

红酒泥成分的UPLC-Q-TOF-MS分析

於洪建¹, 李赫宇², 于滢慧², 李欢³, 吴春福^{1,4,*}

(1. 沈阳药科大学社会药学研究中心, 辽宁 沈阳 110016; 2. 天津市益倍建生物技术有限公司, 天津 300457; 3. 天津芸熙生物技术有限公司, 天津 300457; 4. 沈阳药科大学食品药学教研室, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 为了更好地综合开发利用红酒泥, 本试验采用超高效液相色谱仪联用四级杆串联飞行时间质谱仪(UPLC-Q-TOF-MS)技术, 对红酒泥中主要化学成分进行了分析及鉴定。结果表明: 经分析共鉴定出 23 种化学成分, 主要分为以下五类: 有机酸类, 酚酸类, 多酚类, 黄酮类, 以及糖苷类。

关键词: 红酒泥; 化学成分; UPLC-Q-TOF-MS; 多酚; 抗氧化

The UPLC-Q-TOF-MS Analysis of Wine Lees

YU Hong-jian¹, LI He-yu², YU Ying-hui², LI Huan³, WU Chun-fu^{1,4,*}

(1. Social Medicine Research Center of Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China; 2. Tianjin Ubasichealth Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China; 3. Tianjin Yunxi Biotech Co., Ltd., Tianjin 300457, China; 4. Food and Medicine Teaching and Research Section of Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China)

Abstract: This experiment adopts the method of UPLC-Q-TOF-MS to analyze the main ingredient in wine lees, for better comprehensive exploitation and utilization of the wine lees. The results showed that, by the analysis identified 23 kinds of chemicals, mainly divided into the following five categories including phenolic acids, polyphenols, flavonoid and glycoside.

Key words: wine lees; chemical composition; UPLC-Q-TOF-MS; polyphenol; antioxidant

红酒泥是指葡萄酒生产中产生的沉淀物质, 是葡萄酒酿造过程中的主要副产物, 其生成量约占葡萄酒产量的 4%~5%^[1-2]。在葡萄酒成熟期间, 酒泥中的酵母自溶, 形成了核苷、核苷酸、氨基酸、肽、葡聚糖、甘露蛋白等^[3-5], 不仅增加了酒的结构感和圆润度, 提高澄清度, 同时也是功能性食品中的主要营养成分^[6-7]。葡萄酒带酒泥在橡木桶中陈酿数月, 酒泥能抑制其氧化还原反应的进行, 并产生多种具有良好的抗氧化作用的有效成分^[8-9]。

超高效液相联用四级杆串联飞行时间质谱仪(UPLC-Q-TOF-MS)具有高分辨率、高灵敏度、高选择性、用时短、扫描范围广等特点, 是一种在定性分析中具

有独特优势的液质联用仪。本试验以红酒泥为原料, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对红酒泥中主要成分进行了分析, 根据化学成分的质谱信息及与对照品、相关文献数据比对, 共鉴定出 23 种化学成分, 为更好地开发利用红酒泥提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

超高效液相色谱仪: 美国 Waters 公司, 型号 ACQUITY UPLC, 配置 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱; 质谱仪: 美国 Waters 公司, 型号 Q-TOF Premier, 配有 LockSpray 离子质量校正器和电喷雾离子源(ESI), 工作站为 Masslynx 4.1; 超纯水仪: 美国 Millipore 公司, 型号 Milli-Q; 超声波仪: 美国 Branson 公司, 型号 CPX8800-C; 分析天平: 美国 Sartorius 公司, 型号 BSA224S-CW; 离心机: 德国 Hettich 公司, 型号 MIKRO 220R。

作者简介: 於洪建(1967—), 男(汉), 高级工程师, 博士, 研究方向: 植物提取物和健康食品的开发。

* 通信作者: 吴春福(1959—), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向: 中药药理。

1.2 试剂与材料

乙腈、甲醇、甲酸均为色谱级;红酒泥:由天津益倍建生物技术有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

称取 10 mg 红酒泥粉末,置于 2 mL EP 管中,加入 1 mL 75% 甲醇超声溶解 30 min (40 kHz, 500 W),冷却至室温,12 000 r/min 高速离心 15 min,取上清液以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取 4 μL 用于 UPLC-Q-TOF-MS 检测,其余滤液留作待测样品备用。

