

衍生化气相色谱 – 质谱联用法测定葡萄酒中的白藜芦醇含量

GCMS-122

摘要：采用乙酸乙酯对葡萄酒中的白藜芦醇进行萃取后，利用苯基三甲基氯化铵和四甲基氢氧化铵混合物将白藜芦醇衍生生成白藜芦醇三甲醚，并通过气相色谱质谱联用仪进行分析。标准曲线在 0.5~10 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内，相关系数为 0.9999，平行测定 6 次白藜芦醇衍生物峰面积 RSD 在 7.7 %。方法操作简单，实用性强，可以用于葡萄酒中白藜芦醇含量的快速测定。

关键词：葡萄酒 白藜芦醇 气相色谱质谱联用仪

白藜芦醇是一种生物性很强的天然多酚类物质，是肿瘤的化学预防剂，也是对降低血小板聚集，预防和治疗动脉粥样硬化、心脑血管疾病的化学预防剂。上世纪 90 年代，国际上普遍发现白藜芦醇大量存在于红葡萄酒中。实验研究已经证实其对心血管疾病和癌症的有益作用，被列为“100 种最热门有效的抗衰老物质”之一。

目前检测葡萄酒中白藜芦醇一般采用高效液相色谱法或气质联用色谱法，对于气质联用色谱法通常采用 BSTFA(双三甲基硅基三氟乙酰胺)和 1%TMCS(三甲基氯硅烷)作为衍生剂，要求样品前处理非常严格。因此本文采用乙酸乙酯对葡萄酒中的白藜芦醇进行萃取，利用苯基三甲基氯化铵和四甲基氢氧化铵混合物将白藜芦醇衍生生成白藜芦醇三甲醚，进行 GCMS 分析。通过更换衍生化试剂，简化了样品前处理步骤，提高了实验效率。该方法的线性、精密度良好，适用于葡萄酒中白藜芦醇含量的快速测定。

实验部分

1.1 仪器

岛津公司 GCMS-QP 2010 Ultra 气质联用仪
恒温烘箱
涡旋混合仪

1.2 分析条件

色谱柱：Rtx-5 ms 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm
柱温程序：50 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)_30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _280 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)
_10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _300 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)

进样口温度：280 $^{\circ}\text{C}$

载气控制方式：恒线速度

线速度：36 cm/sec

进样方式：分流

分流比：10:1

进样量：1.0 μL

离子源温度：250 $^{\circ}\text{C}$

色谱质谱接口温度：260 $^{\circ}\text{C}$

采集方式：选择离子模式 (SIM)

目标离子：270

参考离子：255, 239, 269

2. 样品前处理

2.1 衍生化试剂配置：

准确称取 175 mg 苯基三甲基氯化铵于 10 mL 容量瓶中，加入 5.0 mL 四甲基氢氧化铵 (25%) 甲醇溶液，用色谱甲醇定容到刻度。此溶液相当于含苯基三甲基氯化铵 (TMPAH) 甲基化衍生试剂浓度为 0.1 mol/L。

2.2 葡萄酒中白藜芦醇的提取：

准确取 5.0 mL 葡萄酒，加 1.0 g 氯化钠溶解后，再加 5.0 mL 乙酸乙酯涡旋振荡萃取 3 分钟。静置分层后，取 1.0 mL 上清液到样品瓶中，于 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中蒸干。

2.3 样品溶液衍生化：

加入 0.5 mL 衍生化试剂，加盖密封振摇使样品溶解，在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下加热衍生化 40 min，取 1.0 μL 上机测试。

