

## 加压毛细管电色谱对白藜芦醇的分析测定

杨俊佼<sup>1,3</sup>, 苏秀兰<sup>2</sup>, 方平<sup>1</sup>, 王秀丽<sup>1</sup>, 蒋学华<sup>1</sup>, 赵宏<sup>1</sup>, 阎超<sup>1,3</sup>

(1. 上海通微分析技术有限公司, 上海 201203; 2. 内蒙古医学院分子生物学研究中心, 内蒙古呼和浩特 010059; 3. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116011)

**摘要** :采用加压毛细管电色谱方法,对白藜芦醇的顺、反异构体的转化以及光照稳定性等进行了研究;同时还对白藜芦醇进行了定性和定量分析研究。在此基础上初步探讨了葡萄酒中白藜芦醇含量的测定研究,从而为我国葡萄酒行业提供了一种通过鉴定白藜芦醇来定量鉴别葡萄酒品质的分析方法。

**关键词** :加压毛细管电色谱;白藜芦醇;葡萄酒

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2004)03-0270-03

## Analysis of Resveratrol by Pressurized-Capillary Electrochromatography

YANG Junjiao<sup>1,3</sup>, SU Xiulan<sup>2</sup>, FANG Ping<sup>1</sup>, WANG Xiuli<sup>1</sup>, JIANG Xuehua<sup>1</sup>,  
ZHAO Hong<sup>1</sup>, YAN Chao<sup>1,3</sup>

(1. Unimicro (Shanghai) Technologies Co., Ltd., Shanghai 201203, China;  
2. Center for Research on Molecular Biology, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, China;  
3. Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China)

**Abstract** : *trans*-Resveratrol and *cis*-resveratrol were analyzed using pressurized-capillary electrochromatography (CEC). The effects of illumination by sunlight to the samples were investigated. The concentration of resveratrol in wines was determined with qualitative and quantitative analysis of resveratrol. As a technique with high efficiency and high resolution, CEC proved to be a viable alternative for the quantitative analysis of wines.

**Key words** : pressurized-capillary electrochromatography; resveratrol; wine

毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC)是近年来发展十分迅速的一种新型分离技术。它是将常规色谱填料填充到毛细管中,或在毛细管内表面键合、涂敷固定相,以电渗流(EOF)作为流动相的推动力,根据样品中各组分在固定相和流动相间分配系数的差异和在电场中迁移速率的不同而实现分离的一种高效微分离技术。CEC可看作是高效液相色谱(HPLC)和毛细管电泳(CE)相结合的产物,因此具有双重优势。它一方面解决了CE选择性差、难以分离中性物质的问题,另一方面大大提高了液相色谱的分离效率。将高压泵引入到CEC中,即成为加压毛细管电色谱(pressurized-capillary electrochromatography, pCEC)。pCEC克服了CEC中柱体易烧干和易产生气泡的缺点,是近年来迅猛发展起来的一种新型微分离技术。

白藜芦醇(resveratrol)对人体具有很好的保健作用,尤其是对心血管和癌症预防及辅助治疗的功

效使它成为研究的热点。目前,国外应用HPLC<sup>[1-8]</sup>和CE<sup>[9,10]</sup>对白藜芦醇进行了大量的研究,并取得了不少成果。国内有关白藜芦醇的研究刚刚起步,对葡萄及葡萄酒中保健功能物质——白藜芦醇的测定方法的研究报道<sup>[11-13]</sup>较少,对不同产区、不同酿酒品种的葡萄中白藜芦醇的含量测定工作也未开展。用CEC对白藜芦醇的研究也未见报道。本文在三用加压毛细管电色谱仪上对白藜芦醇进行了研究。在乙腈-水体系中,考察了乙腈浓度对白藜芦醇保留的影响,优化了分离条件,建立了一套简单、可行的测定葡萄酒中白藜芦醇含量的方法。

### 1 实验部分

#### 1.1 试剂和仪器

白藜芦醇标准品(Sigma-Aldrich Co., USA);乙腈(色谱纯,Merck, Germany);水为去离子水,二次重蒸;葡萄酒样品由中国长城葡萄酒基地发展

