

固相萃取-高效液相色谱法测定葡萄酒中 白藜芦醇及其糖苷异构体

舒友琴^{1,2}, 陈 敏¹, 何计国¹, 戴蕴青¹, 冯力更¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450008)

摘要:建立了固相萃取-高效液相色谱(SPE-HPLC)测定葡萄酒中白藜芦醇及其糖苷异构体的方法,并用此方法测定了市售的15种葡萄酒中顺反式白藜芦醇及其糖苷的含量。实验确定了葡萄酒样品中的白藜芦醇及其糖苷的固相萃取方法,通过优化萃取条件,有效地去除了葡萄酒中大量干扰成分。采用Hypersil C₁₈柱(4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm)分离,以乙腈-水为流动相,线性梯度洗脱,用二极管阵列检测器分别于288 nm和306 nm波长下检测,4种组分分离良好,提高了分析结果的准确性。采用外标法定量,4种组分的质量浓度与其峰面积在一定的范围内有良好的线性关系,相关系数为0.997 3~0.999 9。4种组分的平均加标回收率为97.4%~98.8%(相对标准偏差为2.1%~3.2%),检测限为0.002~0.005 mg/L。对市售15种葡萄酒的检测结果表明,白藜芦醇作为葡萄酒中重要的生物活性成分,其含量与葡萄酒的酿造方式、葡萄品种、葡萄产地有密切的关系。该方法还可用于其他天然产物中白藜芦醇及其糖苷异构体的测定。

关键词:固相萃取;高效液相色谱;白藜芦醇;白藜芦醇苷;葡萄酒

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)01-0088-04

Determination of the Contents of Resveratrols and Piceids in Wines by High Performance Liquid Chromatography with Solid Phase Extraction

SHU Youqin^{1,2}, CHEN Min¹, HE Jiguo¹, DAI Yunqing¹, FENG Ligeng¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: A method has been developed for the determination of the contents of *cis*- and *trans*-resveratrols and piceids in wines by high performance liquid chromatography (HPLC) with solid phase extraction (SPE). The techniques of SPE including the activation of the SPE column, elimination of interference and elution conditions of samples were confirmed. The analytes were separated by using a Hypersil C₁₈ column (4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm) and acetonitrile-water as mobile phase with linear gradient elution. A photodiode array detector monitored at the detection wavelengths of 288 nm and 306 nm for *cis*- and *trans*-isomers, respectively. The external standard calibration curves were used in quantitation. There were good linear correlations between the concentrations and peak areas of the four components with the correlation coefficients of 0.997 3–0.999 9. The average recoveries were 97.4%–98.6% with relative standard deviations of 2.1%–3.2%. The detection limits were 0.002–0.005 mg/L. The method of SPE-HPLC eliminated a great deal of interferences in wines effectively by optimizing extraction conditions. The four isomers were well separated and the analytical results were improved well and truly. The results for determining 15 market wines showed that as an important bioactive substance, the resveratrol content has close relationships with brewing methods, varieties of grape and producing areas. The results also showed that it is a convenient, rapid, sensitive and accurate method. It can be used to analyze resveratrols and piceids in other natural samples.

Key words: solid phase extraction; high performance liquid chromatography; resveratrols; piceids; wines

收稿日期:2004-02-04

作者简介:舒友琴,女,副教授,硕士研究生。

通讯联系人:陈 敏,教授, Tel (010)62736767, E-mail: minchen19@163.com.

基金项目:国家科技攻关计划项目(项目编号:2001BA804A21)。

白藜芦醇(resveratrol),化学名称为芪三酚,分子式为 $C_{14}H_{12}O_3$ 。在自然条件下,白藜芦醇还能以葡萄糖苷即白藜芦醇糖苷(piceid)的形式存在,糖苷具有和白藜芦醇同样的生物活性。白藜芦醇及其糖苷具有顺式和反式两种构型,其中反式异构体的生物活性强于顺式异构体。在紫外线照射下,反式异构体能够转化为顺式异构体^[1]。葡萄酒中的白藜芦醇及其衍生物主要来源于葡萄果皮,其总量为顺反式白藜芦醇和顺反式白藜芦醇苷含量的总和。

