

## 红葡萄酒中白藜芦醇及其糖苷异构体的反相 HPLC 分析

戴蕴青<sup>1\*</sup> 韩雅珊<sup>1</sup> 惠柏棣<sup>1</sup> 赵文恩<sup>2</sup> 陈雷<sup>1</sup> 钟粟<sup>1</sup>

(1 中国农业大学食品学院, 北京 100094)

(2 郑州大学化学系, 郑州 450052)

**摘要** 用反相 HPLC 同时测定红葡萄酒中白藜芦醇及糖苷 4 种异构体。以 OASIS<sup>TM</sup> 固相萃取柱进行前处理, 以 Hypersil C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 乙腈-水(含 0.1% 三乙胺) 梯度洗脱, 同时用二极管阵列检测器在 288 nm 和 308 nm 检测。结果表明: 白藜芦醇及其糖苷 4 种异构体在 20 min 内可得到较好的分离, 其回收率均在 (95.7±1.4)% 以上, 最小检测限为 0.001 mg·L<sup>-1</sup>。

**关键词** 白藜芦醇; 白藜芦醇糖苷; 红葡萄酒; HPLC

**中图分类号** R151.3

## Analysis of the Geometrical Isomers of Resveratrol and Resveratrol Glucoside from Red Wines Produced in China by HPLC

Dai Yunqing<sup>1</sup> Han Yashan<sup>1</sup> Hui Bodi<sup>1</sup> Zhao Wenen<sup>2</sup> Chen Lei<sup>1</sup> Zhong Su<sup>1</sup>

(1 College of Food Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(2 Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract** Four geometrical isomers of resveratrol (3, 4', 5-trihydroxystilbene) and its glucoside from red wines were readily separated and assessed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) equipped with photodiode array detector (PDA). A Hypersil C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was employed as stationary phase while mobile phase consisted of acetonitrile, water and TCA. A linear gradient was required to archive the separation. The E- and Z-isomers were monitored at 308 nm and 288 nm, respectively. With OASIS<sup>TM</sup> cartridge, the recoveries of assessed isomers were greater than (95.7±1.4)% and detection limit reached 0.001 mg·L<sup>-1</sup>.

**Key words** resveratrol; resveratrol glucoside; red wine; HPLC

白藜芦醇为一种天然物质, 存在于多种高等植物中, 如葡萄、花生、桑葚以及一些中草药等, 而且它们的生物合成会受到逆境的诱导。白藜芦醇可用于防治心血管疾病, 能降低血脂, 减少血小板凝集。白藜芦醇的生物活性使它有望成为人类预防癌症的一种天然物质。此外, 还可用于治疗皮炎、癣等过敏性疾病。因此近年来白藜芦醇对人体功能的影响日益受到重视<sup>[1~3]</sup>。

白藜芦醇在自然条件下, 也以糖苷的形式存在, 它们由 2 个部分构成, 即白藜芦醇和糖基。无论是醇还是糖苷对人体都具有活性, 后者在人体内可以分解为白藜芦醇。此外, 白藜芦醇及糖苷分子中, 其连接环状分子中的双键能够在紫外线或其他物理及化学因素的诱导下发生几何异构。所以, 制葡萄酒所用的葡萄中含有一定量的白藜芦醇及其糖苷的 4 种异构体, 即反式白藜芦醇、顺式白藜芦醇、反式白藜芦醇-3-O-β 糖苷和顺式白藜芦醇-3-O-β 糖苷, 其结构如图

收稿日期: 2001-07-25

\* 戴蕴青, 高级实验师, 研究方向为食品化学与食品分析。

1 所示。无论色谱如 HPLC<sup>[4~6]</sup>、光谱如 UV-VIS, 还是质谱或 NMR 都可对白藜芦醇及其糖苷进行分析。但据报道, 以上分析主要是对顺、反式白藜芦醇或反式白藜芦醇及糖苷进行测定, 国内还未见 4 种异构体同时测定的报道。本实验采用反相高效液相色谱和二极阵列检测器对国产红葡萄酒中的反式白藜芦醇、顺式白藜芦醇、反式白藜芦醇糖苷和顺式白藜芦醇糖苷进行了分离及定量分析。

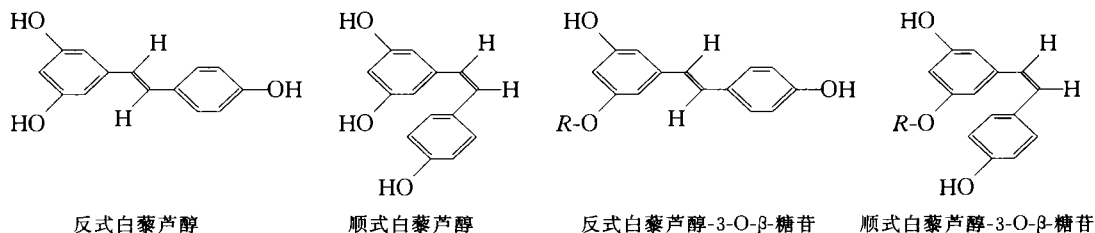


图 1 白藜芦醇及白藜芦醇糖苷异构体的结构( $R$  为糖基)

