

高效液相色谱法测定野生毛葡萄中的白藜芦醇*

Determination of Resveratrol in Wild Grape by HPLC

周琳, 陈秋虹

ZHOU Lin, CHEN Qiu-hong

(广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要: 为了建立整颗野生毛葡萄中白藜芦醇含量的高效液相色谱分析方法, 采用组织分散匀质器将葡萄匀浆后用无水硫酸钠研磨干燥均匀样品, 再用乙酸乙酯提取作为前处理方法, 通过优化各种实验条件, 选择色谱柱为 Symmetryshielly™ RP18 柱(4.6 mm×250mm, 5μm), 流动相为乙腈-0.1% 醋酸溶液(25:75), 检测波长为 306nm 的实验方法进行实验。结果表明, 白藜芦醇在 1.32~4.80μg/ml 的范围内线性关系良好, 平均回收率为 97.3%, RSD 为 2.24%。该方法简单准确, 重现性好, 可以用于山葡萄原料野生毛葡萄的质量检测。

关键词: 高效液相色谱法 白藜芦醇 野生毛葡萄

中图分类号: O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2010)03-0237-02

Abstract: A method for determination of resveratrol in the whole wild grape by HPLC was established. The grapes were homogenated by homogeneous dispersion device and the anhydrous sodium sulfate was used to grind and dry the samples. Then the samples were extracted by using ethyl acetate as the pre-treatment methods. By optimizing a variety of experimental conditions, a Symmetryshielly™ RP18 (4.6 mm×250mm, 5μm) was selected as column, with acetonitrile; 0.1% HAC (25:75) as mobile Phase and UV detection wavelength at 306nm. The results demonstrated the calibration curve of resveratrol was linear between 1.32~4.80μg/ml and the average recovery was 97.3% with RSD equating to 2.24%. This method was proved to be simple, rapid, accurate and can be used for the quality determination of wild grape.

Key words: HPLC, resveratrol, wild grape

白藜芦醇又称芪三酚, 是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物。白藜芦醇具有明显的抗菌、消炎、抗癌、抗血栓、抗高血脂等作用, 特别是对降低心血管病几率有明显的效果^[1]。白藜芦醇存在于多种高等植物中, 常见含白藜芦醇的植物有葡萄科葡萄属植物、棕榈科海藻属植物、豆科槐属、花生属、三叶草植物及虎杖、桑椹等。与其它植物相比, 葡萄中的白藜芦醇含量较高, 并主要集中在葡萄果籽和果皮中^[2]。白藜芦醇在葡萄中的含量因葡萄品种、产地、生长环境的不同而存在着很大的差异^[3]。野生毛葡萄果穗小、种子较大而且其出汁率较低, 因此野生山葡萄中酚类的含量远高于其他种植葡萄品种, 特别是其中对心血管起软化作用的白藜芦醇的含量较

高。目前只有对葡萄皮、籽和葡萄酒中白藜芦醇的测定^[4~7], 尚无整颗野生毛葡萄的测定方法。野生毛葡萄作为山葡萄酒及饮料的原料, 其白藜芦醇的含量是决定山葡萄酒优质程度的指标^[8]。因此, 野生毛葡萄中白藜芦醇的测定有重要的意义。本实验在样品前处理、提取条件选择、色谱方法改进上均做系统研究, 较好地解决了毛葡萄中高水分、高糖分对提取白藜芦醇所带来的干扰, 通过各种因素试验选择确定了低毒、容易回收而且提取液杂质少的试剂, 并经过多次筛选, 确定了能明显改善色谱峰脱尾现象色谱条件, 为山葡萄酒的原料野生毛葡萄质量控制建立标准检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters ALLIANCE 2695 高效液相色谱系统, Empower 色谱工作站, Waters2996 紫外检测器, T25 基本分散器, THZ-82A 台式恒温振荡器。

白藜芦醇标准对照品(中国药品生物制品检定

收稿日期: 2010-06-26

作者简介: 周琳(1965-), 女, 工程师, 主要从事有机生化分析及大型仪器设备管理工作。

* 广西科技基础条件平台建设项目(No: 07-105-0001-012)资助。

所出品,批号为111535-200502),乙腈(色谱纯),乙酸乙酯(分析纯),醋酸(分析纯),无水硫酸钠(分析纯)。野生毛葡萄由广西农科院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱为SymmetryshiclyTMRP18(4.6 mm×250mm,5 μ m)色谱柱,流动相为乙腈-0.1%醋酸溶液(25:75),流速:1.0ml/min,柱温25 $^{\circ}$ C。检测波长为306nm。

