

文章编号: 0529-6579 (2000) 01-0063-05

SPE-GC-MS 法测定葡萄酒中顺反式白藜芦醇^{*}

李攻科¹, 李晓东¹, 马 亭¹, 鲍伦军², 张展霞¹

(1. 中山大学 化学与化学工程学院, 广州 510275; 2. 广州进出口 食品 检验研究中心)

摘 要: 研究了固相萃取 (SPE) GC-MS 法同时测定葡萄酒中顺反式白藜芦醇的分析方法. 用 SPE C₁₈ 小柱进行葡萄酒样品的前处理, 以 2-三甲基甲硅烷基三氟乙酰胺 (BSTFA) 试剂衍生化分离出的白藜芦醇, 用 GC-MS 法对顺、反式白藜芦醇进行定性和定量分析. 对顺、反式白藜芦醇方法的检出限分别为 $3.72 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均回收率分别为 93.9% 和 98.8%, RSD 分别为 7.4% 和 8.1%. 分析了 31 个国产葡萄酒, 11 个进口葡萄酒. 该法简便、快速、损失小, 样品用量少, 适合大批量样品的测定.

关键词: 固相萃取 (SPE); 气相色谱-质谱联用 (GC-MS); 葡萄酒; 白藜芦醇

中图分类号: O65 **文献标识码:** A

Cecil 等^[1]报导葡萄酒的饮用量与心血管疾病死亡率之间有一个极强的负相性, 葡萄酒对降低心血管疾病的死亡率有明显的效果. 研究者们^[2,3]发现葡萄酒中含的多酚类化合物—白藜芦醇 (resveratrol) (结构见图 1) 具有明显抗菌、抗炎、抗癌、抗血栓、抗高血脂症等作用. 建立葡萄酒中白藜芦醇的快速分析测定方法, 对研究葡萄酒的药用价值、酿造工艺、及葡萄酒的鉴别具有重大意义.

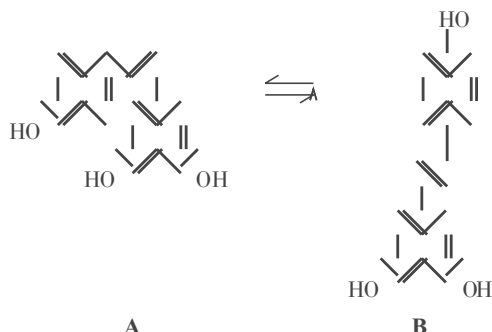


图 1 顺 (A)、反式 (B) 白藜芦醇的结构

Fig 1 The structural formula of *cis*-resveratrol (A) and *trans*-*cis*-resveratrol (B)

测定葡萄酒中白藜芦醇常用的方法有高效液相色谱 (HPLC) 法^[3] 和气相色谱-质谱联 (GC-MS) 法^[4]. HPLC 法步骤繁琐、耗时长, 因白藜芦醇的异构化会导致测定失真, 样品

^{*} 收稿日期: 1999-07-02 作者简介: 李攻科 (1963~), 女, 副教授.

需要量大,待测组分损失较为严重;但是此法不需衍生化。GC-MS 法耗时少,样品用量少,待测组分损失少;但不衍生化而直接进样,色谱峰拖尾严重,且处理后的样品容易带水。

本文采用 SPE C_{18} 小柱固相萃取进行葡萄酒样品的前处理,以 BSTFA 衍生化试剂衍生化分离出的白藜芦醇,用 GC-MS 分别对顺、反式白藜芦醇进行定性与定量分析。分析了 31 个国产葡萄酒和 11 个进口葡萄酒。该法简便、快速、损失小,样品用量少,适合大批量样品的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP-6890 气相色谱仪带质谱检测器 (MSD-5973) 配 G1701B.02.05 工作站 (Hewlett-Packed, USA), 所用色谱柱为 HP5-MS 熔融毛细管柱 ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$, $\varphi=5\%$ 聚苯甲基硅氧烷 + $\varphi=95\%$ 聚二甲基硅氧烷); SPE C_{18} 小柱 (500 mg, 10 mL, 大连化物所)。