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

高效液相色谱仪(Waters 公司 600E 型);二极阵列检测器(Waters 公司 996 型)乙腈、甲醇(Fisher 公司 色谱纯)三乙胺(分析纯)OASIS<sup>TM</sup>固相萃取柱(Waters 公司)

### 1.2 标准样品的配制

反式白藜芦醇标准品从 Sigma 公司购得, 纯度为 99%, 反式白藜芦醇糖苷由中国中医药大学提供, 色谱测定纯度 > 97%。因反式白藜芦醇及其糖苷见光会发生顺式异构化, 故标准液配制及样品处理过程均应避光进行。

配制方法: 精确称取一定量的反式白藜芦醇标样, 甲醇溶解, 配成  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准液。精确称取一定量的反式白藜芦醇糖苷标样, 超纯水配成  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准液。标准液存于  $-4^\circ\text{C}$  冰箱避光保存。顺式白藜芦醇和顺式白藜芦醇糖苷标准用配好的 2 种反式标准液在紫外光下( $254 \text{ nm}$ ,  $990 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ )照射 10 min 而制得。其顺式结构的转化率分别为 83% 和 85%。

### 1.3 样品制备

被测红葡萄酒均从国内超市购得。取每种葡萄酒各 10 mL, 通过一个经甲醇活化的 OASIS<sup>TM</sup> 固相萃取柱, 然后浓缩到 1 mL 甲醇溶液中, 作为 HPLC 分析样品。

### 1.4 色谱条件

色谱柱为 Hypersil C18( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), 流动相中, A 液为 7.5% 乙腈和 0.1% 的三乙胺水溶液, B 液为 100% 乙腈, 梯度洗脱, 20 min 内由 100% A 液变为 100% B 液。流速为  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 二极阵列检测器(PDA)波长为 308 nm(反式醇及糖苷最大吸收波长)和 288 nm(顺式醇及糖苷最大吸收波长)双波长检测。进样量  $20 \mu\text{L}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 同分异构体的分离及色谱峰的鉴定

用本实验所设置的色谱条件, 可以很好地将红葡萄酒中的白藜芦醇及糖苷 4 种异构体分

离,如图2所示的HPLC对4种异构体标准及长城牌红葡萄酒中各种异构体的分离。根据比较4种标准异构体的保留时间和标准样在PDA检测器上获得的紫外吸收特征,即紫外最大吸收波长而确定样品中的4种异构体。