葡萄酒的保健作用早为人们所认识。上世纪 90 年代以来,国内外对葡萄酒中白藜芦醇的保健作用和测定方法等进行了大量的研究^[2,3]。近几年,越来越多的药理试验表明,白藜芦醇对人体具有多种医疗保健作用,如抗肿瘤、抗凝血、抗高血脂症、抗菌、抗炎、防治骨质疏松等,因此引起了全世界科学家的重视^[1,4,5]。

葡萄酒中白藜芦醇及其异构体的测定常用高效液相色谱法^[6-8],其他如气相色谱-质谱法^[9]、高效液相色谱-质谱法^[10]、毛细管电泳法^[11]、二次微分简易示波伏安法^[12]等也有应用。但通常条件下,多数方法只能测定顺反式白藜芦醇或反式白藜芦醇与其糖苷,而不能同时测定 4 种异构体,因而测定结果不能真实反映葡萄酒中白藜芦醇异构体的含量。关于白藜芦醇 4 种异构体的同时测定,国内外有一些用 HPLC 法分析的报道^[7,13],但由于葡萄酒中存在的酚类物质对测定的干扰,使得 4 种白藜芦醇异构体的分离效果不够理想,影响测定结果的准确性。本文采用 C_{18} 固相萃取柱预处理样品,有效地去除了干扰组分。方法简便、快速、灵敏、准确。用本法同时测定了市售 15 种葡萄酒中的白藜芦醇 4 种异构体的含量。检测结果表明,葡萄酒的酿造工艺、葡萄品种及产地等多种因素均影响葡萄酒中的白藜芦醇含量。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

日本岛津公司高效液相色谱仪 SPD-M10AVP,二极管阵列(PDA)检测器,双泵,岛津色谱工作站。 C_{18} 固相萃取柱(500 mg/6 mL,Varian 公司)。

反式白藜芦醇标准品(纯度>99%,Sigma 公司),反式白藜芦醇苷标准品(纯度>99%,复旦大学药学院天然药物研究室);乙腈(色谱纯,Dikma 分装),三乙胺(分析纯),乙酸乙酯、无水乙醇等均为分析纯。

葡萄酒样品购于超市,各个酒样的酿造类型、葡萄品种以及产地为:样品 1,干红,赤霞珠,河北;样

品 2,干红,赤霞珠,山东;样品 3,干红,90%赤霞珠+10%美乐,河北;样品 4,干红,美乐,河北;样品 5,干红,加媚,河北;样品 6,干红,玫瑰香,山东;样品 7,干红,玫瑰蜜,云南;样品 8,干红,未注明,山东;样品 9,红葡萄酒,未注明,北京;样品 10,红葡萄酒,未注明,新疆;样品 11,红葡萄酒,玫瑰香,吉林;样品 12,红葡萄酒,野山葡萄,吉林;样品 13,干白葡萄酒,霞多丽,河北;样品 14,白葡萄酒,龙眼,河北;样品 15,白葡萄酒,夏多内,北京。

1.2 标准溶液的制备

分别称取反式白藜芦醇和反式白藜芦醇苷标准品 2.5 mg,用甲醇定容至 25 mL,制成含量为 100.0 mg/L 的储备液。取以上两溶液适量,置于 365 nm 紫外光下分别照射 2 h 和 1 h,作为顺式白藜芦醇和顺式白藜芦醇苷储备液,实验测得其转化率分别为 69.3% 和 58.2%。

1.3 色谱条件^[7]

Hypersil C_{18} 色谱柱(4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μ m);流动相:A 液为含 0.1% 三乙胺的 7.5% 乙腈水溶液,B 液为 100% 乙腈;线性梯度洗脱程序:20 min 内由 100% A 液变为 100% B 液,流速为 0.6 mL/min;二极管阵列检测器在 306 nm 和 288 nm 波长下检测,进样量 20 μ L。

1.4 样品处理

吸取葡萄酒样 5.00 mL,以小于 0.4 mL/min 的速度通过活化好的 C_{18} 固相柱,以淋洗液淋洗,抽真空除去柱中水分后,以 5.00 mL 乙酸乙酯洗脱,洗脱液即为测试液。

2 结果与讨论

2.1 组分的确定及检测波长的选择

样品中的白藜芦醇及其异构体通过与标准品保留时间的对照来确认。由 PDA 检测器扫描所得的紫外光谱图可知,顺反式白藜芦醇的最大吸收波长分别为 288 和 306 nm;顺反式白藜芦醇苷的最大吸收波长分别为 286 和 318 nm。故分别在 288 nm 和 306 nm 检测波长下提取色谱图,计算顺反式异构体的峰面积。

