

固相微萃取-衍生化法与气相色谱-质谱联用 分析葡萄酒中多酚类化合物*

栾天罡, 李攻科, 张展霞

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 建立固相微萃取 (SPME) 和甲基硅烷化结合新的样品预处理方法, 应用气相色谱-质谱联用技术对葡萄酒中极性有机物进行了分析. 鉴定了其中 19 种多酚化合物和极性有机物, 并对其中的白藜芦醇进行了定量分析. 方法简单, 快速, 灵敏度高.

关键词: 固相微萃取; 气相色谱-质谱法; 衍生化; 多酚类化合物

中图分类号: O656.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 01-0054-04

大量的资料和统计数据表明, 适度饮用葡萄酒对人体有益. 葡萄酒不仅有抑制心血管等疾病的作用^[1], 而且在抗癌症方面有着其它酒饮品不可比拟的潜力^[2]. 葡萄酒与其它酒类饮品的主要区别在于葡萄酒中存在多酚类和黄酮类化合物. 近年来的研究表明多酚类物质具有显著的抗氧化、抗自由基的作用, 如白藜芦醇 (resveratrol) 等^[3]. 因此, 对葡萄酒中多酚化合物的分析有非常重要的意义.

目前, 葡萄酒中多酚化合物的分析方法, 主要有高效液相色谱 (HPLC) 法, 气相色谱 (GC) 和毛细管电泳 (CE) 法^[4~6]. 由于多酚类化合物的极性较强, 其样品预处理都比较繁琐, 需要用有机溶剂进行萃取分离, 萃取率和重现性都比较低. GC-MS 法, 不衍生而直接进样, 色谱峰的拖尾较严重, 且处理后的样品容易带水, 因此通常需要衍生化步骤, 其过程也较复杂. HPLC 法, 样品预处理虽不需衍生化, 但为提高灵敏度, 样品需要量大, 步骤繁琐, 耗时长, 待测组分损失较为严重.

固相微萃取 (SPME) 是近年发展起来的一种新的无溶剂样品预处理技术^[7]. SPME 通过石英纤维表面的高分子涂层对样品中的有机物分子进行萃取和预富集, 在一个简单过程中同时完成采样、萃取、富集和进样, 提高了分析速度和灵敏度, 非常适合于水相样品的萃取分离. 对于极

性和非挥发性有机物, 可用衍生化 SPME 方法^[8]. 本文分析了 SPME 与硅烷化衍生化方法结合的可能性, 建立了 SPME 涂层中硅烷化的样品预处理方法, 并与 GC/MS 联用对葡萄酒中的多羟基酚类化合物进行定性分析, 并对反式白藜芦醇进行定量分析.

2 实验部分

2.1 SPME 装置

SPME 手动取样装置及 85 μm 聚丙烯酸酯 (PA)- $[-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}_2-\text{R})_n]^+$ 萃取纤维购自 SUPLECO 公司; 电磁搅拌/加热操作台、搅拌子 (3 $\times$ 10 mm)、4.6 mL 顶端带有孔盖子和聚四氟乙烯隔垫的样品瓶均购自 SUPLECO 公司; 固相萃取 SPE C18 柱 (6 mL) 购自 Supleco 公司.

2.2 仪器设备和操作条件

惠普 HP6890 带电子控制系统气相色谱仪, MSD-5973 质谱检测器配 G1701AA 工作站. 气相色谱采用 HP-5MS 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm 毛细柱, 固定相为 ρ 5% biphenyl 和 ρ 95% dimethylpolysiloxane (购自 HP 公司). 柱升温程序为: 初始温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 300 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min, 总分析时间为 25 min; 载气为高纯氦气, 恒流 1 mL $\cdot$ min⁻¹. 进样口温度保持 240 $^{\circ}\text{C}$, 初始状态为无分流进样, 7 min 后打开分流阀, 分流比为 30:1.

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990292); 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室基金资助项目 (OGL-9708)

收稿日期: 2000-04-03; 作者简介: 栾天罡 (1971-), 男, 博士, 讲师, 现在中山大学生命科学学院工作;

通讯联系人: 李攻科.

质谱为 EI 离子源, 接口温度 280 °C, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 质量扫描范围 30 ~ 550 *amu*. 为了减小衍生化试剂引起的基线漂移, 延迟 6 min 记录数据.

