

# 同步荧光法测定红葡萄酒中白藜芦醇含量

张寒俊, 吴 波

(武汉工业学院湖北省农产品加工与转化重点实验室分析测试中心, 湖北 武汉 430023)

**摘要:** 建立了一种应用同步荧光检测红葡萄酒中白藜芦醇的新方法, 系统研究了检测条件对白藜芦醇荧光强度的影响。该方法的回归方程为  $\text{Int}(\text{荧光强度}) = 19.70 \times \text{Conc}(\text{浓度 } \mu\text{g/mL}) + 13.98$ , 相关系数  $r = 0.9987$ 。白藜芦醇产生的荧光强度与浓度在  $0 \sim 1.96 \times 10^{-5} \text{mol/L}$  的范围内具有良好的线性关系, 检测限为  $8.14 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 。

**关键词:** 分析检测; 红葡萄酒; 同步荧光光谱; 白藜芦醇

中图分类号: TS262.6; O657.3 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286(2006) 12- 0112- 02

## Determination of Resveratrol Content in Red Wine by Synchronous Fluorometry

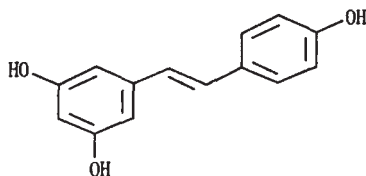
ZHANG Han-jun and WU Bo

(Agricultural Products Processing & Conversion Key Lab of Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

**Abstract:** A new method was set up to determine resveratrol content in red wine by the use of synchronous fluorometry. The effects of determination conditions on resveratrol fluorescence intensity were studied. The regression equation was  $\text{Int} = 19.70\text{Conc}(\mu\text{g/mL}) + 13.98$  and  $r = 0.9987$ . The linear relationship between the fluorescence intensity and the concentration of resveratrol was good in the range of  $0 \sim 1.96 \times 10^{-5} \text{mol/L}$  and the detection limit was  $8.14 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ .

**Key words:** analysis and determination; red wine; synchronous fluorometry; resveratrol

白藜芦醇在中国常被称为葡萄皮提取物, 其化学名称为 3,4',5'-三羟基二苯乙烯, 又名芪三酚, 化学结构式为:



分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ , 相对分子质量为 228.2, 具有荧光特征, 是一种重要的植物抗毒素和抗氧化剂。它在很多食物中存在, 如葡萄、桑葚和花生等。葡萄酒中都存在白藜芦醇, 红葡萄酒中含量较高。现代药理学实验证明, 白藜芦醇具有抗菌消炎、降血脂、预防心血管病、抗肿瘤、抑制血小板活性的作用<sup>[1]</sup>, 并可通过保护细胞线粒体中的 DNA(脱氧核糖核酸)免遭化学损害而发挥延缓衰老功效。

白藜芦醇的常用检测方法有 HPLC<sup>[2]</sup>、GC-MS<sup>[3]</sup>、薄层扫描<sup>[4]</sup>、紫外分光光度法<sup>[5]</sup>等, HPLC 法实验结果准确、精度高, 但步骤繁琐、耗时长、成本高; GC-MS 法检测样品需进行衍生化处理; 紫外分光法虽然操作简单、成本低, 但检测误差较大。本文采用同步荧光分析法检测红

葡萄酒中白藜芦醇的含量, 国内尚未见报道。研究表明, 该检测方法操作简便、成本低、快速、检测结果准确, 可广泛应用于白藜芦醇的实验研究和工业生产过程。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与仪器设备

白藜芦醇标准溶液: 采用购自 Sigma 公司的白藜芦醇标准品(批号 501-36-0), 用乙醇配制成  $96 \mu\text{g/mL}$  的标准溶液, 储于棕色瓶中备用; 实验室用水为双重蒸馏水;  $\text{AlCl}_3$  等试剂均为分析纯, 缓冲溶液按 GB603-88 和 GB604-88 进行配制。

Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国 Varian 公司); RE52CS 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 80-2 离心沉淀器(江苏省金坛市医疗仪器厂); LD5-10 型离心机(北京医用离心机厂); ALPHA2-4 型冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司); 奥立龙 868 型酸度计(美国奥立龙公司); KMY-500 型电热鼓风干燥器(武汉市武昌实验仪器厂)。

