

宁夏葡萄酒中白藜芦醇含量的高效液相色谱快速测定

冯愈钦,郭红艳,刘贵珊*,何建国,王松磊,贺晓光
(宁夏大学农学院,宁夏银川750021)

摘要:建立高效液相色谱法测定葡萄酒中白藜芦醇的方法,考察直接进样法的检测波长、洗脱强度、流动相 pH 值、柱温、样品 pH 值等因素对酒样分离的影响,建立 HPLC 检测葡萄酒中白藜芦醇的方法,相关系数 r 为 0.999 9,线性范围为 1 mg/L~20 mg/L,精密度、稳定性、回收率试验的 RSD 分别为 1.16%、2.9%和 1.25%,酒样检测发现白藜芦醇的含量随酒的年份和品种变化,品种间比较结果为:蛇龙珠最优,梅鹿辄、赤霞珠、霞多丽次之,贵人香最低,其中蛇龙珠含量高达 6 mg/L。

关键词:白藜芦醇;高效液相色谱;回收率;葡萄酒

Rapid Determination of Resveratrol in Ningxia Wine by High Performance Liquid Chromatography

FENG Yu-qin, GUO Hong-yan, LIU Gui-shan*, HE Jian-guo, WANG Song-lei, HE Xiao-guang
(Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China)

Abstract: The effects of detection wavelength, solvent strength, mobile phase pH, column temperature, sample pH and other factors on the separation of wines were examined. A direct injection HPLC method for determination of resveratrol in wine was established. The correlation coefficient r was 0.999 9, linear range was 1 mg/L~20 mg/L, RSD of precision experiment, stability experiment and recovery experiment were 1.16%, 2.9% and 1.25% respectively. It was found that resveratrol content of wines varied with years and varieties, its changing law was: Cabernet Gernischt was the best choice, Merlot and Cabernet Sauvignon and Chardonnay took second, the last was Riesling. Resveratrol content in Cabernet Gernischt was up to 6 mg/L.

Key words: resveratrol; HPLC; rate of recovery; wine

世界酿酒葡萄种植的地带是北纬 30℃~50℃和南纬 30℃~40℃之间^[1-3]。我国的葡萄产区大部分在适宜葡萄生长的北半球 10℃~20℃等温线之内,宁夏贺兰山东麓地区是酿酒葡萄适宜的生态区之一。种植面积已发展到 5 万多亩,占全国总面积 31 万亩的 16%,在国内九大葡萄基地中名列第四位^[4-7]。葡萄酒产业已成为具有明显地方特色的农业支柱产业之一。

白藜芦醇是葡萄酒中最主要的活性物质,具有抗癌、抗突变、延长寿命等作用,在葡萄酒中的含量在 mg/L 数量级,是衡量葡萄酒品质的一个重要依据。高

效液相色谱法具有灵敏高、选择性强、快速分离等优点,适用于分析成分复杂、干扰项较多的痕量检测,是近年来研究的焦点^[8-11]。

本研究将对西夏王葡萄酒品牌旗下的蛇龙珠、梅鹿辄、赤霞珠、贵人香、霞多丽 5 个品种采用直接进样法,寻找最适色谱条件,并对所建立的检测方法进行考察,用于不同品种、不同年份葡萄酒保藏过程中的白藜芦醇变化规律的深入研究。为我国原产地域命名葡萄酒质量标准体系研究奠定基础,这将对我国葡萄酒与葡萄酒产业发展具有重要理论意义和应用价值。

基金项目:国家自然科学基金项目(31401480)

作者简介:冯愈钦(1992—),男(汉),硕士研究生,研究方向:食品加工与安全。

*通信作者:刘贵珊(1979—),男,副教授,博士,研究方向:功能性食品营养与评价。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AGILENT1100 高效液相色谱仪、AQ-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、一次性有机滤器(0.45 μm×

13 mm)、滤膜(0.45 μm ×50 mm):美国安捷伦科技公司;PHS-25 pH计:上海仪电科学仪器股份有限公司;ESJ-4A 电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;BT600-1J 循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司。

白藜芦醇标品(纯度 98 %):中国食品药品检定研究所;乙腈(色谱级):美国 CHROMADEX;2013、2014 年份的西夏王干红(赤霞珠、梅鹿辄、蛇龙珠)、西夏王干白(霞多丽、贵人香):宁夏西夏王葡萄酒业有限公司;甲醇(色谱级)、磷酸、氨水、去离子水、超纯水:天津科密欧化学试剂有限公司。