有限公司提供。

加压毛细管电色谱 TriSep™-2010 GV CEC 系统(美国通微分析技术有限公司, Pleasanton, CA, USA), 包括流动相输送系统、正负 30 kV 的高压电源、紫外-可变波长检测器和数据处理系统。毛细管色谱柱(美国通微分析技术有限公司, Pleasanton, CA, USA)。

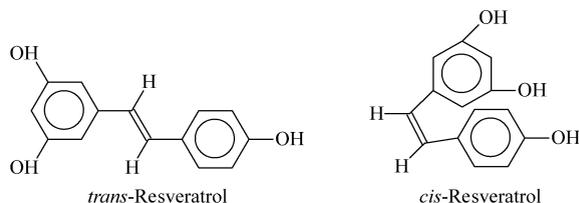
## 1.2 色谱条件

色谱柱:用 ODS 装填的石英毛细管柱, 内径 100 μm, 柱长 30 cm, 有效柱长 20 cm; 流动相:乙腈-水(体积比为 60:40); 泵流速:0.02 mL/min; 反压阀压力:7 MPa; 进样量:20 nL; 检测波长:306 nm。以硫脲作为不保留标记物测定死时间。

## 2 结果与讨论

### 2.1 白藜芦醇的性质研究

白藜芦醇的化学名称为芪三酚(3,5,4'-三羟基均二苯代乙烯)是一种二苯乙烯芪类多酚物质,属于二苯乙烯衍生物,其分子结构式为:



分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, 相对分子质量为 228.25。顺、反式白藜芦醇可各自与葡萄糖结合, 形成顺、反式白藜芦醇甙<sup>[14]</sup>。到目前为止, 尚未在自然界中发现顺

式白藜芦醇, 但据 Siemann 等<sup>[15]</sup>的报道, 顺式白藜芦醇可由反式白藜芦醇在紫外光照射下制得。

白藜芦醇对光不稳定, 在完全避光条件下, 反式白藜芦醇可在乙醇中稳定数月, 而且受 pH 值的影响较小; 顺式白藜芦醇放置一段时间后会变回反式结构<sup>[16]</sup>。实验中发现, 白藜芦醇标准品溶液在太阳光直射处理条件下会发生颜色上的变化——由无色变为淡黄色。本文对经太阳光照射处理后的白藜芦醇标准品溶液进行了色谱分析, 结果表明反式白藜芦醇随光照时间的延长确实可逐渐转化为顺式结构; 白藜芦醇随着光照时间的增加, 会发生分解变质, 尤其在光照 1 h 之内其分解速度很快, 因此酿制好的葡萄酒应该避光保存, 才能保持其营养成分——白藜芦醇免受破坏。

### 2.2 乙腈浓度的影响

流动相中有机改性剂的浓度不仅影响流动相的流速, 而且主要对溶质的保留有很大的影响。流动相的改变导致溶质在固定相和流动相中的分配系数发生变化, 从而影响其分离选择性。本文选择乙腈-水体系, 考察了乙腈浓度对白藜芦醇保留的影响(见表 1)。结果表明, 随着乙腈浓度的增加, 流动相的粘度减小, 流速变快, 不保留的硫脲流出时间缩短。ODS 毛细管柱为反相柱, 随着乙腈浓度的增加, 流动相的洗脱能力提高, 白藜芦醇的保留时间缩短; 同时, 顺、反式白藜芦醇的分离选择性和分离度都减小。考虑到分离时间的因素, 我们最终选择流动相中乙腈的浓度(以体积分数计)为 60%。

表 1 流动相中有机改性剂对白藜芦醇保留的影响

Table 1 Effects of organic modifier on retention behavior of resveratrol

| Mobile phase<br>V( acetonitrile ): V( water ) | Retention time/min |                         |                           | Resolution<br>factor ( α ) | Resolution<br>( R <sub>s</sub> ) |
|---|--------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------------|
|   | thiourea           | <i>cis</i> -resveratrol | <i>trans</i> -resveratrol |                            |                                  |
| 20:80   | 7.81               | 31.07                   | 52.31                     | 1.93                       | 8.31                             |
| 30:70   | 6.11               | 15.92                   | 22.09                     | 1.48                       | 5.53                             |
| 40:60   | 5.12               | 8.72                    | 9.58                      | 1.33                       | 1.66                             |
| 60:40   | 4.88               | 5.91                    | 6.20                      | 1.28                       | 1.49                             |