1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取白藜芦醇对照品6.60 mg,用甲醇溶解,定容于100 ml棕色量瓶中,制得浓度为66 μ g·ml⁻¹的标准溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备

取新鲜野生毛葡萄用分散器将毛葡萄搅成匀浆,精确称取样品5g,加入无水硫酸钠研磨至干燥均匀,置磨口三角瓶中用乙酸乙酯50ml在40 $^{\circ}$ C恒温下振荡提取30min,反复提取3次。合并乙酸乙酯,减压蒸干,用甲醇溶解残留物,用5ml棕色量瓶定容。摇匀,滤过,续滤液用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液作为供试品溶液。

1.2.4 标准曲线的制备

白藜芦醇标准曲线的制备是精密吸取白藜芦醇储备液(66 μ g·ml⁻¹)0.1ml、0.5ml、1.0ml、1.5ml、2.0ml、3.0ml、5.0ml至5ml棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,依次进样制备。

2 结果与分析

2.1 线性关系

以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,将所得数据绘成标准曲线,白藜芦醇线性方程为 $Y = -87.2 + 38.8X$,相关系数0.9970,线性范围1.32~4.80 μ g/ml。最低检测限为0.026 μ g/ml。

2.2 精密度的试验

精密吸取白藜芦醇标准对照品溶液(66 μ g·ml⁻¹)各20 μ l,重复进样5次,测定峰面积,RSD=0.44%,表明精密度良好。

2.3 稳定性试验

取同一份供试品溶液,按供试品溶液的制备操作方法,在0h、1h、1.5h、2h、5h、10h分别测定计算白藜芦醇的峰面积,RSD为0.53%,表明供试品溶液在避光情况下10h内稳定。

2.4 重复性试验

对同一批样品取样5份,按供试品溶液的制备

操作方法,依法测定计算白藜芦醇的含量,RSD为2.57%,表明方法重复性良好。

2.5 回收率试验

精密称取已知含量的样品5份(称样量为原来的一半),精密加入白藜芦醇对照品,按供试品溶液的制备方法进行操作,测定计算回收率,结果(表1)表明方法回收率较好(平均回收率为97.3%,RSD为2.24%)。

表1 回收率试验结果

样品含量(μ g)	加标量(μ g)	测得量(μ g)	回收率(%)
13.85	9.2	22.82	98.99
13.33	9.2	22.42	99.49
13.63	9.2	22.64	99.15
13.21	13.8	25.84	95.69
13.60	13.8	26.38	96.26
12.36	13.8	24.79	94.77
12.38	18.4	28.85	93.73
14.05	18.4	31.97	98.50
12.07	18.4	30.35	98.96

2.6 样品测定

按1.2.3项的方法制备供试品溶液,分别吸取供试品溶液20 μ l、对照品溶液10 μ l,在上述色谱条件下进样11批,测定峰面积,按外标法以峰面积计算白藜芦醇含量(mg/100g)分别为:0.36,0.19,0.58,0.49,0.54,0.55,0.47,0.54,0.36,0.28,0.14。

3 讨论

3.1 样品前处理

白藜芦醇是葡萄植株受到真菌感染,紫外照射等不利条件产生的抗逆物,是一种植物抗毒素,主要产生在果实的表皮中^[9]。目前对于葡萄组织的测定一般采用先提取后浓缩,再测定的步骤^[10]。整株毛葡萄由于水分高、糖分大,白藜芦醇含量低,较之在葡萄皮、籽中测定难度更大。整株毛葡萄由于糖分过高无法烘干样品,而且样品结块不利于提取,若直接用醇类试剂提取则试剂使用量大,试剂含水难于浓缩。本实验采用组织分散匀质器将葡萄打成匀浆后再用无水硫酸钠研磨干燥均匀样品,再用有机溶剂提取,不仅去除水分干扰,而且样品分散均匀,提取更全面。我们用这样的方法提取葡萄皮中的白藜芦醇平均含量为4.10mg/100g,葡萄籽中的白藜芦醇平均含量为2.37mg/100g。

3.2 提取条件选择

白藜芦醇属芪类化合物,难溶于水,易溶于乙醇、甲醇、乙酸乙酯等有机溶剂,因此一般采用上述溶剂作为提取剂。我们的实验发现,甲醇、乙酸乙

(下转第241页)