#### 1.2 测定方法

##### 1.2.1 样品工作溶液的配制

收稿日期: 2006-09-01

作者简介: 张寒俊(1975-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事仪器分析课程的教学及相关的科研检测工作。

将市售红葡萄酒 500 mL 减压浓缩后, 经冷冻干燥, 乙醇溶解, 离心分离, 上清液用乙醇稀释定容于 100 mL 容量瓶中。再取 1 mL 加入 25 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 50 g/L 的  $\text{AlCl}_3$  溶液, 然后用乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 40 min, 待测定。

### 1.2.2 白藜芦醇标准溶液的配制

分别移取白藜芦醇标准溶液 0.0 mL, 0.1 mL, 0.3 mL, 0.5 mL, 0.7 mL 和 0.9 mL 加入 25 mL 容量瓶中, 各自加入 1 mL 50 g/L 的  $\text{AlCl}_3$  溶液, 用乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 40 min, 待测定。

### 1.2.3 测定

在激发和发射光谱狭缝宽度均为 5.0 nm,  $\lambda = 30$  nm 的条件下进行同步荧光扫描, 测定标准工作溶液中白藜芦醇的荧光强度, 以荧光强度对相应的浓度作图, 绘制标准工作曲线, 然后在上述相同的条件下测定样品中白藜芦醇的荧光强度, 再用回归方程求取含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光化合物的激发及发射光谱

在荧光分光光度计上选择激发及发射光谱狭缝宽度均为 5.0 nm, 对荧光化合物的激发与发射光谱进行扫描。所得激发和发射光谱见图 1。其激发光谱的最大峰值在 346 nm 处, 为最大激发波长; 384 nm 激发峰为溶剂瑞利散射光, 可从空白液激发光谱中得到验证。其发射光谱的最大峰值在 384 nm 处, 为最大发射波长。

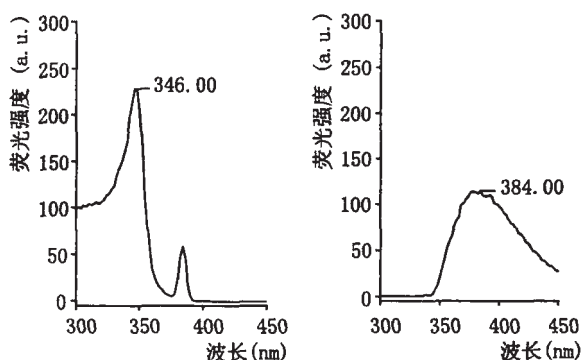


图 1 白藜芦醇的激发与发射光谱

### 2.2 荧光化合物的同步荧光光谱

根据白藜芦醇的激发和发射光谱峰值, 分别选择不同的  $\lambda$  (10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm 和 50 nm) 进行同步扫描可知, 当  $\lambda = 30$  nm 时, 其同步荧光光谱峰值最大, 灵敏度高, 结果见图 2。选用同步荧光检测可简化谱图, 提高分辨率。

### 2.3 测定条件的选择

#### 2.3.1 $\text{AlCl}_3$ 的加入量

分别取 1 mL 标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 各自加入 50 g/L 的  $\text{AlCl}_3$  溶液 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL

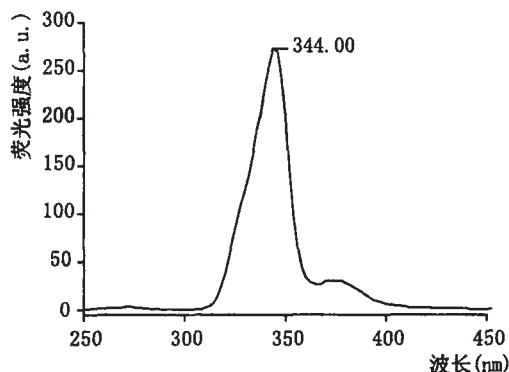


图 2 白藜芦醇的同步荧光光谱

和 5 mL, 用乙醇定容至刻度。考察  $\text{AlCl}_3$  的加入量对荧光强度的影响。结果表明, 加入 1 mL 50 g/L 的  $\text{AlCl}_3$  溶液荧光强度最大。