1.2 样品的配制

白藜芦醇标准溶液的配制:称取白藜芦醇标品 5 mg,溶解于甲醇中,在 100 mL 容量瓶中定容,摇匀,配制成 50 mg/L 的标准溶液。用甲醇配制成 1、2、4、6、10、20 mg/L 系列浓度梯度的标准溶液。高效液相色谱分析前,用 0.45 μm 的一次性有机滤器过滤。葡萄酒经 0.45 μm 一次性有机滤器过滤除去杂质。

1.3 方法

采用 AQ-C18(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱,二级管阵列检测器(即 DAD 检测器),进样量为 10 μL ,流速为 1.0 mL/min,分别检测波长、洗脱强度、流动相 pH 值,柱温,样品 pH 值等因素对样品中白藜芦醇分离效果的影响,确定最终色谱条件。通过对标品溶液的进行全波长扫描,提取 HPLC 分析白藜芦醇的最佳检测波长。等度洗脱、梯度洗脱分离葡萄酒样品,比较不同条件下的分离效果,同时分析相应条件下的分离图谱,调节梯度洗脱中的洗脱强度,调解流动相 pH 值,寻找满足要求的梯度程序。用 5 % 的氨水调节酒样 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0,按上述 HPLC 色谱条件测试,上样前过 0.45 μm 一次性有机滤器过滤。柱温是 HPLC 分析中的重要分析参数,讨论色谱柱温度对分离酒样中白藜芦醇的影响,选取最适温度。通过标准曲线、精密度试验、稳定性研究、回收率研究考察仪器和方法的精密性、准确性、稳定性。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

在 190 nm~800 nm 范围内对制备的白藜芦醇标准溶液进行全波长扫描,测定其紫外吸收图谱,如图 1,考察白藜芦醇的最大吸收波长。

由图 1 可知,溶剂甲醇的吸收峰在 200 nm 附近,而白藜芦醇的最大吸收波长位于 310 nm 附近。已报到研究中,如沈齐英^[12]、高年法^[13]、孙德铁^[14]等均设定白藜

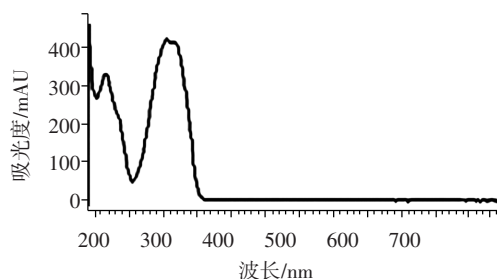


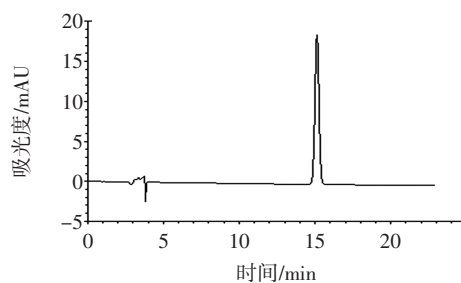
图 1 白藜芦醇的紫外扫描图谱

Fig.1 UV scanning spectra of resveratrol

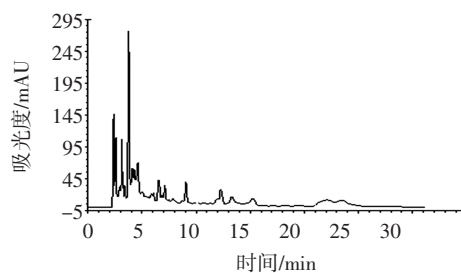
芦醇的 HPLC 分析的最佳检测波长为 306 nm,与本次试验结果基本一致,故确定 306 nm 为高效液相色谱分析白藜芦醇的检测波长。

2.2 洗脱条件对样品分离的影响

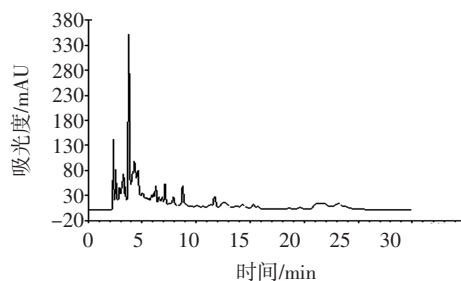
流动相对样品分离的选择性取决于有机溶剂的种类,相应的分离强度则主要取决于流动相中有机溶剂所占的体积分数^[15-17]。采用等度洗脱,A:B=75:25(体积比),柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 306 nm 时,4 mg/L 白藜芦醇标准品、2014 年赤霞珠、2014 年梅鹿辄酒样图谱。等压洗脱色谱图见图 2。



a. 4 mg/L 标准溶液



b. 赤霞珠干红



c. 梅鹿辄干红

图 2 等压洗脱色谱图

Fig.2 Isobaric elution chromatogram

由如图2可知,白藜芦醇标品的保留时间为15.13 min,对称因子1.007,峰形较好,赤霞珠酒样保留时间为15.22 min,分离效果较好,梅鹿辄在15.20 min附近有重叠峰,没有得到理想的分离效果。

