

Determination of the Content of Resveratrol in Hill Wines in Tonghua Region

Yan Xu, Ming Li*

School of Food Science and Engineering, Tonghua Normal University, Tonghua Jilin
Email: 1870797800@qq.com, lidaoen-7910@163.com

Received: Jun. 5th, 2020; accepted: Jun. 22nd, 2020; published: Jun. 29th, 2020

Abstract

An efficient and convenient HPLC method for determination of resveratrol content in hill wines was established. The resveratrol content in different brands of hill wine in Tonghua region was detected. The HPLC detection condition is: C18 column, gradient elution with acetonitrile aqueous solution (35:65, v/v) as mobile phase, flow rate of 1.0 mL/min, room temperature, detection wavelength of 306 nm. The results showed that the content of trans-resveratrol and cis-resveratrol in hill wines in Tonghua area is 0.54 - 11.45 mg/L and 0.60 - 5.42 mg/L respectively.

Keywords

HPLC, Resveratrol, Hill Wines

通化地区山葡萄酒中白藜芦醇含量的测定

许 琰, 李 明*

通化师范学院, 食品科学与工程学院, 吉林 通化
Email: 1870797800@qq.com, lidaoen-7910@163.com

收稿日期: 2020年6月5日; 录用日期: 2020年6月22日; 发布日期: 2020年6月29日

摘 要

确立了一种高效便捷测定山葡萄酒中白藜芦醇含量的HPLC检测方法, 并对通化地区不同品牌的市售山葡萄酒中白藜芦醇的含量进行了检测。HPLC检测条件为: C18色谱柱, 以乙腈水溶液(35:65, v/v)为流动

*通讯作者。

相进行梯度洗脱, 流速为1.0 mL/min, 柱温为室温, 检测波长为306 nm。结果表明, 通化地区市售山葡萄酒反式白藜芦醇含量在0.54~11.45 mg/L之间, 顺式白藜芦醇含量在0.60~5.42 mg/L之间。

关键词

高效液相色谱法, 白藜芦醇, 山葡萄酒

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

白藜芦醇广泛存在于葡萄皮中, 是植物体在应激霉菌感染和作用时产生的一种天然多酚类物质, 又称为芪三酚[1]。白藜芦醇具有降低血小板聚集[2], 预防和治疗动脉粥样硬化[3], 降低心脑血管疾病[4]发病率的作用, 还具有很强的抗氧化[5]和防癌[6]的生理活性。由于葡萄品种及加工工艺的不同, 造成了葡萄酒中白藜芦醇质量浓度的差异, 故白藜芦醇质量浓度的多少已成为评价葡萄酒品质的重要指标之一[7]。山葡萄抗寒力极强, 其果实酿酒品质优良, 是东北地区酿造甜红葡萄酒的主要原料, 研究发现山葡萄酒中白藜芦醇含量高于其他葡萄酒[8], 最大差异为10倍[9]。

本文建立的 HPLC 法操作简单, 并对通化地区不同品牌的市售山葡萄酒中的白藜芦醇含量进行了测定, 以期为通化地区山葡萄酒品质评价及产品推广提供实验依据。

2. 材料与方法

2.1. 仪器与试剂

2.1.1. 主要仪器设备

LC-2010A 型高效液相色谱仪, 日本岛津; KQ-100B 超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司。

2.1.2. 试剂

甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯, 其余试剂为分析纯。

反式、顺式白藜芦醇标准品溶液的制备: 反式白藜芦醇标准品(纯度大于99%), 购自 SIGMA-ALDRICH 公司。称取 25 mg 反式白藜芦醇标准品, 用甲醇溶解并定容 25 mL, 制成 1 g/L 储备液。取部分储备液, 将其置于 365 nm 紫外灯处照射 2 h, 使反式白藜芦醇部分转化成顺式白藜芦醇, 并通过差值法算出顺式白藜芦醇和反式白藜芦醇含量[10], 即用照射前反式白藜芦醇的含量减去照射后反式白藜芦醇的含量的差值为顺式白藜芦醇的含量。

