

# 葡萄白藜芦醇提取和 HPLC 定量测定适宜条件的研究

李晓东<sup>1,2</sup> 李绍华<sup>2\*</sup> 闫树堂<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; <sup>2</sup> 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘要:** 研究了浸提溶剂种类、浸提方式、浸提温度和浸提时间对葡萄果皮和种子白藜芦醇 (Res) 提取的效果。结果表明, 果皮采用乙酸乙酯浸提溶剂, 研磨后 25 ℃ 下浸提 24 h, 种子采用甲醇浸提溶剂, 研磨后 25 ℃ 下浸提 48 h, Res 浸提效果最好。上述提取条件下, 采用高效液相色谱测定 ‘北醇’ 葡萄果皮和种子中的 Res 含量分别为  $3.51 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  FM 和  $8.81 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  FM。反式 Res 在检测波长为 306 nm 条件下, 采用等浓淋洗能很好地被检测到。

**关键词:** 白藜芦醇; 葡萄; 提取; 测定; HPLC

**中图分类号:** S 663.1; Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 04-0836-03

## Optimization for Extraction and Determination of Resveratrol in Grapes by HPLC

Li Xiaodong<sup>1,2</sup>, Li Shaohua<sup>2\*</sup>, and Yan Shutang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; <sup>2</sup> Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** The study focused on the extraction procedure, including solvent type, extracting way, temperature and duration, and the determination of resveratrol in grape skins and seeds by HPLC. The results showed that the optimum condition for the extraction of resveratrol in grape skins was extracted in ethyl acetate for 24 hour at 25 ℃ after grinding and the optimum condition for the grinded seeds was extracted in methanol for 48 hours at 25 ℃, and for the grinded seeds. The highest Res content determined by HPLC in ‘Beichun’ grape was  $3.51 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  FM and  $8.81 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  FM in skins and seeds under the above conditions, respectively. Res can be determined by HPLC under isocratic with wave length of 306 nm.

**Key words:** Resveratrol; Grapes; Extraction; Determination; HPLC

## 1 目的、材料与方法

白藜芦醇 (Res), 化学名称为芪三酚 (3, 4', 5-trihydroxystilbene), 具有较强的抗氧化功能, 在抗癌、防治心血管疾病等方面具有重要作用<sup>[1,2]</sup>。葡萄皮、籽中富含 Res, 是具有重要开发价值的潜在天然产物<sup>[3]</sup>。Res 定量测定主要有高效液相色谱法 (HPLC)、气谱—质谱法 (GC/MS)、毛细管电泳法 (CE) 等<sup>[4]</sup>, 其中 HPLC 具有高效、快速、高灵敏度、操作简便等优点, 是 Res 定量测定中应用最为广泛的方法<sup>[3,5,6]</sup>。HPLC 定量测定葡萄组织中 Res 含量的色谱条件已得到认同, 但葡萄组织中的 Res 浸提, 不同研究者采用不同的有机溶剂, 如 80% 乙醇<sup>[5]</sup>, 乙酸乙酯<sup>[3]</sup>, 甲醇<sup>[6]</sup>等, 但尚无不同溶剂浸提葡萄组织中 Res 含量的比较研究。此外浸提时的温度及时间长短也对 Res 的提取量有一定影响。本文报道了以 ‘北醇’ 葡萄的果皮和种子为试材, 进行溶剂种类、浸提的方式、温度及时间对 Res 提取效果的比较结果, 以期对葡萄组织中 HPLC 定量测定 Res 含量提供可靠的技术和方法。

收稿日期: 2005 - 08 - 16; 修回日期: 2005 - 11 - 02

基金项目: 中国科学院重要方向性项目 (KSCX2-SW-123)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: shhli@ibcas.ac.cn)

高效液相色谱采用 Summit™ HPLC系统 (Dionex P680泵), 检测器: PDA-100二极管阵列检测器; 色谱柱: Inertsil ODS-3 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm I. D.); 柱温: 25 ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ ; 流速: 0.60 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。通过 PDA在 190 ~ 380 nm 范围内对标准反式 Res (Signa公司) 进行光谱扫描, 获得 Res的光谱图, 确定其适宜的检测波长。在已确定的适宜检测波长条件下, 比较研究了等浓淋洗和梯度淋洗对 Res检测结果的影响。梯度淋洗色谱条件为: 二元梯度洗脱, CH<sub>3</sub>CN H<sub>2</sub>O (0 min, 10 90; 10 min, 50 50; 15 min, 50 50; 20 min, 10 90; 25 min, 10 90)。等浓淋洗色谱条件: CH<sub>3</sub>CN H<sub>2</sub>O (0 ~ 18 min, 40 60)。