草中β-蜕皮激素的含量分别为0.0369%, 0.0401%, 0.0395%, 0.0410%, 0.0395%, RSD为1.61%。

2.6 加标回收率

取已知含量的样品粉末,加入适量β-蜕皮激素标准溶液,按索氏提取法进行操作,再按1.4中色谱条件测定β-蜕皮激素含量并计算得到平均回收率为99.31%。

2.7 重现性

精密吸取0.80mg/ml标准溶液10μl,按1.4中色谱条件,重复进样5次,计算得出RSD=2.0%。

2.8 样品测定

将100401、100402、100403、100404、100405、100406、100407、100408这8个不同批次的蓝耳草粉末按精密度试验方法,结合标准曲线分别计算蓝耳草中β-蜕皮激素的含量,结果(表1)比较理想。

表1 样品的测定结果

样品批号	含量(%)	样品批号	含量(%)
100401	0.039	100405	0.036
100402	0.040	100406	0.041
100403	0.040	100407	0.038
100404	0.039	100408	0.041

3 结束语

本文采用振荡提取法和超声提取法提取β-蜕皮激素。该方法操作简单,提取时间短,但激素提取不是很完全。由于蓝耳草成分较复杂,我们选用中等浓度有机相(如40%甲醇水溶液)作流动相得到了较好的分离效果,以甲醇为溶剂,索氏提取法提取蓝耳草中β-蜕皮激素,用高效液相色谱法测定其含量,所得线性关系、回收率、精密度、重现性都比较满意,对样品含量的测定,也取得了较好的结果。该结果为蓝耳草的进一步开发利用提供了依据。

参考文献:

- [1] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1997.
- [2] 陈莉莉,吴红权,李颖,等. 漏芦中蜕皮甾酮提取方法研究[J]. 中药材, 2002, 25(3): 195-196.
- [3] 朱向东,安银岭. 从露水草中提取纯化β-蜕皮激素工艺研究[J]. 西南林学院学报, 2003, 23(2): 23-25.
- [4] 谭梅,李良,杨建鸣,等. 露水草提取物质量标准的研究[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(8): 23-80.

(责任编辑:尹 闯)

(上接第238页)

酯提取率较乙醇高,甲醇与乙酸乙酯提取率相当。与甲醇相比,乙酸乙酯低毒、沸点低易回收,提取液色素含量低,色谱杂质峰少,故本实验采用乙酸乙酯为提取试剂。通过对提取方式(加热回流、超声、振摇)、提取时间、提取温度、料液比、提取次数分别做单因素实验,确定出实验方案为:每次用乙酸乙酯50ml在40℃恒温下振摇提取30min,分别提取3次。特别的是白藜芦醇对光不稳定,其反式异构体见光后发生异构化而形成顺式,因此所有操作应严格避光。

3.3 色谱条件的选择

本次试验通过对色谱条件的多次筛选,确定选用SymmetryshielY TMRP18(4.6 mm × 250mm, 5μm)作为色谱柱,选用乙腈-0.2%醋酸溶液(25:75)作为流动相。优于其他的溶液系统磷酸盐-乙腈,乙腈-水等,达到更好的分离效果,而且能够明显改善色谱峰脱尾现象。

参考文献:

- [1] 余慧琳. 白藜芦醇的生理功能及其应用前景[J]. 生物

学通报, 2005, 40(11): 12-13.

- [2] 薛洁. 山葡萄酒中白藜芦醇含量的测定[J]. 酿酒科技, 2004(5): 103-104.
- [3] 王劲松. 葡萄与葡萄酒中白藜芦醇的含量及其影响因素[J]. 宁夏农林科技, 2003(6): 81-83.
- [4] 王劲松. 葡萄和葡萄酒中白藜芦醇的测定方法[J]. 宁夏农林科技, 2003(5): 37-38.
- [5] 孟宪军,杜彬. 野生山葡萄皮籽中白藜芦醇的含量测定[J]. 食品科学, 2006(2): 96-99.
- [6] 高年法,姜丽,张健,等. HPLC法测定葡萄酒中白藜芦醇的基础性研究[J]. 酿酒, 2005, 32(1): 75-76.
- [7] 向阳,张彤,张焯,等. 高效液相色谱法测定葡萄皮和葡萄籽中白藜芦醇的含量[J]. 卫生研究, 2003, 32(5): 490-492.
- [8] 王永亮. 白藜芦醇的检测作为及技术监督的优选进出口葡萄酒卫生质量指标的可行性和意义[J]. 微量元素与健康研究, 2002, 19(1): 41-57.
- [9] 张影陆,于贞,赵光葵. 葡萄与葡萄酒中的白藜芦醇[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2002(2): 53-54.
- [10] 李华,张予林,袁春龙,等. 葡萄与葡萄酒中白藜芦醇分析方法的研究现状[J]. 中国食品学报, 2005, 5(1): 104-107.

(责任编辑:邓大玉)