梯度程序1:磷酸调解水的pH=2.4,起始A:B=85:15(体积比);0~6 min内,15%~20%B;6 min~10 min

内,20%~28%B;10 min~20 min内,28%~35%B;20 min~30 min内,35%~50%B。该条件下,梅鹿辄酒样中白藜芦醇的分离效果较好,白藜芦醇的保留时间为16.41 min,蛇龙珠酒样分离效果不够理想,酒样的色谱图如图3。进一步根据样品的色谱峰图分析,需增加流动相B的浓度,加大洗脱强度。

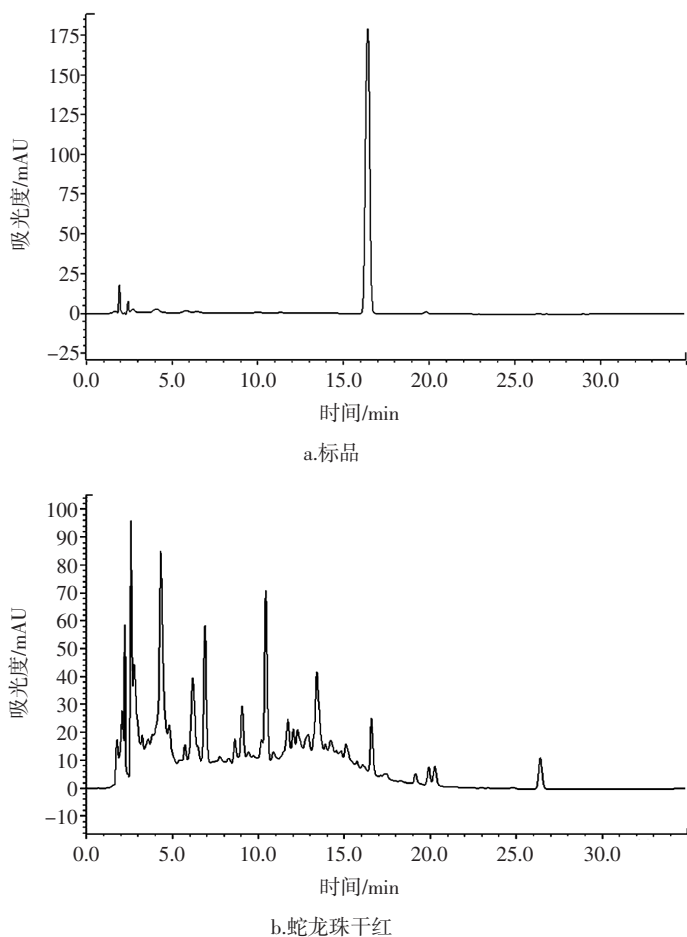


图3 梯度程序1洗脱色谱图

Fig.3 Gradient elution chromatography 1

梯度程序2:磷酸调节A的pH=2.4,起始时A:B=65:35(体积比),0~10 min,保持35%B;10 min~20 min内,35%~100%B;20 min~30 min,保持100%B;30 min~35 min内,100%~35%B;35 min~40 min,保持35%B。酒样洗脱色谱图如图4。

由图4可知,改进的色谱条件下,白藜芦醇的保留时间为7.47 min,标品中22 min处为甲醇的吸收峰,蛇龙珠样品得到了良好的分离效果,且在白藜芦醇含量较少的干白中也取得了不错的分离效果。所以,最终被确定梯度程序2为最佳色谱条件。

2.3 色谱条件的确定

2.1~2.2 确定反相高效液相色谱法分析葡萄酒中白藜芦醇的色谱条件为,进样量为10 μ L,流速为

1.0 mL/min,柱温30 $^{\circ}$ C,检测波长306 nm,梯度洗脱:A为去离子水(pH=2.4),B为纯乙腈,起始时A:B=65:35(体积比),0~10 min,保持35%B;10 min~20 min内,35%~100%B;20 min~30 min,保持100%B;30 min~35 min内,100%~35%B;35 min~40 min,保持35%B。