2.3 试剂

反式白藜芦醇标准 (SIGMA 公司, 100 mg) 用乙醇配成 0.3 mg/mL 的贮备液. 衍生化试剂: (双三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 (BSTFA, 含 ρ 1% 的三甲基氯硅烷) 购自 SIGMA 公司; 其他有机溶剂均为分析纯; 葡萄酒样品为市场购置.

2.4 样品预处理

取 3 mL 葡萄酒样品加入 4.6 mL 萃取瓶中, 用顶端带有孔和聚四氟乙烯隔垫的盖子封住, 置于工作台上, 电磁搅拌, 将 SPME 萃取纤维直接插入萃取瓶中, 室温萃取 30 min. 涂层萃取分析物后, 将 SPME 萃取纤维直接插入含有 0.1 mL BSTFA 的 4.6 mL 萃取瓶的顶空, 衍生化 20 min. 气相色谱进样口进样, 热解析, 同时气相色谱程序升温开始, 280 °C 解析 7 min.

3 结果与讨论

3.1 SPME 衍生化方法的研究

葡萄酒是含水基体, 多酚类化合物具有较高的极性, 本文选用对极性分析物萃取效果好的极性 85 μ m 聚丙烯酸酯 (PA) 涂层, 对葡萄酒样品萃取 60 min 后, 未经衍生化直接进样热解吸, GC-MS 分析得到的总离子流图见图 1. 从图 1 中可以看出, 色谱峰较少, 在 8.05 min 为雪松醇, 11.64 min 为邻苯二甲酸丁酯, 16.65 min 为环丙烷壬酸甲酯等. 15 min 后的色谱峰是硅氧烷, 可能是色谱柱固定相流失, 没有得到多酚类化合物的谱峰.

因此要对葡萄酒中极性有机物进行色谱分析, 必须通过衍生化来降低分析物的极性. 酚羟基的衍生化通常采用甲基硅烷化方法. 但甲基硅烷衍生化过程要求严格的无水条件, 因此, 在 SPME 预处理过程中, 硅烷化衍生化反应不能在水相中进行. 为避免水影响衍生化, 本文采用气相反应, SPME 涂层中衍生化方法. PA 涂层水相中萃取分析物后, 将 SPME 涂层插入密闭的 BSTFA 顶空萃取气相中的 BSTFA, 涂层中的极性分析物与 BSTFA 反应生成三甲基硅醚衍生物. 气相反应一方面避免 SPME 直接插入 BSTFA 造成涂层溶解; 另一方面由于 BSTFA 挥发性大, 密闭

的气相顶空中, BSTFA 的浓度大且过量, 反应容易进行. 为了减少 BSTFA 对涂层的影响, 反应在室温进行.

采用上述方法, 对反式白藜芦醇标准进行 GC/MS 分析, 成功的得到其三甲基硅醚衍生物. 优化了萃取条件, 优化的萃取时间 30 min, 衍生化时间 20 min, 解吸 7 min.

3.2 SPME 与固相萃取 (SPE) 比较

为了进一步说明所建立的 SPME 硅烷化方法的优点, SPME 方法同文献[5]固相萃取 (SPE) 衍生化方法分析葡萄酒样品的方法作对比. SPE 方法操作复杂, 样品处理步骤多. SPE 方法采用了 C18 柱, 葡萄酒样品过柱后, 用乙酸乙酯洗脱, 将洗脱液用 N_2 吹干, 加入 BSTFA 衍生化, 吡啶定容, GC-MS 分析. 图 2 为 SPME 和 SPE 方法衍生化得到的葡萄酒的总离子色谱图.

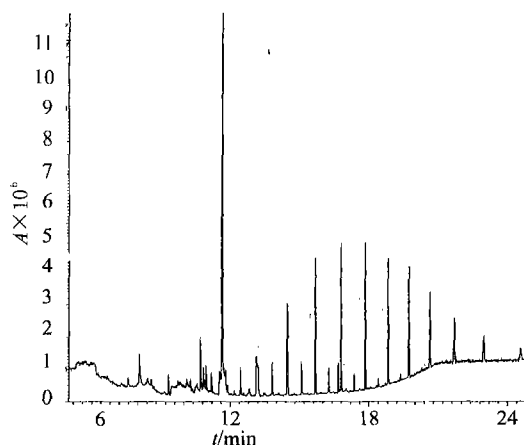


图1 SPME (85 μ mPA) 未衍生化的葡萄酒的总离子流色谱图

Fig.1 Total ion mass chromatogram of wine without derivatization using SPME

比较 SPE 和 SPME, 衍生化后得到的总离子流图. SPE 干扰多, 噪音大, 保留时间 15.76 min 的峰为顺式白藜芦醇, 保留时间为 18.20 min 的峰为反式白藜芦醇, 峰面积小, 杂峰干扰明显.

