测到2种, 分别为甲基花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷和甲基花翠素-3-*O*-葡萄糖苷。在果实100%着色时检测到甲基花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷, 含量为 $1.194 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 甲基花翠素-3-*O*-葡萄糖苷含量为 $0.465 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。果实成熟时, 甲基花翠素类物质含量达 $1.763 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 占果皮总花色苷的15.51%。甲基花青素类物质检测到3种, 分别为甲基花青素-3-*O*-葡萄糖苷、甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷和甲基花青素-3-*O*-葡萄糖苷-丙酮酸。果实50%着色时, 检测到甲基花青素-3,5-*O*-双葡萄糖苷, 含量达 $0.504 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。甲基花青素-3-*O*-葡萄糖苷和甲基花青素-3-*O*-葡萄糖苷-丙酮酸在果实100%着色时被检测到, 含量分别为 $0.051 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$

(DW)和 $0.001 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。成熟期甲基花青素类物质含量为 $0.873 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 占果皮总花色苷的7.66%。二甲花翠素类物质检测到2种, 分别为二甲花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷和二甲花翠素-3-*O*-葡萄糖苷-乙醛。在果实50%着色, 检测到二甲花翠素-3,5-*O*-双葡萄糖苷, 其含量为 $1.813 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。果实成熟时, 检测到二甲花翠素-3-*O*-葡萄糖苷-乙醛, 含量为 $0.029 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。成熟期二甲花翠素类物质含量为 $6.875 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 占果皮总花色苷的60.53%, 在5类花色苷中含量最高。

2 非花色苷酚种类及含量变化

将葡萄果皮中所含的非花色苷酚类物质分为5大类, 即苯甲酸类、肉桂酸类、黄烷-3-醇类、黄酮醇类和白藜芦醇类。非花色苷酚类物质主要是用质谱定性, 根据HPLC-MS/MS定量分析结果, 归类计算含量(Pérez-Magariño等1999; La Torre等2006)。

2.1 总非花色苷酚含量的变化 非花色苷酚类物质总含量在果实整个发育过程中呈现下降趋势(图3)。花后2周到花后4周含量急剧下降, 由 $3.771 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)下降到 $0.772 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。花后4周到花后8周下降较缓, 花后8周到转色期出现缓慢的上升趋势, 然后平缓下降至成熟, 含量为 $0.413 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。

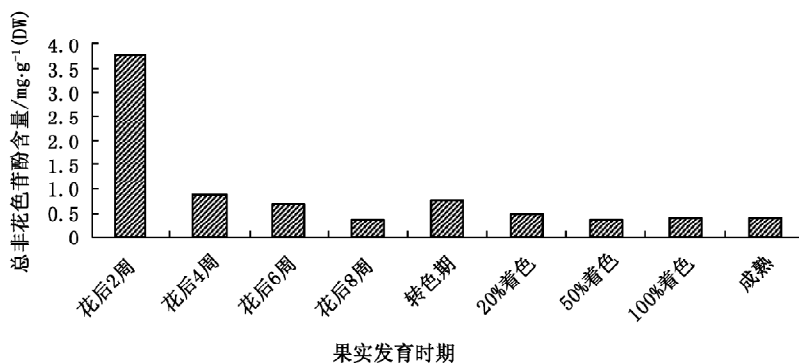


图3 山葡萄果实发育过程中总非花色苷酚含量的变化

2.2 苯甲酸类含量的变化 苯甲酸类物质在果实整个发育过程中的变化趋势见图4。从花后2周至花后6周末检测到苯甲酸类物质, 花后8周检测到对-羟基苯甲酸、鞣花酸2种物质, 总含量达到 $0.018 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。而从转色期到果实完全成熟只检测

到鞣花酸而未检测到对-羟基苯甲酸。从花后8周到50%着色其含量又缓慢下降, 含量下降到 $0.008 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 而后又急剧上升, 在果实100%着色时, 含量达到最大值 $0.021 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。随着果实的成熟含量又急剧下降, 果实完全成熟时, 含量