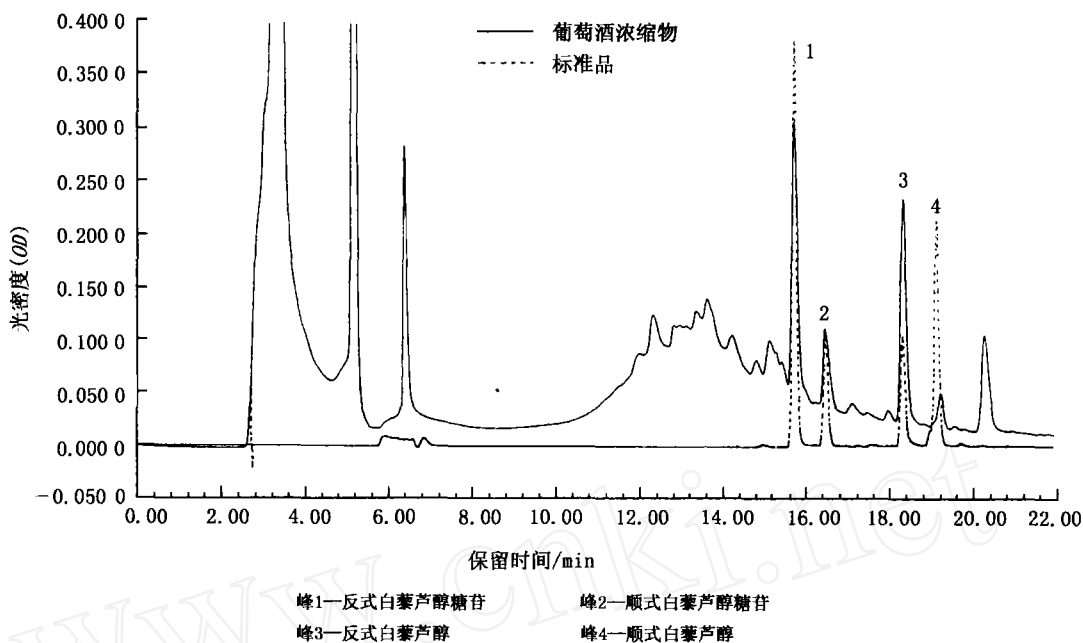


图2 标准异构体及长城红葡萄酒中白藜芦醇色谱图

## 2.2 固相萃取柱的应用

据文献报道,在红葡萄酒中白藜芦醇及其糖苷含量很少,每升仅有微克级,若直接进样分析,会因大量杂质的干扰和过低的浓度使检测遇到很大的困难,HPLC检测白藜芦醇的精度只能达到 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,除反式白藜芦醇及糖苷有很小的峰面积外,其他异构体几乎检测不到。用传统方法浓缩,不仅费时和易损失被测成分,同时也会使杂质的含量增加。本实验采用OASIS™固相萃取柱进行样品处理及浓缩。这是一种含水湿性、中等极性聚合物树脂,具有高吸附容量的固相萃取柱。当样品加入小柱后,白藜芦醇及糖苷被吸附在树脂上,用水洗去其他杂质后,再用少量甲醇将待测组分洗脱出来,能够实现相当程度的样品富集。这一过程不仅大大简化了操作步骤,而且除去了大量杂质,使样品被测成分浓缩,结果4种异构体不仅得到了很好的分离,而且提高了检测的灵敏度,检测限达到 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 2.3 同分异构体的光学特征

利用PDA检测器可以得到4种标准异构体的紫外吸收光谱(图3)及异构体的最大吸收波长(表1)。

白藜芦醇及其糖苷反式异构体可经紫外光照射诱导后产生顺式异构体,这可以通过其具有代表性特征的

表1 白藜芦醇4种异构体的紫外最大吸收波长

异构体	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$
反式白藜芦醇 (E-resveratrol)	308
顺式白藜芦醇 (Z-resveratrol)	288
反式白藜芦醇糖苷 (E-resveratrol-3- $\beta$ -glucoside)	319
顺式白藜芦醇糖苷 (Z-resveratrol-3- $\beta$ -glucoside)	286

主要紫外吸收带的紫移而证明,分子的各种发色团和能级也因此而确定,而相关的白藜芦醇糖类的分子无论其发色基团和能级都没有显著改变。然而糖苷吸收光谱右肩峰的微弱增加使得它的最大吸收波长从 308 nm 移到 319 nm。