### 2.3 白藜芦醇的电色谱分离

在加压毛细管电色谱上, 研究了不同光照时间条件下白藜芦醇顺、反构象的转换。图 1 显示在没有光照时, 白藜芦醇以 100% 的反式结构存在; 而随着光照时间的延长, 白藜芦醇逐渐由反式结构转化为顺式结构。

pCEC 采用的是高压泵和高压电源两种模式同时驱动流动相, 双重模式的结果是提高了分离选择性, 改善了色谱柱的分离性能。图 2 对比了加电和不加电条件下顺、反式白藜芦醇的分离结果, 结果表明通过增加外加电压, 分离分析时间缩短了, 同时柱

效也得到了提高: 不加电时, 柱效为 100 000/m; 而加电后柱效达 110 000/m。

### 2.4 重现性及准确度

在 TriSep™-2010 GV CEC 系统上, 采用乙腈-水流动相体系对葡萄酒样品进行了白藜芦醇的含量(以 μg/g 计, 下同)测定。表 2 是采用内标法 5 次重复实验测定的结果。图 3 是实际葡萄酒样品的色谱分离图。

### 2.5 线性关系、检出限及回收率

分别配制 0.10, 0.50, 2.45, 5.76 μg/g 系列含量的白藜芦醇标准样品, 以色谱峰面积 Y 对其含量

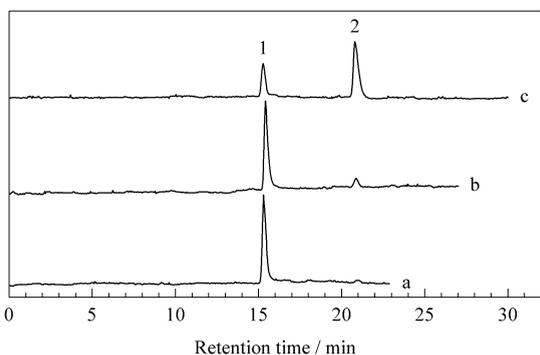


图 1 不同照射时间的色谱分离对比

Fig.1 Comparison of chromatographic separation at different irradiation times

Irradiation times : a. 0 ; b. 15 min ; c. 50 min.

Column : 300 mm × 100 μm capillary , effective length 200 mm , packed with C<sub>18</sub> ; mobile phase : acetonitrile/water ( 30/70 , v/v ) ; flow rate : 0.02 mL/min ; separation voltage : 15 kV ; detection wavelength : 306 nm ; injection : 20 nL.

Peaks : 1. *trans*-resveratrol ; 2. *cis*-resveratrol.

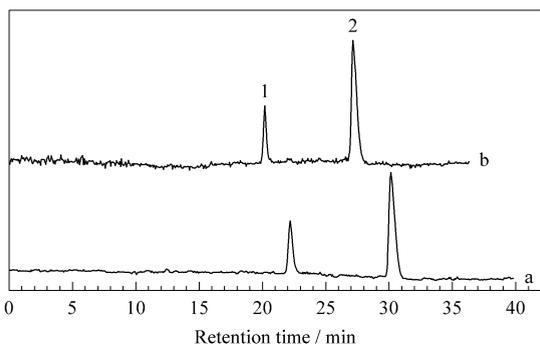


图 2 不同电压下顺、反式白藜芦醇的分离对比

Fig.2 Comparison of chromatographic separation at different voltages

Separation voltages : a. 0 ; b. 10 kV.

Mobile phase : acetonitrile/water ( 25/75 , v/v ). Other conditions are the same as in Fig. 1.

Peaks : 1. *trans*-resveratrol ; 2. *cis*-resveratrol.

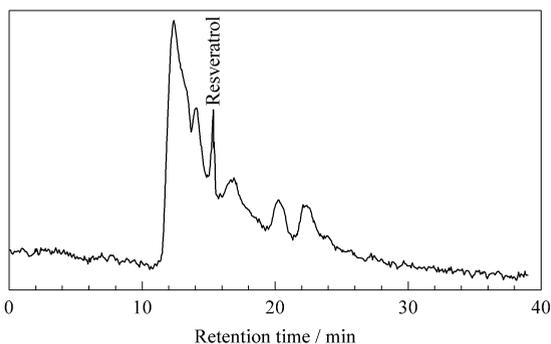


图 3 葡萄酒样品的色谱分离图

Fig.3 Chromatogram of a wine sample

Conditions are the same as in Fig. 1.