2.2. 方法

国内外白藜芦醇的检测主要有 3 种方法, 分别是 GB/T15038-2005《葡萄酒、果酒通用分析方法》, 乙酸乙酯提取浓缩法和直接进样法。其中, 直接进样法较前两者操作更简便, 且可以减少白藜芦醇在分析、提取中的损失, 回收率高[10], 故本文以直接进样法测定样品中的白藜芦醇, 检测波长为 306 nm。

2.2.1. 样品前处理对检测结果的影响

取葡萄酒样品 0.5 mL, 用甲醇分别稀释 1 倍、5 倍、10 倍、20 倍, 超声 10 min (超声功率 100 W), 定容。用 0.25 μm 针头过滤器过滤, 得样品溶液, 考察不同稀释倍数对检测结果的影响。

2.2.2. 流动相组成对检测结果的影响

本研究用乙腈和水作为检测流动相, 调整乙腈: 水的比例分别为 30:70, 35:65, 40:60、42:58 考察流动相组成对检测结果的影响。

2.2.3. 梯度洗脱对检测结果的影响

参考冯愈钦等人[11]的方法设置梯度洗脱条件, 起始时 A:B = 65:35(体积比), 0~10 min, 保持 35% B; 10~20 min 内, 35%~100% B; 20~30 min, 保持 100% B; 30~35 min 内, 100%~35% B; 35~40 min, 保持 35% B。其中 A 为去离子水, B 为纯乙腈, 考察梯度洗脱对检测结果的影响。

2.2.4. 流动相 pH 对检测结果的影响

磷酸调节流动相中水相的 pH = 2.4, 考察 pH 调节前后对检测结果的影响。

2.2.5. 柱温对检测结果的影响

柱温分别设置为 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃, 考察柱温对检测结果的影响。

3. 结果与分析

3.1. 样品前处理对检测结果的影响

色谱条件参考前人的研究结果: 色谱柱 THERMOODS-2C18(4.6 × 250 mm, 5 μm); 紫外检测的最大吸收波长 306 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相为乙腈: 水 = 35:65; 柱温为室温[2] [12] [13]。如图 1 所示, 白藜芦醇保留时间为 9.990 min。

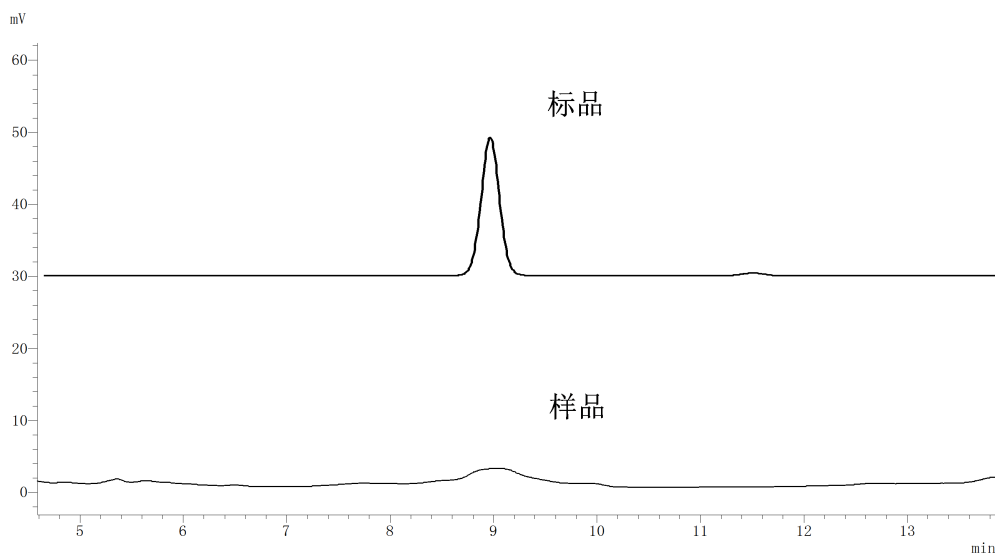


Figure 1. The chromatogram of trans-resveratrol and sample diluted 5-fold with methanol
图 1. 标准品及样品稀释 5 倍色谱图