根据前面的研究结果, 采用等浓淋洗色谱条件, 用 4种不同的浸提溶剂 (100%甲醇, 100%乙酸乙酯, 80%乙醇, 50%甲醇 + 50%乙酸乙酯), 种子采用浸泡和研磨浸提方式, 果皮只采用研磨浸提方式, 在两种不同温度条件 (4 和 25 ) 和 4种不同浸提时间 (12, 24, 36和 48 h) 下对比研究了 ‘北醇’ 果皮和种子中 Res提取效率 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$ ) 的差异。采用 L<sub>16</sub> (4<sup>5</sup>) 正交试验设计, 3次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 Res的适宜检测波长

通过 PDA在 190 ~ 380 nm 范围内对标准反式 Res进行光谱扫描, 得到 Res光谱图 (图 1)。Res吸收光谱存在肩峰结构, 在 306.2 nm 和 318.6 nm附近有较大吸收峰, 且呈现左肩峰较高右肩峰较低结构。因此, 306 nm为 Res的适宜检测波长。

### 2.2 等浓淋洗和梯度淋洗对 Res定量检测的影响

等浓淋洗和梯度淋洗均能够定量检测 Res, 但获得的 HPLC图谱质量存在差异 (图 2)。等浓淋洗测试时间短, 样品出峰良好, 基本无杂质干扰峰, 能快速方便地定量 Res, 优于梯度淋洗。

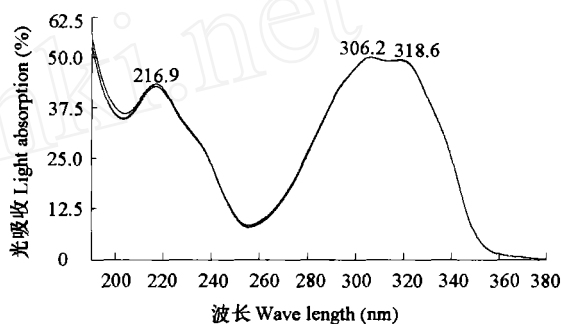


图 1 Res标样的 190 ~ 380 nm 光谱扫描图

Fig 1 190 - 380 nm scanning spectrogram of resveratrol standard

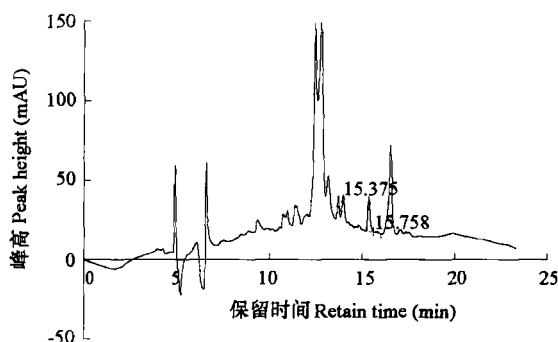
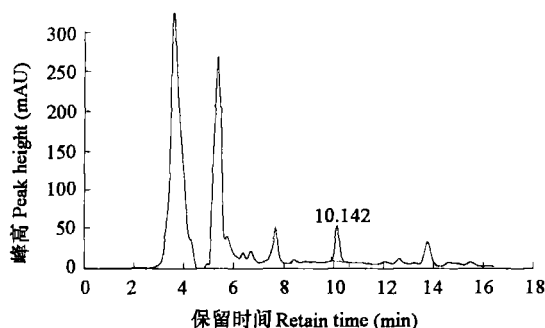


图 2 等浓淋洗 (左) 和梯度淋洗 (右) 样品 Res HPLC图谱

Fig 2 Sample Res HPLC map under isocratic (left) and gradient (right) rinse

### 2.3 提取条件对葡萄果皮和种子 Res含量的影响

如表 1所示, 浸提溶剂的种类、浸提温度、浸提时间对葡萄果皮中 Res的提取效果是: 浸提溶剂 (A) > 浸提时间 (D) > 浸提温度 (B), 最优处理组合是 A<sub>2</sub>B<sub>4</sub>D<sub>2</sub>, 即用乙酸乙酯做浸提溶剂, 在 25 条件下浸提 24 h, 提取量最高, 达 3.51  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$ 。对葡萄种子中 Res的提取效果是: 浸提方式 (C) > 浸提温度 (B) > 浸提溶剂 (A) > 浸提时间 (D), 最优处理组合是 A<sub>1</sub>B<sub>4</sub>C<sub>4</sub>D<sub>4</sub>, 即用甲