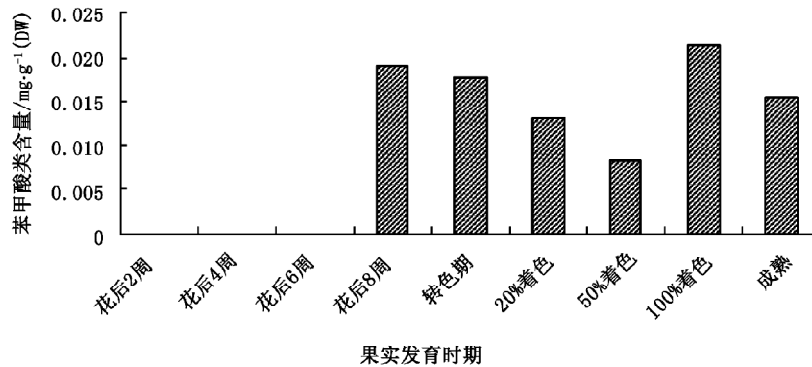


图4 山葡萄果实发育过程中苯甲酸类含量的变化

达到 0.016 mg·g⁻¹ (DW)。

2.3 肉桂酸类含量的变化 肉桂酸类物质的含量在果实整个发育过程中呈现下降趋势(图5)。花后2周到成熟9个时期均检测到反式-阿魏酰酒石酸、反式-肉桂酸、反式-单咖啡酰酒石酸3种物质。

花后2周含量最高达 2.681 mg·g⁻¹ (DW), 从花后2周至花后4周, 其含量急剧下降到 0.558 mg·g⁻¹ (DW)。从花后8周至50%着色呈现略微上升的变化趋势, 而后又平缓下降, 成熟时含量达到 0.088 mg·g⁻¹ (DW)。肉桂酸类物质的含量变化与非花色

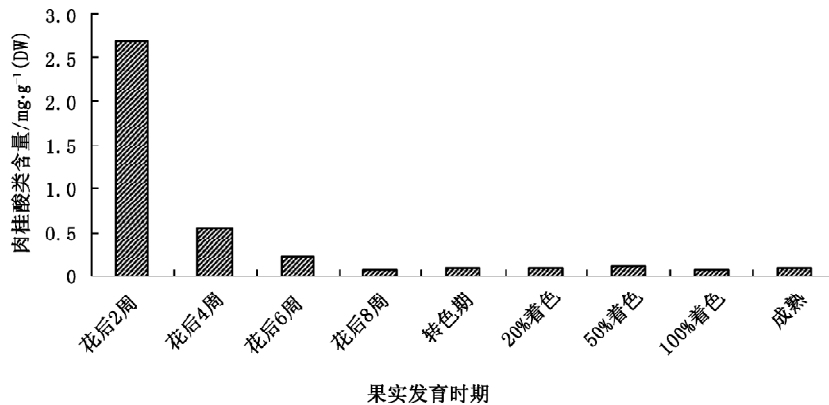


图5 山葡萄果实发育过程中肉桂酸类含量的变化

苷酚的总含量变化规律基本上一致。

2.4 黄烷-3-醇类含量的变化 葡萄果实中儿茶素、表儿茶素等在内的黄烷-3-醇类物质主要存在于葡萄果皮和种子中, 对葡萄酒的颜色、苦味和收敛感等感官特性起作用(Adams 2006)。黄烷-3-醇类物质的含量在果实整个发育过程中呈现先上升后下降的变化趋势(图6)。在果实整个发育过程中均检测到儿茶素, 而表儿茶素在花后8周才检测到。花后2周至转色期含量呈上升的趋势, 在转色期其含量达到最大值 0.451 mg·g⁻¹ (DW)。而后含量急剧下降, 在果实完全成熟时, 含量达到最小值 0.082 mg·g⁻¹