乙酸乙酯、乙醇、正庚烷均为分析纯试剂 (广州化学试剂厂);白藜芦醇标准 (Sigma 公司, 100 mg); 衍生化试剂 BSTFA (Sigma 公司, 5 g); 葡萄酒样品 (市场购买)。

1.2 GC-MS 操作条件

色谱条件: 进样口温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, 柱温采用程序升温, 初温 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min 后, 以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度升至 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, 恒温 10 min, 载气为纯氦气, 流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

质谱条件: 接口温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, EI 离子源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, 四极杆温度 $106\text{ }^{\circ}\text{C}$, 电子倍增器电压 1 400 V, 质量扫描范围 30~550。

1.3 实验步骤

1.3.1 SPE C_{18} 小柱的初始化及再生

SPE C_{18} 小柱初始化: 加 3 mL 乙酸乙酯于柱中冲洗 1 次, 然后再加 3 mL φ 为 96% 乙醇冲洗 1 次, 最后加 3 mL φ 为 10% 乙醇冲洗 2 次。

SPE C_{18} 小柱的再生: 将用过的小柱用 φ 为 60% 乙醇冲洗 5 次, 每次 3 mL, 再将小柱浸泡于装有 φ 为 96% 乙醇的烧杯中。

1.3.2 样品的制备

样品预处理: 用移液管量取 2 mL 葡萄酒样品于 C_{18} 柱中, 用锥形瓶收集流出液, 大约 1 h, 用 3 mL 正庚烷过柱抽干 (2 次), 将柱中微量水分挤掉。准确量取 3 mL 乙酸乙酯于抽干的柱中, 用 5 mL 小瓶收集流出液, 1 h 后将收集的流出液通 N_2 吹干。

样品的衍生化: 于吹干液体的小瓶中加入 50 μL BSTFA 衍生化试剂, 将小瓶密封后, 在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 30 min 后, 冷却。

1.3.3 样品的分析 吸取 1 μL 衍生化后的溶液进样, 用 GC-MS 法分别对顺、反式白藜芦醇进行定性与定量分析, 采用分流进样, 分流比为 30:1。

2 结果与讨论

2.1 衍生化时间的优化

研究表明用 BSTFA 试剂对白藜芦醇进行衍生化, 反式白藜芦醇的衍生化时间一般在

30 min 左右较合适; 而顺式白藜芦醇衍生化的时间在 20~40 min 较好. 在定性与定量分析时, 白藜芦醇的 2 种异构体是同时进行衍生化的, 因此衍生化时间选为 30 min.

2.2 定性分析

白藜芦醇的 M_r 为 228, 经过 BSTFA 衍生化后其衍生物的 M_r 为 444, 所以此衍生物的质谱图中分子离子峰特征峰为 444. 图 2 是顺式白藜芦醇标准、反式白藜芦醇标准、葡萄酒中白藜芦醇的衍生物的总离子色谱图, 其中保留时间为 15.48 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.

2.3 定量分析

2.3.1 线性范围、检出限和精密度 经实验测得的顺式和反式白藜芦醇工作曲线的线性范围均为 $0 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检出限分别为 $3.72 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

取某一国产红葡萄酒样平行测定 5 次, 测得顺式白藜芦醇的平均浓度为 $0.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 4.5%; 反式白藜芦醇的平均浓度为 $0.86 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 5.2%.

2.3.2 回收实验 取 6 个葡萄酒样分别进行回收实验, 结果见表 1. 在葡萄酒中, 顺式和反式白藜芦醇同时存在, 本实验同时对 2 种异构体进行回收测定, 从表 1 中可见顺式白藜芦醇的回收率为 86%~103%, 其平均回收率为 93.9%; 反式白藜芦醇的回收率为 91%~110%, 其平均回收率为 98.8%.