2.4 酒样pH值对样品分离的影响

葡萄酒中的酸类物质主要来源于两方面,即葡萄组织自身所含的酸和发酵过程产生的酸,一般葡萄酒的pH值在2.7~3.8范围内。按梯度程序2测试,发现白藜芦醇的峰面积变化甚微,说明进样量很少,样品的pH值对检测结果的影响很小。

2.5 柱温的选择

柱温对HPLC分析物质的保留行为、峰形和分离

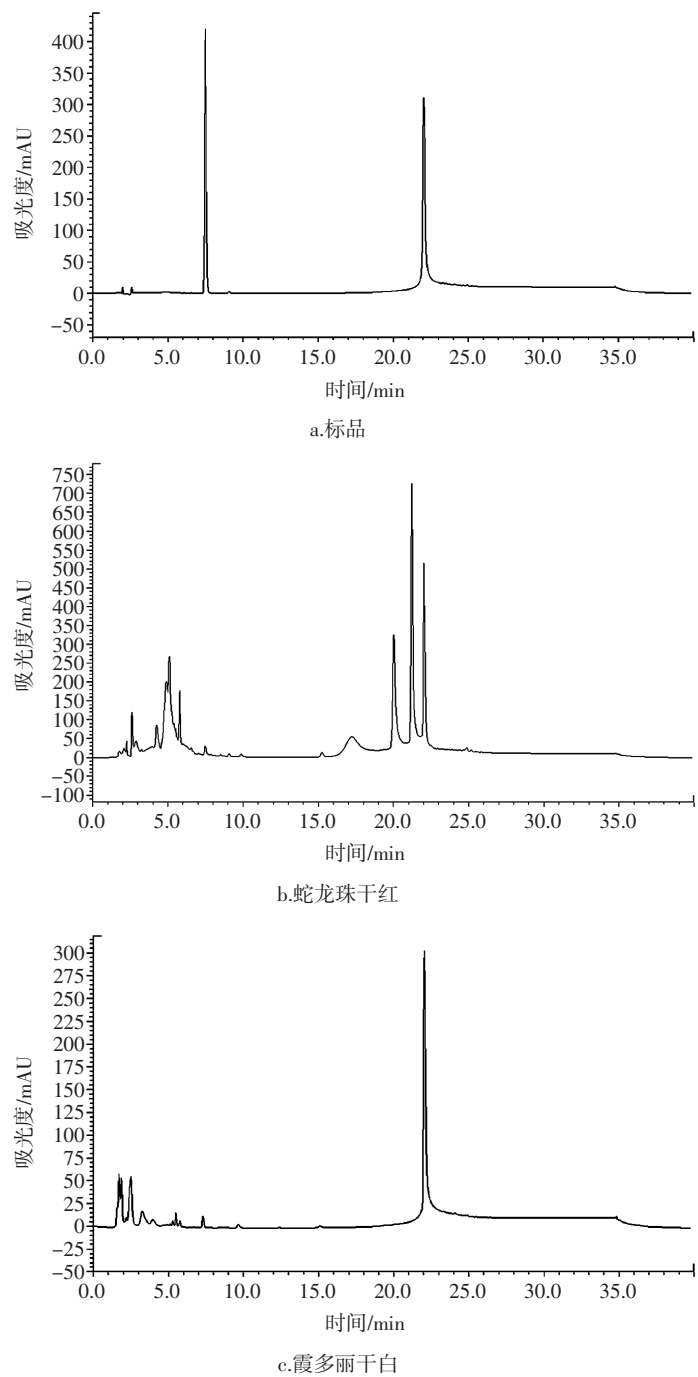


图 4 梯度程序 2 洗脱色谱图
Fig.4 Gradient elution chromatography 2

选择性均存在影响。过低的柱温会降低待分离物质的扩散速度,致使分离效能降低,峰形变宽,保留时间变长;相反,过高的柱温会使样品中各个组分在固液两相中的扩散速度加快,同时挥发靠拢,不利于组分的分离^[18-20];如果柱温高于 60 ℃,尤其在水相 pH<3 或 pH>8 的条件下,色谱柱的硅烷键合固定相很可能会发生水解。白藜芦醇在高温下不稳定,容易氧化,所以研究选择柱温为 30 ℃。

2.6 线性关系

按照浓度从小到大的顺序,依次准确吸取 1、2、4、6、10、20 mg/L 系列浓度梯度的标准溶液,在 2.3 色谱条件下进样检测,得到相应峰面积。白藜芦醇的标准曲线见图 5。