结果显示, 稀释 1 倍的样品分离效果不好, 稀释 5 倍的样品峰分离效果较好(如图 1 所示), 稀释 10 倍、20 倍的样品均无峰。这是因为稀释 1 倍的样品浓度较高, 不易于干扰组分分离, 而稀释 10 倍、20 倍样品浓度过低导致检测无结果。因此, 样品前处理采用稀释 5 倍的条件进行。

3.2. 流动相组成对检测结果的影响

乙腈: 水的比例分别为 30:70、35:65、40:60、42:58 时, 白藜芦醇出峰时间分别为 15.356、9.900、8.457、

6.545 min。随着流动相中水相的比例不断提高, 样品中白藜芦醇的出峰时间增加, 这主要是因为随着流动相中水相的比例增加, 极性增加, 疏水性物质在流动相中的溶解度降低, 样品中极性物质先流出, 白藜芦醇是弱极性, 水相比例的提高增加了白藜芦醇在色谱柱上的保留时间, 故而出峰时间延长。

在不同的流动相比比例条件下, 样品分离效果均不理想, 如图 2 所示, 其它条件所得结果与图 2 相似, 故需进一步研究。

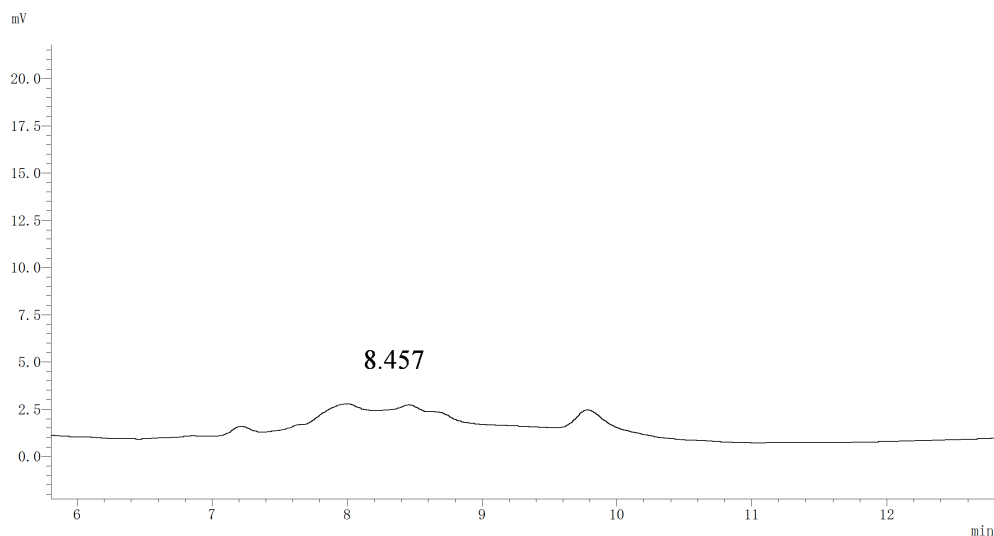


Figure 2. The chromatogram of sample obtained at a 40:60 ratio of acetonitrile:water