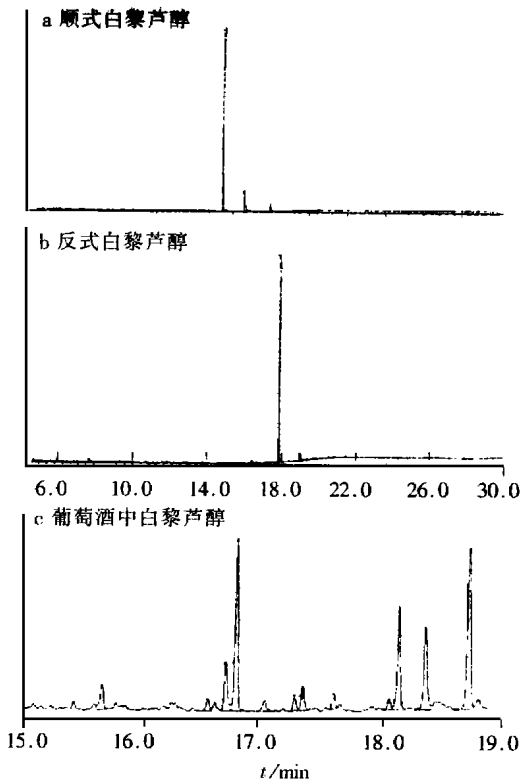


图 2 白藜芦醇衍生物的色谱图
Fig.2 Chromatogram of resveratrol after derivatization

表 1 葡萄酒样中白 藜芦醇的回收率

Tah.2 Recoveries of *cis*-resveratrol and *trans*-resveratrol in wine

样品编号	顺式白藜芦醇			反式白藜芦醇		
	加入量	测定值	回收率/ %	加入量	测定值	回收率/ %
	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
国产干红葡萄酒 1	2.50	4.55	86.9	3.00	6.12	98.4
国产干红葡萄酒 2	0.75	1.51	95.1	1.00	1.90	97.4
国产干红葡萄酒 3	0.70	1.35	86.3	1.00	2.03	110
进口红葡萄酒 4	0.50	1.03	101	0.45	0.85	91.3
进口白葡萄酒 5	0.15	0.31	92.7	0.50	0.98	108
进口白葡萄酒 6	1.00	1.03	103	0.70	1.30	91.0

2.3.3 实际葡萄酒样的分析 分析了 31 个国产葡萄酒样和 11 个进口葡萄酒样，分析结果见表 2。结果表明干红和干白葡萄酒中一般都含有白藜芦醇，并且同时存在它的 2 种异构体，尤其反式白藜芦醇的含量大多高于顺式的含量；而红、白葡萄酒及香槟的含量很低，有些检测不出；白兰地检测不出。

红葡萄酒白藜芦醇的含量比白葡萄酒的高，这主要是因为酿造过程中，红葡萄酒是葡萄汁连同皮和籽一起发酵，而葡萄皮和籽中白藜芦醇的含量是较高的^[3]；白葡萄酒则去除了皮和籽才发酵，所以白葡萄酒中白藜芦醇的含量较低；白兰地是通过蒸馏而得到的酒，由于白藜芦醇的沸点很高，蒸馏不出来，所以白兰地不含有白藜芦醇。从葡萄酒中测得的白藜芦醇看，大多数是反式的含量高于顺式；有一些则两者较接近；少部分则顺式高于反式。造成这样结果的原因是与酒放置的时间及与葡萄酒的酿造过程有关，如发酵的时间过短而造成发酵不够完全，这时顺式的含量就会升高，反式就会降低。另外，酿制葡萄酒所用的葡萄种类的不同，也会造成顺反式白藜芦醇含量比的变化；即使是同一品种，由于其所生长的环境的不同，如土壤、气候、光照等，生产出的葡萄酒也有很大的差别，这还需进行深入的研究。