#### 2.3.2 溶液酸度的影响

分别取 1 mL 标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 50 g/L 的  $\text{AlCl}_3$  溶液, 再各自加入 1 mL pH 值为 pH2, pH4, pH6, pH8, pH10 和 pH12 的缓冲溶液, 用乙醇定容至刻度。实验结果表明, 样品中不加入缓冲溶液时, 荧光强度最大。为此, 本实验选择不加缓冲溶液。

#### 2.3.3 静置时间对荧光强度的影响

按实验方法配制的溶液采用静置不同的时间测定荧光强度, 每隔 20 min 测定一次, 考察溶液的荧光强度随时间变化的情况。实验结果表明, 溶液在静置 40 min 后荧光强度变化较小, 并在 2 h 内保持稳定。为此, 本实验选择溶液静置 40 min 进行荧光测定。

### 2.4 标准曲线及方法检出限

实验表明, 在  $0 \sim 1.96 \times 10^{-5}$  mol/L 的范围内白藜芦醇荧光强度与其浓度具有良好的线性关系, 其回归方程为  $\ln(\text{荧光强度}) = 19.70 \times \text{Conc}(\text{浓度 } \mu\text{g/mL}) + 13.98$ , 相关系数  $r = 0.9987$ , 说明荧光强度与相应的浓度线性显著相关。空白对照液进行 11 次平行测定, 根据  $3 \sigma/N$  计算, 此方法的检出限为  $8.14 \times 10^{-10}$  mol/L。

### 2.5 样品测定及回收率实验

按实验方法测定红葡萄酒中的白藜芦醇, 并对样品溶液进行平行测定, 其结果见表 1。

表 1 红葡萄酒中白藜芦醇含量的测定结果

红葡萄酒	测定值 (%)			平均值 (%)	平均偏差 (%)
1	0.304	0.302	0.305	0.304	0.98
2	0.344	0.345	0.340	0.343	1.75

为检验本方法, 在样品溶液中加入白藜芦醇标样进行回收率实验, 其结果见表 2。由表 2 可知, 样品溶液的加标回收率在 96.8% ~ 97.9% 之间。

(下转第 116 页)

质谱实验条件: EI 源电子能量 70 eV, 电子倍增器电压 1650 V, 质量扫描范围: 30 ~ 550 AMU, 离子源温度 230 , 四极杆温度 130 , 对采集到的质谱图利用 Nist 02 谱库进行检索。

## 2 结果与分析

### 2.1 干红枣酒的香味成分分析

按照上述气-质实验条件, 对红枣酒样品的同时蒸馏萃取液进行了 GC-MS 分析, 其总离子流色谱图(TIC) 见图 1。

化合物的定量按峰面积归一化法计算各峰面积的相对含量。香味成分分析根据 GC-MS 联用所得质谱信息经计算机用 Nist 02 MS 数据库检索, 确认了其中 49 种组分, 若按峰面积计算所鉴定成分的含量占总挥发性成分的 96.64%, 其中醇类有 7 种, 占总面积的 73.38%; 酯类和内酯种类有 18 种, 占总面积的 16.98%; 其余物质为有机酸、醛类和酮类等, 结果见表 1。

从表 1 可看出, 红枣酒的香味成分主要为: 异戊醇(34.04%)、-苯乙醇(33.02%)、乳酸乙酯(9.48%)、异丁醇(5.68%)、丁二酸二乙酯(2.60%)、乙酸苯乙酯(1.48%) 等成分。这些香味成分对香气的贡献为: 异戊醇具有酒香和果香; -苯乙醇具有青甜玫瑰的气息, 香气柔和而不持久; 乳酸乙酯具有微甜香的令人愉快的香气; 乙酸苯乙酯具有蜜样的花香香气; 异丁醇具有温和的甜香; 丁二酸二乙酯具有微弱的愉快而温和的果香味。相对含量较低的一些化合物在干红枣酒总体香气构成中也有不可忽视的作用, 如辛酸乙酯具有令人愉快的花果香