醇做浸提溶剂，采取研磨浸提方式，在 25 条件下浸提 48 h，提取量最高，达  $8.81 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$ 。各因素间的差异均达显著或极显著水平。

表 1 ‘北醇’葡萄果皮和种子 Res提取试验结果  
Table 1 Res extraction experimental results of grape skins and seeds

处理 Treat- ment	果皮 Skins			Res ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FM)	种子 Seeds			D 时间 Time (h)	Res ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FM)
	A 溶剂 Solvent	B 温度 Tem- perature ( )	D 时间 Time (h)		A 溶剂 Solvent	B 温度 Tempera- ture ( )	C 方式 Way		
1	A <sub>1</sub> (甲醇 Methanol)	B <sub>1</sub> (4)	D <sub>1</sub> (12)	0.88	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>1</sub> (浸泡 Soaking)	D <sub>1</sub>	0.48
2	A <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> (4)	D <sub>2</sub> (24)	2.22	A <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> (浸泡 Soaking)	D <sub>2</sub>	0.25
3	A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub> (25)	D <sub>3</sub> (36)	2.39	A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> (研磨 Grinding)	D <sub>3</sub>	4.87
4	A <sub>1</sub>	B <sub>4</sub> (25)	D <sub>4</sub> (48)	1.83	A <sub>1</sub>	B <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> (研磨 Grinding)	D <sub>4</sub>	8.81
5	A <sub>2</sub> (乙酸乙酯 Ethyl acetate)	B <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	1.84	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	0.73
6	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	D <sub>4</sub>	1.75	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>4</sub>	0.68
7	A <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	2.06	A <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	D <sub>1</sub>	2.96
8	A <sub>2</sub>	B <sub>4</sub>	D <sub>2</sub>	3.51	A <sub>2</sub>	B <sub>4</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>2</sub>	3.28
9	A <sub>3</sub> (80%乙醇 80% ethanol)	B <sub>1</sub>	D <sub>4</sub>	1.89	A <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	2.47
10	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	2.25	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>4</sub>	D <sub>3</sub>	1.35
11	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	D <sub>2</sub>	2.36	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	0.58
12	A <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	D <sub>1</sub>	1.83	A <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	0.81
13	A <sub>4</sub> (50%甲醇 +50%乙酸乙酯 50% methanol +50% ethylacetate)	B <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	1.28	A <sub>4</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>4</sub>	D <sub>2</sub>	1.44
14	A <sub>4</sub>	B <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	1.73	A <sub>4</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	1.19
15	A <sub>4</sub>	B <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	1.46	A <sub>4</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>4</sub>	1.19
16	A <sub>4</sub>	B <sub>4</sub>	D <sub>3</sub>	1.32	A <sub>4</sub>	B <sub>4</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	1.16
R	0.84	0.65	0.72		2.36	2.65	2.91	1.93	

参考文献：

1 Jang M S, Cai L N, Udeani G O. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a nature product derived from grapes Science, 1997, 275 (10): 218 ~ 220

2 闫 静,王振月,刘丹宁,刘晓辉. 白藜芦醇及其苷的生物活性研究进展. 中医药学报, 2000 (2): 39 ~ 41  
Yan J, Wang Z Y, Liu D N, Liu X H. Recent advances in bioactivity of resveratrol and polydatin. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2000 (2): 39 ~ 41 (in Chinese)

3 陈 雷,韩雅珊. 葡萄不同品种和组织白藜芦醇含量的差异. 园艺学报, 1999, 26 (2): 118 ~ 119  
Chen L, Han Y S. Studies on the content of resveratrol in different cultivars and organs of grape. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26 (2): 118 ~ 119 (in Chinese)

4 孟昭仁,奚洪民,刘进帮. 白藜芦醇的提取和纯化及分析方法研究进展. 化学世界, 2002, 10: 511 ~ 513  
Meng Z R, Xi H M, Liu J B. Recent development of extraction, purification and identification of resveratrol. The World of Chemistry, 2002, 10: 511 ~ 513 (in Chinese)

5 Irena K H, Karel M, Vladim f F. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. Food Chemistry, 2004, 87 (1): 151 ~ 158

6 李景明. 葡萄采后白藜芦醇的诱导与葡萄酒中白藜芦醇的调控研究: [博士学位论文] 北京: 中国农业大学, 2003. 19 ~ 24  
Li J M. The study of resveratrol inducement in post harvest grape and regulation in wine: [Ph. D. Dissertation] Beijing: China Agricultural University, 2003. 19 ~ 24 (in Chinese)