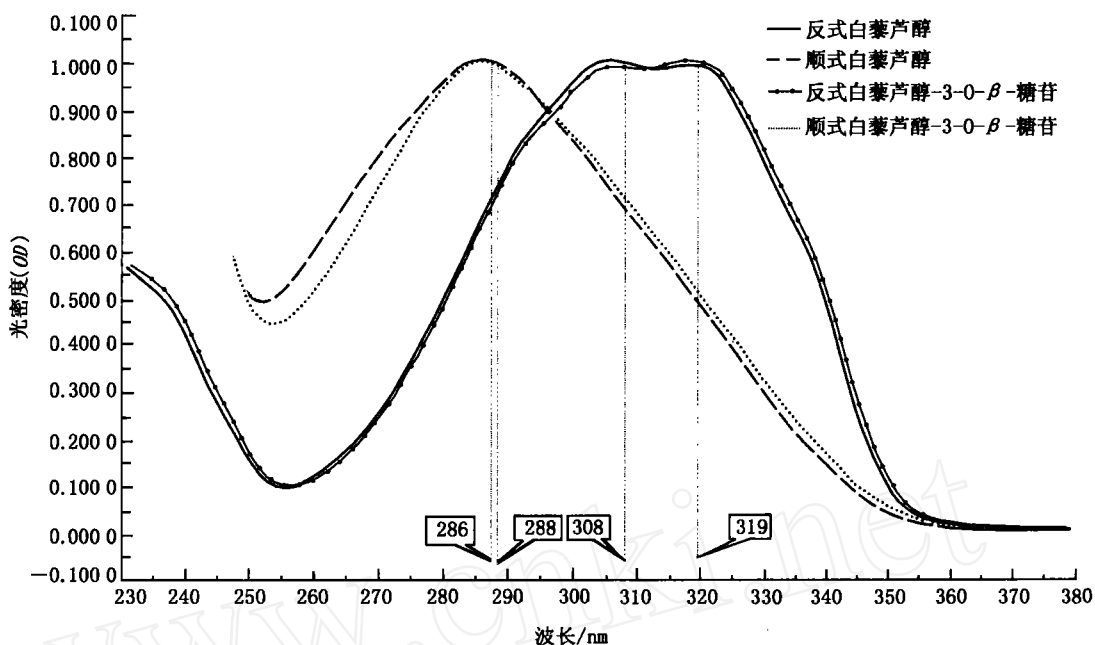


图 3 白藜芦醇及白藜芦醇糖苷 4 种异构体的紫外吸收光谱图

#### 2.4 相关性

将反式白藜芦醇及其糖苷配成各种不同浓度的标准液,分别用 HPLC 测定(条件如前所述)。结果反式异构体的标准浓度( $0.10 \sim 100.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )及其相应色谱峰面积符合线性要求,而顺式异构体浓度及峰面积之间的相关关系可根据比较紫外照射前及照射后反式异构体含量的降低程度而确定。经统计,顺、反白藜芦醇及顺、反白藜芦醇糖苷浓度与峰面积的相关系数  $r$  均  $> 0.99$ 。

#### 2.5 重复性及回收率

在同样色谱条件下,重复进样 5 次,4 种异构体的变异系数均  $< 6\%$ 。将反式白藜芦醇及糖苷标准液分别加到样品中,经 OASIS<sup>TM</sup> 柱处理,用 HPLC 测定,回收率分别为  $(97 \pm 1.2)\%$  和  $(95.7 \pm 1.4)\%$ ,可见本方法具有良好的重复性和回收率。

#### 2.6 样品测定

实验对 5 种不同品牌国产红葡萄酒中的 4 种异构体含量进行了测定(表 2),目前没有商品化的白藜芦醇顺式异构体及其糖苷,要进行定量测定是困难的。若想定量测定这 2 种异构体有 2 种可能的途径,一种是因为紫外照射后没有其他色谱峰产生,故按照反式异构体减少的量来确定顺式异构体的量,另一种是根据已发表的摩尔吸光系数通过 Lamber-Beer 定律来计算<sup>[7]</sup>。本实验均参照以上 2 种方法确定顺式异构体含量。

表2 几种国产红葡萄酒中4种异构体的含量

mg·L<sup>-1</sup>

品 牌	白藜芦醇			白藜芦醇糖苷			总计
	反式-	顺式-	合计	反式-	顺式-	合计	
长城红葡萄酒	1.65	2.07	3.72	1.19	1.49	2.68	6.39
龙徽干红葡萄酒	2.79	0.12	2.91	1.52	0.25	1.77	4.67
张裕红葡萄酒	0.51	—	0.51	—	—	—	0.51
中国红葡萄酒	0.20	—	0.20	—	—	—	0.20
攀西阳光红葡萄酒	2.83	0.79	3.62	—	—	—	3.62

注：—为未检出

通过表2可知,白藜芦醇在不同红葡萄酒中其存在形式不同,含量差别也很大,因此只测定1种或2种异构体含量不足以反映出红葡萄酒中白藜芦醇的实际含量,只有同时测定出4种异构体的总量,才能准确表达出酒中的真实含量,而勾兑的葡萄甜酒和非葡萄酿造的酒类白藜芦醇及白藜芦醇糖苷很少或没有。

另外,在对白藜芦醇及糖苷进行定量测定的整个过程中,要严格避免光照,因为光可使反式异构体发生异构化而形成顺式。虽然目前还没有证据表明顺式异构体比反式异构体更容易分解,但能级更高的顺式异构体可能对其分子的稳定性产生不良的影响。

### 3 结 论

用HPLC和PDA检测器可对红葡萄酒中白藜芦醇及其糖苷异构体进行分离测定,使用OASIS™固相萃取柱,可使白藜芦醇的测定精度达到0.001 mg·L<sup>-1</sup>,用以上方法我们正在对更大范围的葡萄酒中白藜芦醇及糖苷异构体含量进行测定。

### 参 考 文 献

- 1 陈雷,杨福全,张天佑,等. 虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇甙的高速逆流色谱分离提纯及其分析. 分析测试学报,2000,19(4):60~62
- 2 Langcake P, Pryce R J. The production of resveratrol by vitis vinifera and other members of the vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*,9(1):77~86
- 3 Meishiang J, Lining C, George O, et al. Cancel chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997,275(1):218~220
- 4 Goldberg D M, Karumanchiri E Ng A, Yan J, et al. Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*,1995,708:89~98
- 5 韩雅珊,陈雷,戴蕴青. 高效液相色谱法测定葡萄酒中的白藜芦醇. 色谱,1999,17(4):366,367
- 6 陈雷. 白藜芦醇、白藜芦醇苷和原花青素的存在、分离及提纯:[学位论文]. 北京:中国农业大学,2000
- 7 Trela B C, Waterhouse A L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J Agric Food Chem*, 1996,44:1253~1257