表 2 白藜芦醇的定量测定

Table 2 Quantitative analysis of resveratrol

| No. | Retention time/min | Peak area | Content/( μg/g ) |
|-----|--------------------|-----------|------------------|
| 1   | 7.065              | 3 396 776 | 16.32            |
| 2   | 7.070              | 3 053 585 | 15.23            |
| 3   | 7.082              | 3 550 712 | 16.03            |
| 4   | 7.063              | 3 059 316 | 15.25            |
| 5   | 7.023              | 3 212 427 | 16.01            |
| RSD | 0.32%              |           | 6.67%            |

准白藜芦醇 ,测得回收率为 95% ~ 105% ,其相对标准偏差为 4.5% 。

### 3 结语

本文提出的方法不仅可测定反式白藜芦醇 ,而且可测得变化后的顺式产物 ,并可根据顺式白藜芦醇的产生量来考察酒质量的变化 ,为葡萄酒的酿制和保存提供有益的参考。

### 参考文献 :

[ 1 ] Jeandet P , Bessis R , Maume B F , Meunier P , Peyron D , Trollat P. J Agric Food Chem , 1995 , 43 : 316

[ 2 ] Jeandet P , Bessis A C , Adrian M , Weston L A , Debord S , Meunier P , Maume G , Bessis R. Anal Chem , 1997 , 69 : 5 172

[ 3 ] Seamann E H , Creasy L L. Am J Enol Vitic , 1992 , 43 : 49

[ 4 ] Palomino O , Gomez-Serranillos M P , Slowing K , Carretero E , Villar A. J Chromatogr A , 2000 , 870 : 449

[ 5 ] Eugenio R , Jose-Maria R. J Chromatogr A , 2000 , 881 : 461

[ 6 ] Pezet R , Pont V , Cuenat P. J Chromatogr A , 1994 , 663 : 191

[ 7 ] Melzoch K , Hanzlikova I , Filip V , Buckiova D , Smidrkal J. Agriculturae Conspectus Scientificus , 2001 , 66 : 53

[ 8 ] Sato M , Suzuki Y , Okuda T , Yokotsuka K. Biosci Biotechnol Biochem , 1997 , 61( 11 ) : 1 800

[ 9 ] Chu Q Y , Q ' Dwyer M , Zeece M G. J Agric Food Chem , 1998 , 46 : 509

[ 10 ] Gu X L , Creasy L , Kester A , Zeece M. J Agric Food Chem , 1999 , 47 : 3 223

[ 11 ] Han Yashan , Chen Lei , Dai Yunqing. Chinese Journal of Chromatography ( 韩雅珊 , 陈 雷 , 戴蕴青. 色谱 ) , 1999 , 17( 4 ) : 366

[ 12 ] Wang Hua , Wei Yahui , Wang Qingli , Liu Shuwen. Acta Univ Agric Boreali-occidentalis ( 王 华 , 尉亚辉 , 王庆俐 , 刘树文. 西北农业大学学报 ) , 1999 , 27( 4 ) : 83

[ 13 ] Dai Qun , Zhao Guang 'ao. Industrial Microbiology ( 戴 群 , 赵光鳌. 工业微生物 ) , 1999 , 3 : 22

[ 14 ] Sun Wenji , Sheng Jinfang. The Handbook of Nature Active Components. Beijing : The Publishing Company of Medicine Technology of China ( 孙文基 , 绳金房. 天然活性成分简明手册. 北京 : 中国医药科技出版社 ) , 1998. 148

[ 15 ] Siemann E H , Creasy L L. Am J Enol Vitic , 1992 , 43 : 49

[ 16 ] Brent C T , Andrew L W. J Agric Food Chem , 1996 , 44 : 1 253

X( μg/g )进行线性回归 ,得线性方程为 :Y = 29.8X - 1.7。以信噪比为 3 计 ,得到最小检出限为 0.05 μg/g。在实际样品中添加高、中、低 3 种含量的标