(DW)。

2.5 黄酮醇类含量的变化 黄酮醇类物质的含量在果实发育过程中变化较大(图7)。九个时期共检测到槲皮苷、槲皮素 3-O-葡萄糖苷、反式-杨梅酮 3-O-葡萄糖苷、槲皮素 3-O-半乳糖苷、槲皮素 3-O-葡萄糖苷酸 5 种物质。花后2周黄酮醇类含量最高为 0.905 mg·g⁻¹ (DW), 随后含量急剧下降, 从花后4周到花后6周含量又上升, 而后变化幅度较小, 果实完全成熟时含量为 0.142 mg·g⁻¹ (DW)。

2.6 白藜芦醇类含量的变化 白藜芦醇类物质的含量在果实整个成熟过程中呈现上升趋势(图8)。花

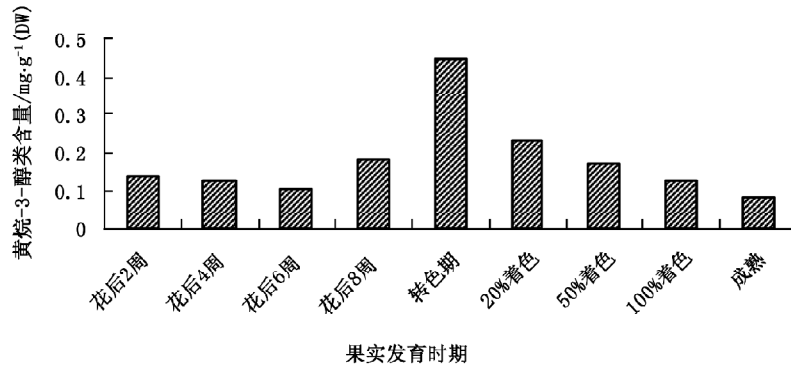


图6 山葡萄果实发育过程中黄烷-3-醇类含量的变化

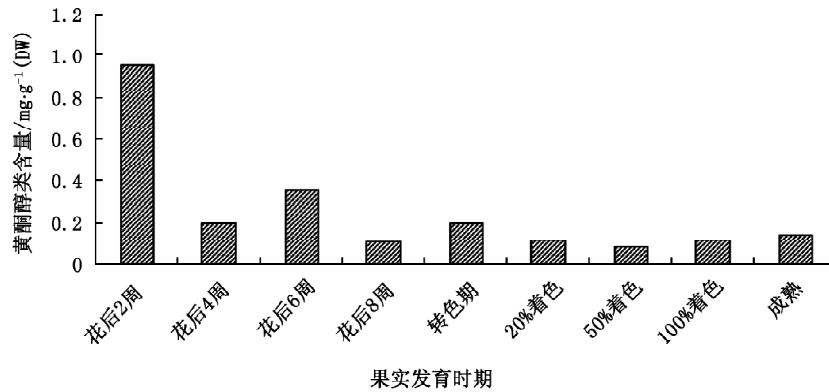


图7 山葡萄果实发育过程中黄酮醇类含量的变化

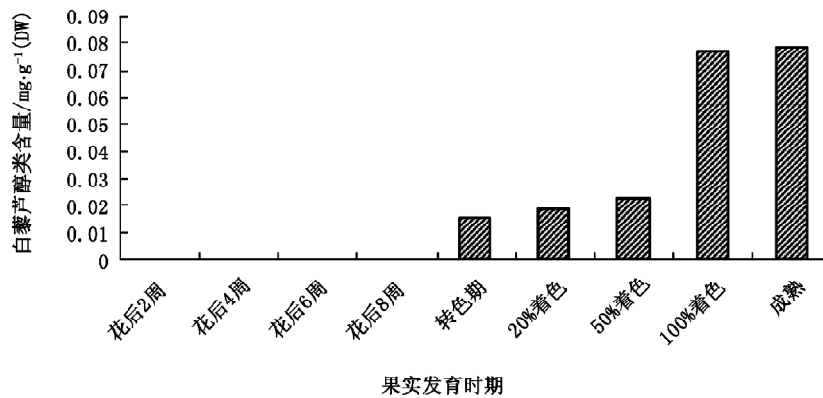


图8 山葡萄果实发育过程中白藜芦醇类含量的变化

后2周至花后8周末检测到白藜芦醇类物质。转色期含量为 $0.015 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ (DW)}$, 从转色期到果实50%着色, 上升趋势较缓, 果实50%着色到100%着色含量急剧上升, 在果实完全成熟时含量达到最大值, 为 $0.082 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ (DW)}$ 。