图 2. 乙腈: 水比例 40:60 时样品色谱图

3.3. 梯度洗脱对检测结果的影响

如图 3 所示, 反式白藜芦醇出峰时间为 19.168 min, 顺式白藜芦醇出峰时间为 23.177 min。

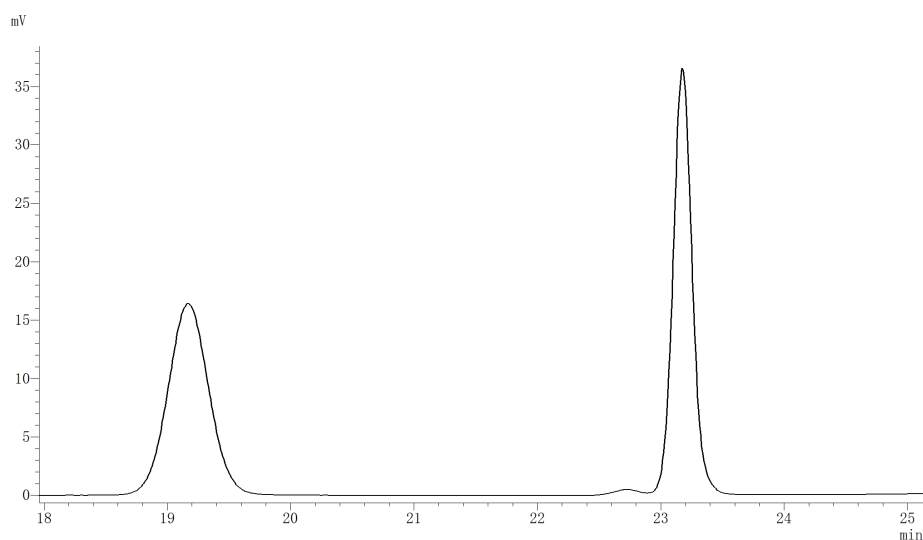


Figure 3. The chromatogram of cis- and trans-resveratrol

图 3. 顺、反式白藜芦醇标品色谱图

由图 4 可知, 与非梯度洗脱相比, 梯度洗脱分离效果较好, 可以满足检测需要, 因此采用梯度洗脱。

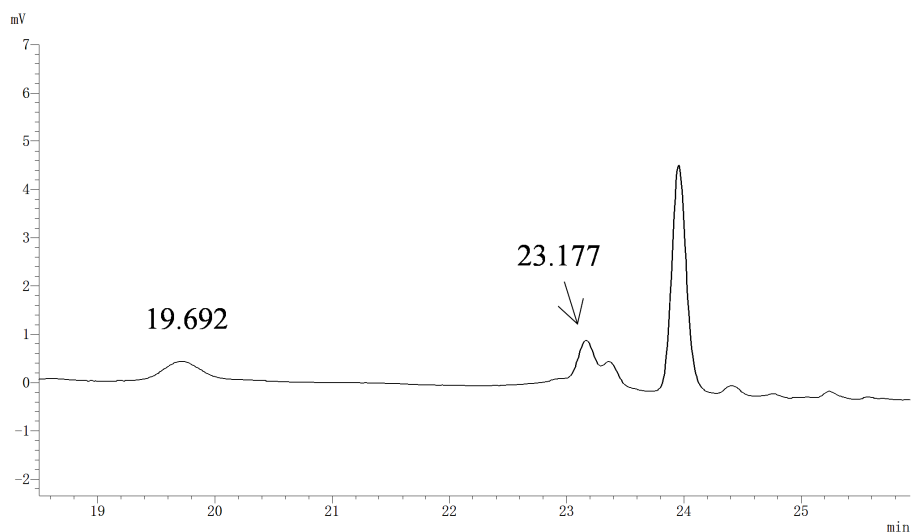


Figure 4. The chromatogram of sample obtained by non-gradient elution

图 4. 非梯度洗脱样品色谱图

3.4. 流动相 pH 对检测结果的影响

如图 5 所示, pH 调整后, 反式、顺式白藜芦醇出峰时间延长, 这可能是由于流动相水相 pH 调节为 2.4 后, 白藜芦醇本身具有弱酸性受水相影响使样品中的白藜芦醇离子与色谱柱结合强度增加, 从而导致出峰时间延长。水相 pH 调整前后分离效果差距不明显, 说明流动相 pH 对样品分离效果没有影响。

