

RSD 为 1.86 %。

2.12 样品测定:取 3 批样品,制备供试品溶液。分别精密吸取黄芩苷对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,采用外标法计算黄芩苷的质量分数,结果见表 1。

表 1 芎菊上清丸中黄芩苷的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of baicaline in Xiongju Shangqing Pills (n=3)

| 批号 | 黄芩苷/(mg·g ⁻¹) |
|----------|---------------------------|
| 20070912 | 2.12 |
| 20080125 | 1.95 |
| 20080318 | 2.04 |

3 讨论

采用 HPLC 法测定黄芩苷的文献报道有多种流动相^[1,2],但对该样品的分离效果均欠佳。黄芩苷属于黄酮类化合物,分子结构中含有多个酚羟基,

显一定的酸性,故本实验采用了 RP-HPLC 法,在流动相中加入少量磷酸、冰乙酸,抑制其离解并改善峰形。同时分别考察了甲醇-水-冰乙酸(40:60:1)、甲醇-水-冰乙酸(48:60:1)、甲醇-水-磷酸(47:53:0.2)流动相体系,结果显示流动相为甲醇-水-冰乙酸(40:60:1)时,色谱峰峰形较好,分离度、理论塔板数、拖尾因子等系统适用性均符合要求。

黄芩苷的提取方法主要有:煎煮法、超声提取法、加热回流法、索氏提取法等。实验考察了超声提取法、加热回流法,结果表明超声提取法的提取效果优于加热回流法。

参考文献:

- [1] 王厚伟,高德民,田景振. 高效液相色谱法测定复方黄芩消炎片中黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(4): 13-15.
- [2] 宋英姬. HPLC 法测定消炎片中黄芩苷[J]. 中草药,2007,38(12):1829-1830.

干红葡萄酒中儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇和原花青素的测定

王夏青¹, 於洪建², 赵余庆^{3*}

- (1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032; 2. 天津市尖峰天然产物研究开发有限公司, 天津 300457; 3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 利用 HPLC 法与分光光度法对干红葡萄酒中儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇和原花青素分别进行测定。方法 儿茶素、表儿茶素和白藜芦醇采用 HPLC 法测定, Kromasil C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm); 流动相采用甲醇-水梯度洗脱; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 290 nm; 每次进样 10 μ L。花青素采用分光光度法测定。结果 干红葡萄酒中白藜芦醇、儿茶素和表儿茶素质量浓度分别为 0.036 5 ~ 0.893 9 mg/L, 0.27 ~ 70.14 mg/L, 1.04 ~ 15.32 mg/L; 原花青素为 0.309 ~ 3.111 mg/mL。结论 干红葡萄酒中儿茶素与表儿茶素的量较高, 白藜芦醇的量稍低; 原花青素的量平均为 2.1219 mg/mL。

关键词:干红葡萄酒; 儿茶素; 表儿茶素; 白藜芦醇; 高效液相色谱; 原花青素; 紫外分光光度
中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2009)05-0745-03

红葡萄酒是用成熟的葡萄为原料,经破碎、压榨后带皮直接发酵酿成的饮料酒。干红葡萄酒含有对人体有益的维生素、氨基酸以及多酚类化合物等,不仅营养丰富,而且具有一定的养生功效。目前对干红葡萄酒品质评价的方法多数还局限于感官分析和单一化学成分的鉴定,对干红葡萄酒科学的、整体性的评价方法还处于探索阶段^[1]。白藜芦醇是一种重要的植物抗毒素和抗氧化剂,葡萄制品如葡萄酒,葡萄汁中都存在,其中以干红葡萄酒中的量最高。白藜芦醇具有调血脂,抑制血小板,改善非酒精性脂肪

肝及抑制脂肪氧化酶活性的作用,并可通过保护细胞线粒体中 DNA 免遭化学损害而发挥延缓衰老功效^[2-4]。儿茶素、表儿茶素是茶多酚的主要成分。现代药理研究表明,儿茶素具有抗氧化、防辐射、护肤美容、减缓香烟毒害等多种功效^[5]。原花青素是葡萄籽提取物的主要活性成分,由单体(儿茶素、表儿茶素)和基于此单体的聚合物组成,其中生物活性最强的部分是低聚体(二、四聚体)原花青素^[6],是评价葡萄籽提取物和葡萄制品质量的重要指标。本研究对干红葡萄酒中儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇和原