SPME 中色谱峰得到较好的分离, 背景的噪音和杂峰的干扰小, 15.56 min 和 18.03 min 分别为顺式 (*cis*-) 和反式 (*trans*-) 白藜芦醇, 其峰面积较 SPE 的大 3 个数量级. 这是由于 SPME 操作步骤少, 衍生化过程简单, 因此减少了样品预处理过程中的误差, 提高了分析的灵敏度.

将空白的葡萄酒样品中加入反式白藜芦醇标准, 分别用 SPME 和 SPE 方法进行萃取衍生化, GC/MS 测定结果见表 1. 两种方法的分析结果基

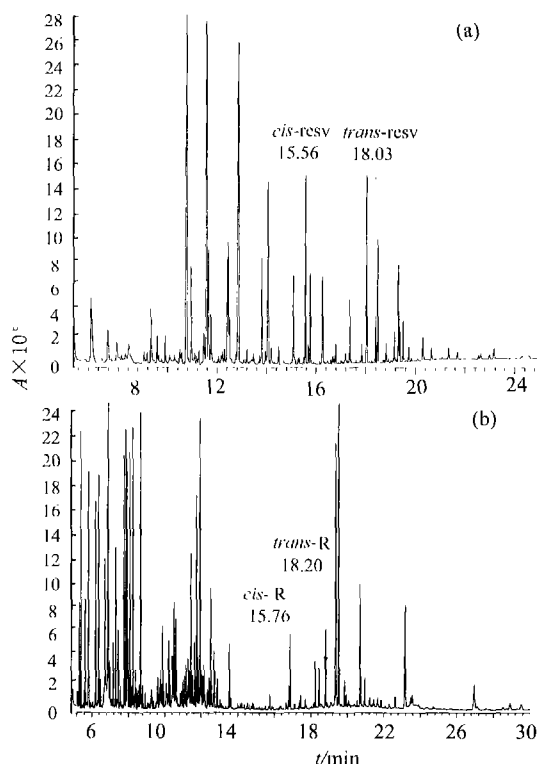


图 2 SPME (85 μmPA) (a) 和
SPE 萃取后 (b) 经衍生化后
的葡萄酒的总离子流色谱图

Fig.2 Total ion mass chromatogram of
wine with SPME (a) and SPE (b)

本一致, SPME 回收率大于 80%。

表 1 用 SPME 和 SPE 方法测定
反式白藜芦醇的比较

Tab.1 Analytical results of *trans*-resveratrol
in wine by SPMA and SPE

葡萄酒 样品	c(反式白 藜芦醇) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	SPME		SPE	
		测定值 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率 %	测定值 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率 %
1	0.4	0.36	90.0	0.44	110.0
2	0.5	0.42	84.0	0.44	88.0
3	0.6	0.54	90.0	0.52	86.7
4	0.8	0.714	89.3	0.728	91.0
5	1.0	0.861	86.1	0.936	93.6

3.3 葡萄酒样品中极性组分的分析

用 SPME 硅烷化方法, 用 GC-MS 对葡萄酒中的极性化合物进行定性分析。表 2 列出图 2 (a) 中检测到的葡萄酒样品中除白藜芦醇外的部分酚类化合物和其它极性有机物。葡萄酒中与白藜芦醇同属酚类的化合物还有很多, 如: 对羟基苯甲酸、对羟基苯丙烯酸等, 此外还有有机脂肪酸。其

三甲基硅醚的衍生物质谱与 NIST 标准质谱比较, 非挥发的极性有机物在纤维涂层中衍生化为挥发性好的三甲基硅醚衍生物。由此可见所建立的方法, 对研究葡萄酒中的有机物成分分析、及其在生物、生理上的作用有很大的应用前景。

表 2 SPME 衍生化分析葡萄酒部分极性有机物

Tab.2 Determination of polar organic compounds in
wine with SPME silylmethylated derivatization