由图 5 得,白藜芦醇的线性回归方程为: $y=81.474x+5.3219$,相关系数 $r=0.9999$,线性范围为 1 mg/L~20 mg/L,该研究范围内白藜芦醇的质量浓度和

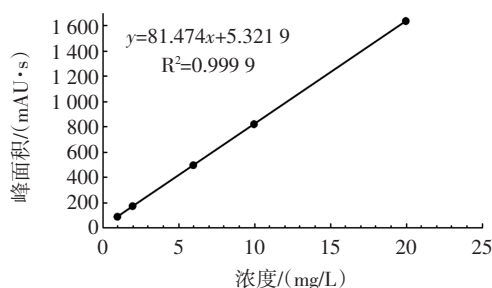


图5 白藜芦醇的标准曲线

Fig.5 The standard curve of resveratrol

峰面积的线性关系良好,可以满足定量分析的要求。

2.7 精密度研究

取2014年份赤霞珠干红葡萄酒,在2.3色谱条件下,连续重复进样5次,进行精密度研究,记录峰面积,计算相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD),研究结果见表1。

表1 酒样的精密度研究结果

Table 1 Results of research on the precision of wine samples

赤霞珠进样次数	峰面积/(mAU·s)	RSD/%
1	191.9	1.16
2	189.0	
3	192.4	
4	191.5	
5	191.3	

表明样品的峰面积基本稳定,计算得5次分析的RSD=1.16%,表明该方法下精密度良好。

2.8 稳定性研究

取4 mg/L白藜芦醇标准溶液,按确定的色谱条件分别在0、2、4、6、16、24 h进样检测。

表2 标样的稳定性研究结果

Table 2 Results of stability studies

时间/h	峰面积/(mAU·s)	RSD/%
0	356.7	2.9
2	357.8	
4	364.6	
6	365.9	
16	378.1	
24	379.2	

由表2可知,随着时间的增加,标样检测的峰面积逐渐增大,白藜芦醇浓度的检测结果逐渐偏大,分析原因可能是研究室温度偏高,自动进样瓶中的甲醇随时间挥发。计算稳定性试验的峰面积的RSD为2.9%,表明检测条件下白藜芦醇的稳定性较好。

2.9 加标回收率研究

回收率是指在既定的色谱条件下,在含有已知量

白藜芦醇的样品中加入一定量的白藜芦醇标品,在相同检测条件下得到的分析结果添加量占实际添加量的百分比,计算公式^[21-23]见(1):

$$\text{回收率}/\% = (\text{检测量} - \text{原样品含量}) / \text{加入量} \times 100 \quad (1)$$

向已知浓度的2014年份赤霞珠样品中分别添加1、2、4 mg/L的白藜芦醇标准溶液,在选定色谱条件下检测,计算。酒样的回收率研究结果见表3。

表3 酒样的回收率研究结果

Table 3 Results of recovery of wine samples

样品含量/(mg/L)	加入量/(mg/L)	检测量/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.29	1	3.006	91.37	97.12	1.25
2.29	2	4.31	100.47		
2.29	4	6.26	99.52		

由表3可知,赤霞珠酒样的平均回收率为97.12%,RSD为1.25%。结果表明样品回收率良好,方法的准确性较高。

2.10 实际样品的测定与含量比较

西夏王葡萄酒中白藜芦醇的含量随葡萄品种和年份的不同而变化,结果见表4。

表4 不同品种、年份葡萄酒中白藜芦醇含量

Table 4 Resveratrol content in grape wine from different varieties and years

年份	红葡萄酒/(mg/L)			白葡萄酒/(mg/L)	
	蛇龙珠	梅鹿辄	赤霞珠	贵人香	霞多丽
2014	6.00	4.09	2.29	0.473	1.482
2013	5.521	4.48	3.47	0.528	1.397

由表4表明:同一品种葡萄,年份不同,白藜芦醇含量也不同。红葡萄酒(蛇龙珠、梅鹿辄、赤霞珠)中白藜芦醇含量普遍较高,而白葡萄酒(贵人香、霞多丽)中白藜芦醇的含量则较低,其中蛇龙珠干红的白藜芦醇的含量最高,2014年份含量为6 mg/L,2013年份含量为5.52 mg/L;比较发现,白藜芦醇含量在葡萄酒中的含量变化为:蛇龙珠最优,梅鹿辄、赤霞珠、霞多丽次之,贵人香最低。