* 收稿日期:2008-10-14
* 通讯作者 赵余庆

花青素进行了测定,以期为科学地评价干红葡萄酒的品质提供有效的参考。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(knauer 德国),UV—2800AH 紫外可见分光光度计(上海尤尼可),Sartorius 电子天平(北京赛多利斯)。

原花青素、白藜芦醇对照品(质量分数均为 98%)由天津市尖峰天然产物研究开发有限公司提供,儿茶素(批号 878-200102)、表儿茶素对照品(批号 877-200001)由中国药品生物制品检定所提供。甲醇为色谱纯、双重蒸馏水。干红葡萄酒的来源见表 1。

表 1 干红葡萄酒的来源和产地
Table 1 Resources of Chinese red wine

| 批号 | 样品 | 厂家或者产地 |
|---------|--------------------------|-------------------------|
| 长城 1997 | 华夏长城系列干红葡萄酒 1997 年 | 中粮酒业有限公司出品 昌黎产区 华夏葡园 |
| 长城 1998 | 长城解百纳干红葡萄酒 1998 年 | 昌黎产区 华馨葡萄酒有限公司酿造 |
| 长城 1999 | 长城葡萄酒海岸系列解百纳干红葡萄酒 1999 年 | 中粮长城葡萄酒(烟台)有限公司 |
| 长城 2000 | 长城葡萄酒特制高级解百纳干红 2000 年 | 中粮酒业有限公司沙城产区 |
| 长城 2001 | 长城干红葡萄酒解百纳特制 2001 年 | 中粮酒业有限公司沙城产区 |
| 长城 2002 | 长城葡萄酒特制解百纳干红 2002 年 | 中粮酒业有限公司沙城产区 |
| 王朝 | 王朝解百纳干红 2005 年 | 天津中法合营王朝葡萄酒有限公司 |
| 张裕 2003 | 张裕解百纳干红葡萄酒 2003 年 | 烟台张裕葡萄酒有限公司 |
| 张裕 2001 | 张裕解百纳干红葡萄酒 2001 年 | 烟台张裕葡萄酒有限公司 |
| 长城 | 长城干红葡萄酒 神州风情 | 中粮酒业有限公司 |
| 通化 | 通化牌高级红葡萄酒 | 通化葡萄酒股份有限公司 |
| 五女山冰红 | 五女山野生山葡萄酒 2007 年 | 辽宁五女山米兰酒业有限公司 |

2 方法与结果

2.1 白藜芦醇、儿茶素、表儿茶素的测定

2.1.1 色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm);流动相采用甲醇(A)-水(B)梯度洗脱, 0~8 min, 20%A, 8~12 min, 60%A, 12~30 min, 100%A;体积流量为 1 mL/min;检测波长为 290 nm;每次进样 10 μL。

2.1.2 标准曲线的制备:准确称取白藜芦醇对照品

0.02 mg, 儿茶素对照品 2 mg, 表儿茶素对照品 2 mg 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。精密吸取适量混合对照品溶液,进样测定峰面积值。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归。白藜芦醇: $Y = 36\ 755\ 123.74 X + 1\ 202.58$, $r = 0.999\ 8$, 表明白藜芦醇在 0.001~0.012 μg 与峰面积线性关系良好。表儿茶素: $Y = 2\ 279\ 883.97 X - 54\ 747.42$, $r = 0.999\ 7$, 表明表儿茶素在 0.1~1.2 μg 与峰面积线性关系良好。儿茶素: $Y = 2570\ 206.55 X - 162\ 742.52$, $r = 0.999\ 8$, 表明儿茶素在 0.2~1.4 μg 与峰面积线性关系良好。

2.1.3 精密密度试验:精密称取王朝酒样 10 μL,连续进样 5 次,测定色谱峰面积,计算,结果显示白藜芦醇、儿茶素和表儿茶素峰面积的 RSD 分别为 1.9%、0.8%、0.4%。