结果与讨论

3.1 白藜芦醇衍生物色谱图

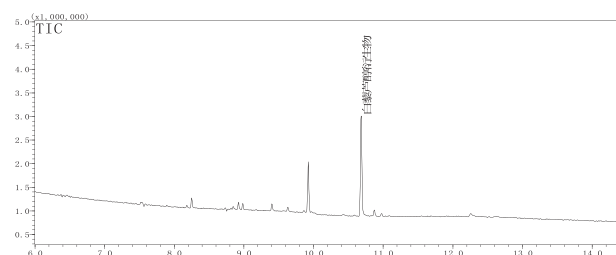


图 1 白藜芦醇衍生物的 TIC 图

3.2 标准曲线

3.2.1 白藜芦醇标准储备液配制：

准确称取 10.0 mg 白藜芦醇标准品于 10 mL 棕色容量瓶中，用色谱纯甲醇溶解并定容至刻度，作为储备液，-4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

3.2.2 白藜芦醇标准工作曲线:

用甲醇稀释成 0.5、1.0、2.0、5.0、10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列浓度 (现配现用), 分别取上述白藜芦醇标准溶液各 1.0 mL, 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中蒸干, 按 2.3 步骤进行衍生化。以 SIM 方式采集, 建立标准工作曲线, 如图 2 所示, 以三倍噪音计算白藜芦醇衍生物的检出限, 以十倍噪音计算白藜芦醇衍生物的定量限, 白藜芦醇衍生物相关系数、检出限及定量限结果见表 1。

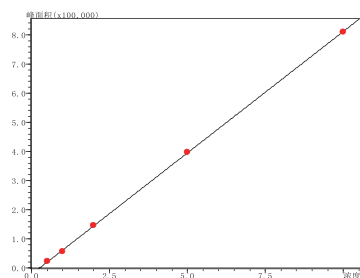


图 2 白藜芦醇衍生物标准曲线

表 1 白藜芦醇衍生物的相关系数、检出限及定量限

化合物名称	R	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
白藜芦醇三甲醚	0.99995	0.0054	0.018

3.3 重复性实验

取浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的白藜芦醇标准溶液衍生化后, 平行进样测定 6 次, 进行重复性实验, 得到保留时间及峰面积重复性结果见表 2。

表 2 白藜芦醇衍生物保留时间和峰面积重复性结果

项目	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
峰面积	43219	39371	47796	48807	46994	45859	7.7
保留时间 (min)	10.695	10.697	10.696	10.697	10.699	10.699	0.015

3.4 回收率测试

向某葡萄酒样品中添加白藜芦醇, 加标浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$, 按前述的前处理方法萃取及衍生化处理, 进行加标回收率测定, 该葡萄酒样品色谱图见图 3。回收率测试结果见表 3。

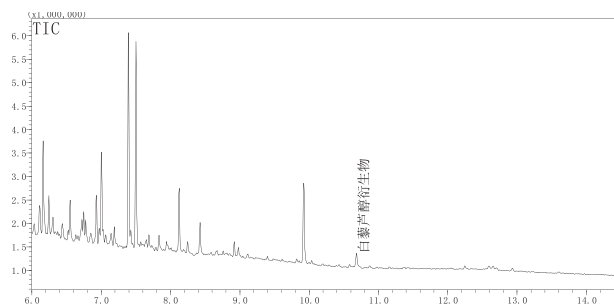


图 3 某葡萄酒样品的 TIC 图

表 3 回收率测试结果

序列号	样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	实测浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1		7.49	113.0	
2	1.84	7.57	114.6	120.0
3		8.25	128.2	
4		8.05	124.2	

结论

本文利用乙酸乙酯萃取葡萄酒中的白藜芦醇, 通过苯基三甲氯化铵和四甲基氢氧化铵衍生化, 建立了葡萄酒中白藜芦醇的气相色谱质谱联用检测方法。该方法对白藜芦醇衍生物测定的相对标准偏差为 7.7%, 白藜芦醇衍生物的最低检出限为 0.005 $\mu\text{g/mL}$ 。该方法操作简单、灵敏度高、重复性好、准确可靠、实用性强, 完全满足国标 GB/T 15038-2006 葡萄酒、果酒中白藜芦醇的检测要求。