表 2 葡萄酒中白藜芦醇的测定¹⁾

Tah 2 Detemination of resveratrol in wine

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

样品编号	顺式	反式	样品编号	顺式	反式	样品编号	顺式	反式
国产干红葡萄酒 1	2.38	3.17	国产红葡萄酒 15	0.34	0.35	国产干白葡萄酒 29	—	—
国产干红葡萄酒 2	0.76	0.80	国产红葡萄酒 16	—	—	进口干白葡萄酒 30	0.17	0.44
国产干红葡萄酒 3	0.80	0.93	国产红葡萄酒 17	—	—	国产全汁白葡萄酒 31	—	—
国产干红葡萄酒 4	0.75	0.93	国产红葡萄酒 18	—	—	国产白葡萄酒 32	—	—
国产干红葡萄酒 5	0.80	0.70	国产红葡萄酒 19	—	—	国产白葡萄酒 33	—	0.66
国产干红葡萄酒 6	1.22	2.52	国产红葡萄酒 20	—	—	进口白葡萄酒 34	—	0.23
国产干红葡萄酒 7	0.28	0.58	进口红葡萄酒 21	0.53	0.44	国产白兰地 35	—	—
国产干红葡萄酒 8	—	—	进口红葡萄酒 22	3.00	1.17	国产白兰地 36	—	—
国产干红葡萄酒 9	0.25	0.32	进口红葡萄酒 23	1.85	1.37	国产大香槟 37	—	—
国产干红葡萄酒 10	0.69	0.96	进口红葡萄酒 24	—	0.35	国产红香槟 38	—	—
国产干红葡萄酒 11	1.98	1.65	进口红葡萄酒 25	—	0.22	国产冰酒 39	—	—
进口干红葡萄酒 12	0.65	0.31	国产全汁红葡萄酒 26	—	—	进口酒 40	—	—
国产红葡萄酒 13	—	—	国产玫瑰红葡萄酒 27	0.13	0.26	进口烈性酒 41	0.68	0.77
国产红葡萄酒 14	—	—	国产干白葡萄酒 28	0.35	0.50	进口烈性酒 42	0.61	0.68

1) “—” 表示检测不出

参考文献:

[1] CECIL R, SUSAN H, ELEFTHERIOS 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: 207~219.

[2] 冯永红, 许实波. 白藜芦醇药理研究进展[J]. 国外医药(植物药分册), 1996, 11(4): 155~157.

[3] 赵霞, 陆阳, 陈泽乃. 白藜芦醇的化学药理研究进展[J]. 中草药, 1998, 29(12): 837~839.

[4] ANTONELLI A, FABBRI G, LERCKER G. Techniques for resveratrol silylation[J]. Chromatographia, 1996, 42(7/8): 469~472.

- [5] PEZET R, PONT V, CUENAT P. Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using HPLC and highly sensitivity fluorimetric detection[J]. J Chromatogr, 1994, 663: 191~197.
- [6] GOLDBERG D M, YAN J. Direct injection gas chromatographic mass spectrometric assay for *trans*-resveratrol[J]. Anal Chem, 1994, 66: 3959~3963.

Determination of *cis*-Resveratrol and *trans*-Resveratrol in Wine by GC-MS Using Solid-Phase-Extraction Sample Pretreatment

LI Gong-ke^{*}, LI Xiao-dong, MA Ting, BAO Lun-jun, ZHANG Zhan-xia

Abstract: A novel method for the determination of resveratrol in wine was developed. Solid-phase-extraction (SPE) was carried out on a SPE C₁₈ column. N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) was used for sample derivatization. Sample aliquots were analyzed qualitatively and quantitatively with GC-MS. The detection limits, recovery ranges, and precision were 3.72 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 86% to 103%, and 4.5% for *cis*-resveratrol respectively, 6.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 91% to 110% and 5.2% for *trans*-resveratrol respectively. Thirty-one homemade wines and 11 import wines were analysed. This method was inexpensive, quick, specific, selective and needs minimal amounts of sample.

Keywords: solid-phase-extraction (SPE); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); wine; resveratrol

·简讯·

中山大学学报 (自然科学版) 上网状况

现可在下列网站中查阅中山大学学报 (自然科学版)。

1. 中国期刊网 (<http://www.chinajournal.net.cn>), 于 1999 年 6 月 18 日正式开通, 具有 1994~1999 年共 6 年时间跨度 3500 种核心和专业特色期刊 (社科类期刊 1300 种, 科技类期刊 2200 种) 近 300 万篇全文文献, 400 万条题录摘要信息, 1000 万条引文文献题录信息的巨大信息资源。将文献分为理工 A、B、C、农业、医学、政法、教育、文史哲和电子技术与信息科学等 9 个专辑。在网上可提供期刊索引、作者索引、单位索引、关键词索引、任意词全文索引等服务。

2. 万方数据网 (<http://www.wanfangdata.com.cn/periodical>), 包含 500 多种科技期刊, 提供免费或部分收费的浏览、下载等服务。

3. 中山大学校园网 (<http://www.zsu.edu.cn>). 现已将中国期刊网和万方数据网的中山大学学报 (自然科学版) 链接在学报主页上, 供读者查阅。

茅 子

^{*} School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China