3 结论

研究分别讨论并考察溶剂、检测波长、洗脱强度、梯度洗脱、流动相pH值,柱温,样品pH值等因素对样品中白藜芦醇分离效果的影响,建立了HPLC检测葡萄酒中白藜芦醇的方法、线性关系研究及精密度研究、稳定性研究、回收率研究。表明该方法的精密度、稳定性、加标回收率较好,适用于一般葡萄酒样品中白藜芦醇的定量分析检测。样品检测发现红葡萄

酒中白藜芦醇含量普遍较高,而白葡萄酒中白藜芦醇的含量则较低。该研究为白藜芦醇成分与特征研究提供理论依据,对葡萄酒中白藜芦醇的检测提供重要参考。

参考文献:

- [1] 王丽娜.宁夏产区酿酒葡萄品质与葡萄酒质量的研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2011
- [2] 宋育阳.宁夏贺兰山葡萄酒厂酵母菌的鉴定[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2009
- [3] Ayelet Z, Aliza D D, Gavriel C, et al. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer: II. Green tea extracts and resveratrol[J]. Oral Oncology, 2013,49(6):502-506
- [4] 李博然.“宁夏贺兰山东麓”葡萄酒香味物质变化规律研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2004
- [5] Wang H L, Moon S, Kim H L, et al. Hyperspectral near-infrared imaging for the detection of physical damages of pear[J]. Journal of Food Engineering, 2014,130 :1-7
- [6] Gabriel A V, Renfu L, José M A. Prediction of firmness and soluble solids content of blueberries using hyperspectral reflectance imaging[J]. Journal of Food Engineering, 2013,115:91-98
- [7] Qing Z S, Ji B P, Zude M. Predicting soluble solid content and firmness in apple fruit by means of laser light scattering images[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 82(1):58-67
- [8] 韩国民.葡萄酒多酚 HPLC 指纹图谱的初步研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2010
- [9] 何君. 葡萄酒中白藜芦醇及糖苷异构体的 HPLC 方法发展[D]. 南京:南京理工大学,2012
- [10] Armando M F, Paula O, João P M . Determination of anthocyanin concentration in whole grape skins using hyperspectral imaging and adaptive boosting neural networks[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 105:216-226
- [11] Julio N B, José M H H, Francisco J R P, et al. Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near-infrared hyperspectral image: A preliminary approach[J]. Food Chemistry, 2014,152:586-591
- [12] 沈齐英,贾丹.高效液相色谱测定葡萄酒中白藜芦醇含量[J].北京石油化工学院学报,2014,22(4): 1-3
- [13] 高年法,姜丽,张健.HPLC 法测定葡萄酒中白藜芦醇的基础性研究[J].酿酒,2005,32(1):75-76
- [14] 孙德铁,彭学涛.葡萄酒中的酸度与降酸方法选择[J].中外葡萄与葡萄酒,1990(2):35-40
- [15] 吴翠霞. 白藜芦醇及其衍生物的抑菌活性及对番茄早疫病菌的作用机理研究[D]. 泰安:山东农业大学,2012
- [16] 廖文玉.葡萄皮渣中白藜芦醇的提取与纯化研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2008
- [17] Francisco J R P, José M H H, Julio N B. A novel method for evaluating flavanols in grape seeds by near infrared hyperspectral imaging [J]. Talanta, 2014,122:145-150
- [18] 王长松,赵莹,赵广荣. 微生物合成白藜芦醇的研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2):352-357
- [19] 马远.酿酒葡萄中白藜芦醇的研究[D].杨凌:西北农林科技大学, 2003
- [20] 栗天罡,李攻科,张展霞,等.固相微萃取-衍生化与气相色谱-质谱联用分析葡萄酒中多酚类化合物[J]. 中山大学学报(自然科学版),2001(1):54-57
- [21] 李攻科,李晓东,马亭,等.SPE-GC-MS 法测定葡萄酒中顺反式白藜芦醇[J].中山大学出版学报(自然科学版),2000,39(4):63-67
- [22] 张桂娟.白藜芦醇的提取与检测方法研究[J].食品与机械,2013, 29(2):234-237
- [23] Qingyi Chu, Mary O' Dwyer, Michael G Zeece, et al. Direct Analysis of Resveratrol in Wine by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis[J]. Agric & Food Chem, 1998,46:509-513

收稿日期:2016-05-18

社会主义核心价值观

【国家】富强 民主 文明 和谐

【社会】自由 平等 公正 法治

【公民】爱国 敬业 诚信 友善