No.	保留时间 min	多酚类化合物	峰面积 %	匹配度 %
1	7.35	1,2,3 三羟基苯酚	0.19	99
2	7.57	对羟基苯乙醇	1.71	94
3	8.29	苯甲酮	0.18	91
4	8.43	1,3,5 三羟基苯酚	0.65	94
5	9.05	对羟基苯基丙酸乙酯	0.41	90
6	9.64	对羟基苯基丙酸	0.16	95
7	9.89	对羟基苯乙酰基 氨基乙酸甲酯	0.63	53
8	10.49	十四碳脂肪酸	0.51	99
9	10.77	3-羟基苯基丙烯酸乙酯	15.06	52
10	11.26	对氨基苯乙醇	0.41	52
11	11.46	对羟基苯基丙烯酸	1.28	99
12	11.65	邻苯二甲酸丁酯	3.61	99
13	11.75	3,4,5-三羟基苯甲酸	1.68	99
14	12.41	十六碳脂肪酸	2.4	98
15	13.95	十八碳烯酸	0.42	99
16	14.18	十八碳酸	0.62	99
17	15.75	对羟基苯基 2-基 2 羟基乙酸甲酯	1.92	85

3.4 对反式白藜芦醇的定量分析

用 SPME 方法对实际葡萄酒样品中反式白藜芦醇进行了测定, 选取 7 种葡萄酒样品, 这些葡萄酒样品中反式白藜芦醇的浓度较低, 用 SPE 方法无法测定。SPME 方法测定结果见表 3。

表 3 葡萄酒中反式白藜芦醇的测定¹⁾

Tab.3 Determination of *trans*-resveratrol in wine

编号	测定量	加入量	总量	回收率 %	RSD %
1	0.23	0.25	0.44	84	6.4
2	1.32	1.0	2.34	102	5.3
3	1.72	1.50	3.28	104	5.9
4	5.42	5.0	10.7	106	3.8
5	26.2	20	43.6	89	8.6
6	23.6	20	39.2	82	9.5
7	33.5	30	61.3	93	7.3

1) 测定量、加入量和总量的单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

回收率在 84% ~ 106% 之间, 相对标准偏差 (RSD, $n = 5$) 平均为 6.7%, 检出限为 $5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$.

参考文献:

- [1] GOLDBERG D M, SUSAN E H, PARKES J G. Beyond alcohol: Beverage consumption and cardiovascular mortality [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1995, 237: 155.
- [2] JANG M S, CAI E N, UDEANI G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, 275(5297): 218 ~ 220.
- [3] CECIL R, SUSAN E H, ELEFATHERIOS P, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1995, 235: 207.
- [4] LAMUELA-RAVENTOS R M, WATERHOUSE A L. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method [J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41: 521.
- [5] DAVID M G, JOE Y, WATERHOUSE A L. A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wine [J]. *Am J Enol Vitic*, 1995, 46(2): 159.
- [6] ARCE L, TENA M T, RIOS A, et al. Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 359(1-2): 27.
- [7] ZHANG Z, YANG M J, PAWLISZYN J B. Solid-phase microextraction: a solvent-free alternative for sample preparation [J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 844A ~ 853A.
- [8] PAN L, PAWLISZYN J B. Derivatization/solid-phase microextraction: new approach to polar analytes [J]. *Anal Chem*, 1997, 69: 196 ~ 205.

Gas-Phase Postderivatization Following Solid-Phase Microextraction for Rapid Analysis of Polyphenols in Wine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LUAN Tian-gang, LI Gong-ke, ZHANG Zhan-xia

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A new method for the trace analysis of polyphenols in wine was studied by developing a silylmethylated postderivatization on the fiber following solid-phase microextraction (SPME) with Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) gaseous phase procedure combined with GC/MS. Nineteen polyphenols and other polar organic compounds in wine were found by used PA fiber. Analysis results indicate that the method is rapid and sensitive without going through laborious sample preparation.

Keywords: solid-phase microextraction (SPME); gas chromatography-mass spectrometry; polyphenols; silylmethylation

(上接第 53 页)

Study of Water-soluble Polysaccharose

I. Graft Copolymerization of Starch with Acrylamide and Dimethyldiallyl Ammonium Chloride

HU Zi-heng, ZHANG Li-ming

(Institute of Polymer Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The graft copolymerization of starch with acrylamide and dimethyldiallyl ammonium chloride was studied in aqueous solution using potassium permanganate/acid redox system as the initiator. The effects of various factors, such as the concentrations of potassium permanganate, catalyst acid, starch and monomer, as well as the kind of catalyst acid, temperature and time, on the grafting parameters were investigated. In addition, the graft copolymers were characterized by infrared analyses.

Keywords: starch; graft copolymerization; cationic polymers