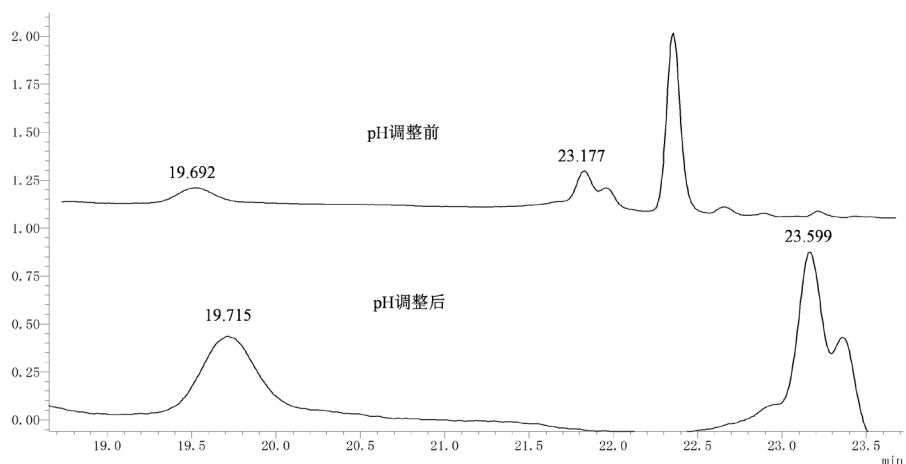


Figure 5. The chromatogram of samples with pH adjusted and without pH adjusted

图 5. pH 调整前后样品色谱图

3.5. 柱温对检测结果的影响

在柱温分别设置为 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃时, 测定结果未有明显差别, 说明柱温对检测结果的影响不显著, 这与鲍会梅[6]的研究结果一致。

3.6. 标准曲线

分别精密移取顺、反式白藜芦醇标准品溶液, 按照表 1 稀释不同倍数得出浓度与峰面积关系, 并分别作出标准曲线, 检测波长为 306 nm。

Table 1. The relationship between concentration of cis-/trans-resveratrol and peak area**表 1.** 顺、反式白藜芦醇浓度与峰面积关系

稀释倍数	总含量(mg/L)	反式白藜芦醇含量(mg/L)	反式白藜芦醇峰面积(min·mAU)	顺式白藜芦醇含量(mg/L)	顺式白藜芦醇峰面积(min·mAU)
0	10	4.9	381,877	5.1	397,708
1.25	8	5.13	435,804	2.87	243,844
2	5	2.81	222,601	2.19	173,666
2.5	4	1.93	138,147	2.07	147,533
4	2.5	0.91	24,161	1.59	41,967

由峰面积和浓度进行线性回归, 得反式白藜芦醇标准曲线方程为 $Y = 91864X - 47566 (r^2 = 0.9920)$, 顺式白藜芦醇标准曲线方程为 $Y = 91877X - 53005 (r^2 = 0.9311)$ 。

3.7. 样品检测

由于白藜芦醇主要存在于葡萄皮中, 因此白葡萄酒中几乎无法检出白藜芦醇[14], 所以选取 21 瓶通化地区不同生产厂家, 不同类型的山葡萄酒进行检测。

由于葡萄酒中的白藜芦醇含量在开瓶后会随着时间的延长而降低[10], 且最适宜白藜芦醇稳定的环境是 4~8℃ 冰箱的环境[15]。因此, 在开瓶后, 立即取样, 置于 4℃~8℃ 条件下冷藏待测。山葡萄酒样品中白藜芦醇检测结果如表 2 所示。

Table 2. The concentration of resveratrol in hill wines in Tonghua region**表 2.** 通化地区葡萄酒中白藜芦醇的含量

样品编号	酒度(%vol)	样品类型	反式白藜芦醇含量(mg/L)	顺式白藜芦醇含量(mg/L)
1	15	甜型红葡萄酒	4.77	3.59
2	7	甜型普通山葡萄酒样 1	-	2.64
3	7	甜型普通山葡萄酒样 2	0.74	0.81
4	15	甜型普通山葡萄酒样 3	-	1.58
5	9	甜型普通山葡萄酒样 4	1.84	1.81
6	8	甜型普通山葡萄酒样 5	1.41	1.29
7	11.5	甜型冰酒样 1	0.54	0.60
8	11.5	甜型冰酒样 2	0.84	0.76
9	12	甜型冰醇山葡萄酒	10.35	1.09
10	7	甜型冰山葡萄酒	1.09	2.21
11	15	甜型特制高级山葡萄酒	9.40	1.77
12	12	甜型高级红葡萄酒	-	0.60
13	12	甜型贵宾级典藏山葡萄酒	-	5.42
14	12	干红山葡萄酒样 1	2.44	3.63
15	11.5	干红山葡萄酒样 2	11.45	2.70
16	7	甜型野生山葡萄酒	-	1.21
17	7	甜型霜后高级山葡萄酒	-	2.58
18	12.5	晚收甜红山葡萄酒	-	3.59
19	15	甜型利口红葡萄酒	-	-
20	16	甜型利口葡萄酒(学院酿造)	8.13	4.63
21	10.5	甜型冰葡萄酒(学院酿造)	-	0.65