采用 HPLC-MS/MS 技术, 分析山葡萄果实发

育过程中花色苷和非花色苷酚成分及其含量变化的结果表明, 转色期前果皮内没有花色苷积累, 随着果实的成熟, 花色苷含量逐渐增加, 成熟期的含量最高; 非花色苷酚自花后2周至成熟期间的含量变化呈下降趋势。在山葡萄果实发育过程中检测出花色苷10种, 其中双糖苷5种、单糖苷5种; 非

花色苷酚类物质检测到14种,其中苯甲酸类2种、肉桂酸类3种、黄烷-3-醇类2种、黄酮醇类5种、白藜芦醇类2种。

参考文献

- 林兴桂(2007). 我国酿酒葡萄抗寒育种的回顾与展望. 果树学报, 24 (1): 89~93
- 沈玉杰, 郭太君(2000). 山葡萄栽培及酿酒技术. 北京: 中国劳动社会保障出版社
- 宋润刚, 路文鹏, 王军, 沈玉杰, 林兴桂, 葛玉香, 李晓红, 孙克娟(1999). 山葡萄品种选育回顾与展望. 北方园艺, (6): 36~38
- 宋润刚, 郑永春, 路文鹏, 李昌禹, 沈玉杰, 李晓红, 张宝香(2007). 山葡萄种内和种间杂交 $F_1 \sim F_4$ 代果实酸和糖含量的遗传分析. 园艺学报, 34 (4): 813~822
- 唐传核, 杨晓泉(2003). 葡萄及葡萄酒生理活性物质的研究概况 (I)生理活性物质. 中国食品添加剂, (1): 41~48
- Adams DO (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *Am J Enol Vitic*, 57: 249~256
- Alcalde-Eon C, Escribano-Bailón MT, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: a comprehensive study. *Anal Chim Acta*, 563: 238~254
- Baranac JM, Petranovic NA, Dimitric-Markovic JM (1996). Spectrophotometric study of anthocyanin copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. *J Agr Food Chem*, 44: 1333~1340
- García-Beneytez E, Cabello F, Revilla E (2002). Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *J Agr Food Chem*, 51: 5622~5629
- Gawel R (1998). Red wine astringency: a review. *Aust J Grape*, 4: 74~95
- Han FL, Zhang WN, Pan QH, Zheng CR, Chen HY, Duan CQ (2008). Principal component regression analysis of the relation between CIELAB color and monomeric anthocyanins in young cabernet sauvignon wines. *Molecules*, 13: 2859~2870
- Hardie W, Considine J (1976). Response of grapes to water-deficit stress in particular stages of development. *Am J Enol Vitic*, 27: 55~61
- He JR, Santos-Buelga C, Mateus N, Freitas V (2006). Isolation and quantification of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments from red wines by combination of column chromatographic techniques. *J Chromatogr A*, 1134: 215~225
- Heier A, Blaas W, Droß A, Wittkowski R (2002). Anthocyanin analysis by HPLC/ESI-MS. *Am J Enol Vitic*, 53: 78~86
- La Torre GL, Saitta M, Vilasi F, Pellicanò T, Dugo G (2006). Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem*, 94: 640~650
- Pérez-Magariño S, Revilla I, González-SanJosé ML, Beltrán S (1999). Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. *J Chromatogr A*, 847: 75~81
- Picinelli A, Suárez B, García L, Mangas JJ (2000). Changes in phenolic contents during sparkling apple winemaking. *Am J Enol Vitic*, 51 (2): 144~149