2.2 固相萃取条件的选择

葡萄酒组成复杂,含有多种酚类化合物,如黄酮、花色苷、单宁等,它们与白藜芦醇及其异构体的性质相似,干扰测定,因此样品的前处理十分重要。本文利用固相萃取的优势,通过选择淋洗液,有效地消除了其他化合物的干扰。

固相萃取柱在使用前要依次用 3 mL 乙酸乙酯、3 mL 95% 乙醇活化。样品通过固相萃取柱时,

应注意流速不大于 0.4 mL/min, 否则会因未达到分配平衡, 目标组分未被完全吸附而影响萃取回收率。样品过柱后, 依次用去离子水和 12% 乙醇 (pH 8.0, 用 1 mol/L 磷酸二氢钾和 1 mol/L 磷酸氢二钾调节) 淋洗以除去大部分的酚类物质。由于水分会影响洗脱剂对测定组分的溶解能力, 因此, 洗脱目标组分前一定要充分除去固相萃取柱中的水分。本试验采用真空下将柱抽干处理 20 min。

不同文献报道的进样量和洗脱剂用量的比例不同, 通常二者的体积比在 1:2 至 2:1 之间^[11,14]。本文研究发现, 以与样品等体积的乙酸乙酯洗脱, 由紫外分光光度法测得反式白藜芦醇和反式白藜芦醇苷的萃取回收率分别为 98.7% 和 98.3%。

表 1 顺反式白藜芦醇及白藜芦醇糖苷测定的工作曲线和检测限

Table 1 Calibration curves and detection limits of *cis*- and *trans*-resveratrols and piceids

Component	Concentration/(mg/L)	Regression equation ¹⁾	<i>r</i>	Detection limit ²⁾ /(mg/L)
<i>trans</i> -Resveratrol	5.0 - 100.0	$Y = 51799X + 50193$	0.9976	0.003
<i>trans</i> -Piceid	5.0 - 100.0	$Y = 109471X - 71813$	0.9989	0.005
<i>cis</i> -Resveratrol	3.46 - 69.3	$Y = 70448X + 107208$	0.9991	0.002
<i>cis</i> -Piceid	2.92 - 58.2	$Y = 97101X + 20438$	0.9999	0.003

1) *Y*: Peak area; *X*: mass concentration, mg/L. 2) calculated as $S/N = 3$.

2.4 方法的回收率及精密度

取一已知 4 种异体含量的葡萄酒样 5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加入经光照的 100.0 mg/L 反式白藜芦醇和反式白藜芦醇苷储备液各 100 μL, 用甲醇稀释至刻度。按样品处理方法进行预处理, 按色谱条件测定, 重复测定 5 次, 计算方法的回收率和精密度(见表 2)。

表 2 方法的精密度和回收率 ($n = 5$)

Table 2 Precision and recovery of the method ($n = 5$)

Component	Background/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
<i>trans</i> -Resveratrol	1.535	0.307	1.836	98.1	3.2
<i>trans</i> -Piceid	0.649	0.418	1.056	97.4	2.6
<i>cis</i> -Resveratrol	0.631	0.693	1.316	98.8	2.8
<i>cis</i> -Piceid	1.251	0.582	1.821	97.9	2.1

2.5 样品测定

分别吸取 15 种葡萄酒样各 5.00 mL, 按样品处理方法预处理, 按色谱条件测定, 以保留时间定性, 以外标法定量。图 1 为混合标样和一葡萄酒样品在检测波长为 306 nm 时的色谱图, 表 3 为葡萄酒样测定结果。

由表 3 可知, 在市售的干红、甜红、干白和白葡萄酒 4 种类型葡萄酒中, 干红葡萄酒中白藜芦醇及其糖苷的含量最高, 红葡萄酒次之, 白葡萄酒最低, 这与它们的制作过程有关。由于白藜芦醇及其糖苷主要存在于葡萄皮中, 易溶于醇, 微溶于水, 干红葡萄酒是以红葡萄带皮发酵, 在发酵过程中, 酒精的浸