2.1.4 重现性试验:精密称取王朝酒样共 5 份,各进样 10 μL,测定色谱峰面积,计算,结果显示白藜芦醇、儿茶素和表儿茶素峰面积的 RSD 分别为 1.7%、1.1%、0.2%。

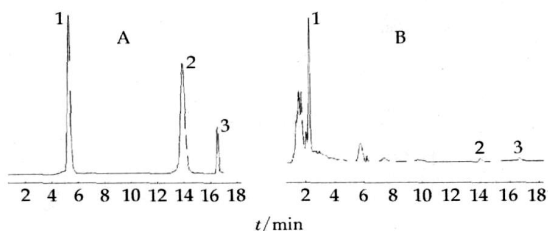
2.1.5 稳定性试验:分别在 0、4、8、12、24 h 精密吸取王朝酒样 10 μL 进样,测定色谱峰面积,结果白藜芦醇、儿茶素和表儿茶素峰面积的 RSD 分别为 0.6%、1.6%、0.9%。表明在 24 h 内供试品溶液稳定。

2.1.6 回收率试验:精取王朝酒样,共 5 份,分别加入 0.05 mg 白藜芦醇、儿茶素和表儿茶素对照品,分别精密吸取 10 μL 进样,测定,结果平均回收率分别为 100.7%、99.6%、100.97%, RSD 分别为 1.6%、1.08%、0.8%。

2.1.7 样品测定:取酒样经 0.22 μm 滤膜超滤,备用。取对照品和供试品溶液进样测定,色谱图见图 1。定量方法采用外标法,结果见表 2。可见儿茶素的量以王朝最高(0.701 4 mg/L),五女山冰红次之(0.224 2 mg/L),通化最低(0.002 7 mg/L)。表儿茶素的量以长城 2000 最高(0.153 2 mg/L),王朝次之(0.038 6 mg/L),长城 1997 最低(0.010 4 mg/L)。白藜芦醇的量以长城最高(0.893 9 mg/L),王朝次之(0.634 1 mg/L),通化最低(0.036 5 mg/L)。

2.2 原花青素的测定

2.2.1 标准曲线的绘制:准确称取原花青素对照品适量,加 95%乙醇制成 0.051、0.17、0.255、0.34、0.425、0.89 mg/mL 溶液,取 3 mL 置 25 mL 具塞试管中,分别加入 0.2 mL 2% NH₄Fe(SO₄)₂ [2 mg



1-儿茶素 2-表儿茶素 3-白藜芦醇
1-catchin 2-epicatchin 3-trans-resveratrol

图 1 对照品(A)和王朝葡萄酒(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and Chinese red wine (B)

$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 用 1 mol/L 盐酸定容到 100 mL] 与 6 mL 盐酸正丁醇溶液(95 mL 正丁醇加 5 mL 浓盐酸), 摇匀, 置 95 °C 水浴反应 40 min, 取出, 立即冷却, 待用。在 546 nm^[7] 测定吸光度值。以吸光度对质量浓度进行回归, 得原花青素标准曲线方程 $Y = 4.0753 X + 0.1371$, $r = 0.9998$, 结果表明原花青素在 0.051 ~ 0.89 mg 与吸光度的线性关系良好。

2.2.2 供试品溶液的制备: 精取酒样 5 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 用 95% 乙醇稀释至刻度。取 3 mL 稀释的酒样于 25 mL 具塞试管中, 按照标准曲线的绘制项下方法处理, 即得。

2.2.3 精密度试验: 精密称取稀释后的酒样 3 mL, 连续测定 5 次吸光度值。结果显示原花青素吸光度值的 RSD 为 0.05%。

2.2.4 重现性试验: 精密称取酒样共 5 份, 制备供试品溶液, 测定吸光度。结果原花青素吸光度的 RSD 为 0.2%。

2.2.5 稳定性试验: 分别在 0、4、8、12、24 h 精密吸取稀释后的酒样, 测定吸光度。结果原花青素吸光度的 RSD 为 0.5%。表明在 24 h 内供试品溶液稳定。