由表 2 可知, 通化地区市售山葡萄酒反式白藜芦醇含量在 0.54~11.45 mg/L 之间, 顺式白藜芦醇含量在 0.60~5.42 mg/L 之间。不同品牌的葡萄酒的白藜芦醇含量之间会存在差异, 但总体反式白藜芦醇多于顺式白藜芦醇的含量, 这一结论也与奚星林等人[10]研究结果一致。

4. 结论

本文建立了 HPLC 法测定通化地区山葡萄酒样品中白藜芦醇含量的方法。样品用甲醇稀释 5 倍后, 过滤, 直接进样。采用 C18 色谱柱进行分离, 以乙腈水溶液(35:65, v/v)为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为室温, 检测波长为 306 nm。结果表明, 通化地区市售山葡萄酒反式白藜芦醇含量在 0.54~11.45 mg/L 之间, 顺式白藜芦醇含量在 0.60~5.42 mg/L 之间。

参考文献

- [1] 柴菊华, 孙晓伟, 崔彦志, 侍朋宝, 朱凤妹. HPLC 法测定葡萄酒中白藜芦醇的含量[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(22): 106-110.
- [2] 刘连新, 刘郁, 岑朝健. 液相色谱测定葡萄酒中白藜芦醇含量的方法研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(21): 103-105.
- [3] 刘庆, 曹福成, 孙英鸿. 高效液相色谱法测定葡萄酒中白藜芦醇的含量[J]. 生命科学仪器, 2013, 11(Z1): 9-11.
- [4] 黄强. 高效液相色谱法测定葡萄酒中白藜芦醇的含量[J]. 民营科技, 2013(11): 93.
- [5] 赵丽青, 方佳茂, 肖向东, 陈伟滨, 张帆. 高效液相色谱法快速测定红酒中的白藜芦醇含量[J]. 广东化工, 2012, 39(07): 157-158.
- [6] 鲍会梅. 葡萄酒中白藜芦醇含量影响因素的探讨[J]. 中国酿造, 2011(7): 164-167.
- [7] 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.
- [8] 王铭, 秦磊, 潘肃, 赫玉苹. 吉林省 4 个产地酿酒葡萄浆果中白藜芦醇含量测定[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(3): 268-270.
- [9] 薛洁. 葡萄酒中白藜芦醇含量的测定[J]. 酿酒科技, 2004, 125(5): 103-104.
- [10] 奚星林, 何智欣, 刘青, 陈文锐, 余书奇, 张子皓, 徐家亮. 葡萄酒中顺反式白藜芦醇的 HPLC 测定及进口葡萄酒的本底调查[J]. 酿酒科技, 2013(10): 85-89.
- [11] 冯愈钦, 郭红艳, 刘贵珊, 何建国, 王松磊, 贺晓光. 宁夏葡萄酒中白藜芦醇含量的高效液相色谱快速测定[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 156-161.
- [12] 黄瑞民, 张娟, 李凯, 谢一民. 宁夏干红葡萄酒中反式白藜芦醇的含量测定[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2018, 52(5): 673-677.
- [13] 钟永红, 苏流坤, 刘敏, 宋玉梅, 黄子荣, 梁家佑, 温才洁. 高效液相色谱法测定葡萄制品中的白藜芦醇[J]. 山东化工, 2019, 48(7): 92-93 + 95.
- [14] 程江峰, 王帅. 葡萄酒中白藜芦醇研究进展[J]. 酿酒科技, 2009(9): 102-106.
- [15] 王锬, 耿红玲, 赵玮, 张书文. 葡萄酒中白藜芦醇总量稳定性的研究[J]. 酿酒科技, 2017(5): 57-60.