2.3 工作曲线及方法检测限

取反式白藜芦醇和反式白藜芦醇苷储备液分别制备 100.0, 60.0, 40.0, 20.0, 10.0, 5.0 mg/L 的系列标准溶液, 按色谱条件测定, 以峰面积 *Y* 对组分相应的质量浓度 *X* (mg/L) 进行线性回归, 得到反式白藜芦醇和反式白藜芦醇苷的回归方程(见表 1)。

取以上两系列标准溶液适量, 置于 365 nm 紫外光下分别照射 2 h 和 1 h, 按色谱条件测定, 由反式异构体浓度的减少求出相应溶液中顺式异构体的浓度, 以顺式异构体的峰面积 *Y* 对相应的质量浓度 *X* (mg/L) 进行线性回归, 得到顺式白藜芦醇和顺式白藜芦醇苷的回归方程。根据信噪比 $S/N = 3$ 计算检测限。结果列于表 1。

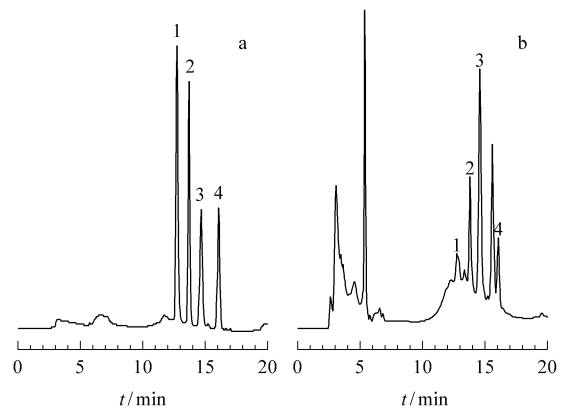


图 1 标准品 (a) 和样品 (b) 的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard solution (a) and sample solution (b)

1. *trans*-piceid; 2. *cis*-piceid; 3. *trans*-resveratrol; 4. *cis*-resveratrol.

提作用使果皮中的白藜芦醇能够进入葡萄酒中。白葡萄酒是以葡萄去皮后所得纯汁发酵制成, 而红葡萄酒是以干红葡萄酒加其他物质调制或以葡萄加糖发酵得到, 因而后两类葡萄酒中的白藜芦醇及其糖苷含量较低, 特别是被测的 3 种白葡萄酒中有两种未能检出白藜芦醇及其糖苷。

葡萄品种对酒中的白藜芦醇及其糖苷的含量有明显影响, 不同品种的葡萄酿造的葡萄酒中, 白藜芦醇及其糖苷的含量有较大差异。表 3 中, 样品 1~8 同为干红葡萄酒, 但由于葡萄品种不同, 导致酒中白藜芦醇及其糖苷的含量不同。总体上, 玫瑰蜜葡

萄中白藜芦醇及其糖苷含量最高,加媚和赤霞珠次之,其次是美乐,玫瑰香较低。这可能是由于不同的

葡萄品种对紫外辐射的反应程度不同或是感染真菌的程度不同所致。

表 3 葡萄酒中白藜芦醇及其糖苷的含量($n = 3$)

Table 3 Contents of resveratrols and piceids in wines($n = 3$)

Sample No.	Wine type	Grape type	Production place	<i>trans</i> -Res/ (mg/L)	<i>trans</i> - PD/ (mg/L)	<i>cis</i> -Res/ (mg/L)	<i>cis</i> - PD/ (mg/L)	Total/ (mg/L)
1	dry red wine	Cabernet Sauvignon	Hebei	3.312	0.753	0.938	1.755	6.778
2	dry red wine	Cabernet Sauvignon	Shandong	2.393	0.988	1.264	1.193	5.838
3	dry red wine	Cabernet Sauvignon 90% + Merlot 10%	Hebei	2.741	1.089	0.752	1.391	5.973
4	dry red wine	Merlot	Hebei	1.535	0.649	0.631	1.251	4.066
5	dry red wine	Gamay	Hebei	3.130	1.065	0.979	0.972	6.146
6	dry red wine	Muscat Hamburg	Shandong	0.206	0.804	0.169	0.699	1.879
7	dry red wine	Rose honey	Yunnan	3.561	1.513	2.614	1.056	8.744
8	dry red wine	unknown	Shandong	3.017	1.207	0.785	1.427	6.436
9	red wine	unknown	Beijing	0.202	-	0.019	0.506	0.727
10	red wine	unknown	Xinjiang	0.041	-	0.024	-	0.065
11	red wine	Meiguimi	Jilin	0.031	0.014	-	-	0.045
12	red wine	<i>V. amurensis</i> Rupr.	Jilin	0.312	0.263	0.025	0.251	0.851
13	dry white wine	Chardonnay	Hebei	-	-	-	-	-
14	white wine	Longyan	Hebei	-	-	-	-	-
15	white wine	Chardonnay	Beijing	0.217	-	-	0.234	0.451

- : not determined.