2.2.6 回收率试验: 取酒样 5 份, 分别加入 1 mg 原花青素对照品, 制备供试品溶液, 测定, 结果平均回收率为 101.31%, RSD 为 2.7%。

2.2.7 样品测定: 取各样品, 制备供试品溶液, 进样测定, 将结果带入原花青素标准曲线方程, 计算, 结果见表 2。由测定结果可以看出, 长城 1999 年解百那干红葡萄酒中原花青素的量最高, 长城 2000 年解百那干红葡萄酒中的量次之, 长城 1998 年解百纳干红葡萄酒中原花青素的量最低。

3 讨论

干红葡萄酒中所含儿茶素、表儿茶素和白藜芦醇 3 种酚类物质以儿茶素与表儿茶素的量较高, 分

表 2 干红葡萄酒中儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇和原花青素的测定结果

Table 2 Determination of catechin, epicatechin, resveratrol, and procyanidine in Chinese red wine

| 样品 | 儿茶素/ (mg · L ⁻¹) | 表儿茶素/ (mg · L ⁻¹) | 白藜芦醇/ (mg · L ⁻¹) | 原花青素/ (mg · L ⁻¹) |
|---------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 长城 1997 | 12.00 | 1.04 | 0.238 9 | 2.332 |
| 长城 1998 | 未测到 | 未测到 | 0.198 0 | 0.309 |
| 长城 1999 | 10.06 | 1.56 | 0.605 0 | 3.111 |
| 长城 2000 | 13.14 | 15.32 | 0.441 1 | 2.829 |
| 长城 2001 | 11.46 | 2.70 | 0.448 1 | 2.476 |
| 长城 2002 | 12.31 | 1.75 | 0.416 0 | 2.502 |
| 王朝 | 70.14 | 3.86 | 0.634 1 | 2.807 |
| 张裕 2003 | 14.04 | 3.44 | 0.618 1 | 2.487 |
| 张裕 2001 | 10.35 | 2.67 | 0.554 8 | 2.357 |
| 长城 | 3.96 | 未测到 | 0.893 9 | 1.657 |
| 通化 | 0.27 | 未测到 | 0.036 5 | 0.734 |
| 五女山冰红 | 22.42 | 2.97 | 0.507 6 | 1.862 |

别平均为 16.377、3.923 mg/L, 白藜芦醇的量较低, 平均为 0.466 mg/L。其量多少基本与价格成正比。国外报道显示, 干红葡萄酒中 3 种酚类物质中儿茶素的水平最高^[8], 与本研究结果相同, 表明中国产干红葡萄酒品质与国外干红葡萄酒品质相近。

近年来, 干红葡萄酒的保健作用越来越被人们所重视。本研究采用 HPLC 法对干红葡萄酒中活性成分白藜芦醇、儿茶素与表儿茶素进行了比较分析, 发现白藜芦醇在中国干红葡萄酒中普遍存在, 充分说明了中国干红葡萄酒的品质, 初步证明干红葡萄酒的预防心血管疾病、防治动脉粥样硬化等功效与此有关, 也为人们饮用干红葡萄酒对人体的有益作用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 李 华, 杨永锋, 郭明浩, 等. 影响干红葡萄酒感官质量的因素分析[J]. 生物数学学报, 2005, 20(2): 223-228.
- [2] Shang J. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(6): 698-706.
- [3] Carsten R E. Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells [J]. *Radiat Res*, 2008, 169(6): 633-638.
- [4] Dani C. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Agric Food Chem*, 2008, 20:
- [5] Ngoc T M. Lipoygenase inhibitory constituents from rhu-barb [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(5): 598-605.
- [6] 丁平平, 李延芳, 宋 航, 等. 儿茶素单体的分析方法比较[J]. 四川化工, 2005, 8(4): 38-42.
- [7] 奚洪民, 邹宪芝, 刘进邦, 等. 葡萄籽中低聚原花青素研究进展[J]. 化学世界, 2005(12): 759-763.
- [8] G ü b ü. O Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection [J]. *Food Chem*, 2007, 100(2): 518-525.