气; 庚酸乙酯具有梨的酒香、果香; 糠醛则具有谷物香气等。分析鉴定的干红枣酒香气成分与有关大枣香气成分分析的文献<sup>[5-6]</sup>相比, 其香味物质较多, 尤其 -苯乙醇, 丁二酸二乙酯、乳酸乙酯、乙酸苯乙酯等香气成分含量明显增加, 这些香味物质对产品的香气有较大的贡献, 从香气评价来看, 该干红枣酒既具有浓郁的枣香香气又增加了酿香、果香, 酒体醇厚、协调、丰满、肥硕、风格典型。

### 2.2 红枣酒的感官质量

色泽: 枣红色或红宝石色;

透明度: 澄清透明;

香气: 具有浓郁的大枣香气、酒香宜人、枣香与酒香协调;

口味风格: 酒体醇厚、协调、丰满、肥硕、风格典型。

### 参考文献:

- [1] 王军,张宝善.红枣的营养成分及功能研究概况[J].食品研究与开发,2003,24(2): 68- 72.
- [2] 袁亚红,高振鹏.我国红枣的产业化开发[J].西北农林科技大学学报,2002,30(12): 95- 98.
- [3] 郑佩,林勤宝,丁霄霖.枣汁提取方法比较及对枣酒品质的影响[J].酿酒科技,2006, (3): 24- 27.
- [4] 张宝善,陈锦屏,杨莉,等.红枣酒发酵工艺研究[J].中国农业科学,2004, 37(1):112- 118.
- [5] 邹建凯.沧州产大枣香气成分研究[J].香料香精化妆品, 1996, (4):8, 22.
- [6] 穆启运,陈锦屏,张宝善.红枣挥发性芳香物的气相色谱- 质谱分析[J].农业工程学报,1999,15(3):252- 255.

(上接第 113 页)

表 2 样品回收率实验结果

红葡萄酒	原浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	测定值 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	回收率 (%)
1	4.25	1.92	6.13	97.9
2	4.11	1.92	5.98	97.4
3	2.85	0.96	3.78	96.9
4	2.57	0.96	3.50	96.8

## 3 结论

研究表明, 采用同步荧光分析法检测红葡萄酒中白藜芦醇含量的回归方程为  $\text{Int}(\text{荧光强度}) = 19.70 \times \text{Conc}(\text{浓度 } \mu\text{g}/\text{mL}) + 13.98$ , 相关系数  $r = 0.9987$ , 检出限为  $8.14 \times 10^{-10} \text{mol}/\text{L}$ , 加标回收率在 96.8% ~ 97.9% 之间。实验中  $\text{Al}^{3+}$  与白藜芦醇形成络合物, 静置 40 min 有利于络合反应进行, 增强了荧光强度的稳定性。该方法操作简单, 成本低, 并且准确度高, 重现性好, 检测结果可靠, 可广泛应用于白藜芦醇的实验研究和生产过程中的检

测。

### 参考文献:

- [1] 冯永江,许实波.白藜芦醇药理作用研究进展[J].国外医药(植物分册),1996,11(4): 155- 157.
- [2] 卢汝梅,陈燕军,等.HPLC 法测定国产葡萄中白藜芦醇的含量[J].天然产物研究与开发,2002,14(2): 40- 42.
- [3] 吴平谷,丁刚强.葡萄酒中游离白藜芦醇的气相色谱质谱测定法[J].营养学报,2003,25(2): 145- 148.
- [4] 五永山,沈志君,等.丙肝宁颗粒中白藜芦醇的含量测定[J].南京中医药大学学报,1998,14(6): 340- 358.
- [5] 童平,唐盈.中药虎杖中白藜芦醇含量测定的研究[J].中草药,1987,21(11): 16- 17.
- [6] 李小妹,李娜,等.白藜芦醇低聚体类似物的光谱特征,生源与生物活性[J].药学报,2002,37(1): 69- 74.
- [7] 白杨,潘钧丽.白藜芦醇与白藜芦醇的研究进展[J].中药材,2004,27(1): 55- 58.
- [8] 夏锦尧.实用荧光分析法[M].北京:中国人民公安大学出版社,1993.