比较样品 1 和样品 2 的测定结果可知,由同一品种不同产地的葡萄酿造的干红葡萄酒中白藜芦醇及其糖苷的含量也不同。这可能是由于不同地区的气候及环境条件不同所致。从理论上讲,生长在湿热条件下的葡萄比生长在冷凉、干燥条件下的葡萄更易于受到病害侵染,因此果实中所含的白藜芦醇及其糖苷也相应较多。

总体上,葡萄酒中的反式白藜芦醇含量高于顺式白藜芦醇,但不同葡萄酒中反式白藜芦醇、反式白藜芦醇苷、顺式白藜芦醇和顺式白藜芦醇苷的绝对含量及顺反异构体之间的比例都有明显差异。

3 结论

本文建立的固相萃取预处理方法,有效地去除了 HPLC 分析中的干扰成分,4 种异构体分离良好,提高了分析结果的准确性。此方法还可用于其他天然产物中白藜芦醇及其糖苷异构体的测定。

对市售 15 种葡萄酒的检测结果表明,白藜芦醇作为葡萄酒中重要的生物活性成分,其含量与葡萄酒的酿造工艺、葡萄品种、葡萄产地有密切的关系。

参考文献:

[1] Jeandet P, Bessis R, Maume B F, Meunier P, Peyron D, Trollat P. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(2): 316
 [2] Siemann E H, Creasy L L. *Am J Enol Vitic*, 1992, 43(1): 49

[3] Jang M, Cai L, Udeani G O, Slowing K V, Thomas C F, Beecher C W W, Fong H H S, Farnsworth N R, Kinghorn A D, Mehta R G, Moon R C, Pezzuto J M. *Science*, 1997, 275(1): 218
 [4] Frankel E N, Bosanek C A, Meyer A S, Silliman K, Kirk L L. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 834
 [5] Zhao Xia, Lu Yang, Chen Zenai. *Chinese Traditional Herb and Drugs* (赵霞, 陆阳, 陈泽乃. 中草药), 1998, 29(12): 837
 [6] Goldberg D M, Ng E, Karumanchiri A, Diamandis E P, Soleas G J. *Am J Enol Vitic*, 1996, 47(4): 415
 [7] Dai Yunqing, Han Yashan, Hui Bodi, Zhao Wenen, Chen Lei, Zhong Su. *Journal of China Agricultural University* (戴蕴青, 韩雅珊, 惠柏棣, 赵文恩, 陈雷, 钟粟. 中国农业大学学报), 2002, 7(1): 14
 [8] Han Yashan, Chen Lei, Dai Yunqing. *Chinese Journal of Chromatography* (韩雅珊, 陈雷, 戴蕴青. 色谱), 1999, 17(4): 366
 [9] Soleas G J, Goldberg D M, Diamandis E P, Karumanchiri A, Yan J, Ng E. *Am J Enol Vitic*, 1995, 46(3): 346
 [10] Dominguez C, Guillen D A, Barroso C G. *J Chromatogr A*, 2001, 918: 303
 [11] Dobiasova Z, Pazourek J, Havel J. *Electrophoresis*, 2002, 23: 263
 [12] Zhang Hongfang, Zhang Xiuqi, Zheng Jianbin, Gao Hong. *Journal of Instrumental Analysis* (张宏芳, 张秀琦, 郑建斌, 高鸿. 分析测试学报), 2001, 20(2): 21
 [13] Lamuela-Raventos R M, Romero-Perez A I, Watterhouse A L, Lloret M, de la torre-Boronat M C. *ACS Sym Ser*, 1997, 661: 56
 [14] Gu X, Greasy L, Kester A, Zeece M. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 3 223