1.3.2 UPLC-Q-TOF-MS 分析

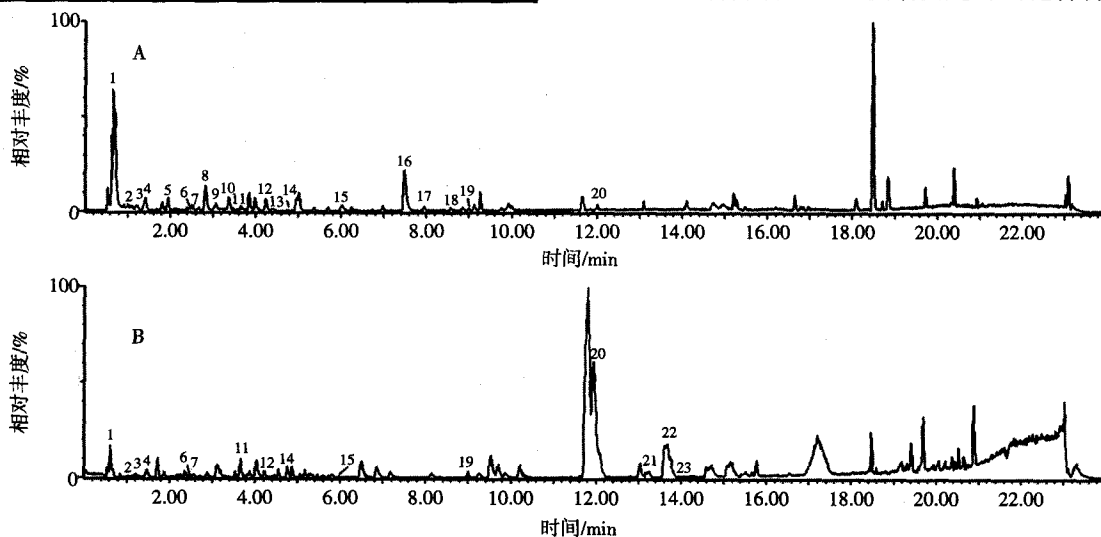
1.3.2.1 超高效液相色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 mm×100 mm);柱温 30 °C;进样量 4 μL;流动相:乙腈(A),0.1% (体积分数)甲酸水溶液(B),梯度洗脱,流动相流速为 0.4 mL/min,流动相洗脱表见表 1。

表 1 流动相洗脱表

Table 1 Mobile phase elution table

时间	流速/(mL/min)	乙腈(A)/%	0.1%甲酸-水(B)/%
0	0.400	2	98
2	0.400	13	87
5	0.400	21	79
6	0.400	25	75
8	0.400	31	69
9	0.400	37	63
11	0.400	43	57
12	0.400	49	51
21	0.400	100	0
22	0.400	100	0
23	0.400	2	98



A.负离子模式;B.正离子模式。

图 1 红酒泥 UPLC-Q-TOF-MS 分析

Fig.1 The UPLC-Q-TOF-MS analysis of wine lees

1.3.2.2 质谱条件

本试验使用 Waters Synapt G2 HDMS 质谱仪,测量采用电喷雾离子源(ESI),数据采集采用 Masslynx 4.1 工作站。

正离子模式:毛细管电压 3.0 kV;离子源温度 110 °C;锥孔电压 30 V;锥孔气流量 50 L/h;脱溶剂雾化氮气温度 350 °C;脱溶剂雾化氮气流量 600 L/h;检测器电压为 1 900 V;采样频率 0.1 s,扫描间隔延时 0.02 s;质量数检测范围 100 Da~1 500 Da;内参校准液 Lockmass 采用亮氨酸脑啡肽(LEA),内参设定为[M+H]⁺=555.293 1。

负离子模式:毛细管电压 2.5 kV;离子源温度 110 °C;锥孔电压 45 V;锥孔气流量 50 L/h;脱溶剂雾化氮气温度 350 °C;脱溶剂雾化氮气流量 600 L/h;检测器电压 1 900 V;采样频率 0.1 s,扫描间隔延时 0.02 s;质量数检测范围 100 Da~1 500 Da;内参校准液 Lockmass 采用亮氨酸脑啡肽(LEA),内参设定为[M-H]⁻=553.277 5。

2 结果与讨论

2.1 红酒泥 UPLC-Q-TOF-MS 图谱

红酒泥 UPLC-Q-TOF-MS 图谱如图 1 所示,从图中可以清晰地看出红酒泥中的各成分被很好地分离开。

2.2 红酒泥中化合物的结构鉴定

各组经 UPLC 分离后,通过四级杆飞行时间质谱(Q-TOF-MS)对红酒泥中的化学成分进行结构分析。由于不同的化学成分在不同的模式下响应度不同,因此本试验分别在正、负两种离子模式下分别对红酒泥进行分析。一级质谱测定得到化合物的[M+H]⁺

或[M-H]⁻等准分子离子峰的相关信息,通过这些物质的精确分子量,结合二级质谱中的碎片信息和相关文献数据对比,以及标准品在相同条件下的保留时间和

质谱信息,可推测化合物可能的结构式。通过上述分析方法,在红酒泥中共鉴定出 23 种化学成分,具体鉴定结果见表 2。

表 2 红酒泥中化学成分鉴定分析表

Table 2 The chemical composition analysis table of wine lees

峰号	时间/min	质荷比	离子模式	二级碎片	分子式	成分
1	0.686	150.013 3	Neg/Pos	149[M-H] ⁻ , 131[M-H-H ₂ O] ⁻ , 113[M-H-2H ₂ O] ⁻	C ₆ H ₆ O ₆	酒石酸
2	1.088	134.028 7	Neg/Pos	133[M-H] ⁻ , 116[M-H-OH] ⁻ , 88[M-H-COOH] ⁻	C ₆ H ₆ O ₅	苹果酸
3	1.216	148.029 6	Neg/Pos	147[M-H] ⁻ , 129[M-H-H ₂ O] ⁻ , 103[M-H-COO] ⁻	C ₆ H ₆ O ₂	肉桂酸
4	1.412	170.019 7	Neg/Pos	169[M-H] ⁻ , 152[M-H-OH] ⁻ , 125[M-H-COO] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸
5	1.843	154.025 8	Neg	153[M-H] ⁻ , 136[M-H-OH] ⁻ , 109[M-H-COO] ⁻	C ₆ H ₆ O ₄	原儿茶酸
6	2.447	228.086 7	Neg/Pos	227[M-H] ⁻ , 210[M-H-OH] ⁻ , 209[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	白藜芦醇
7	2.515	578.138 4	Neg/Pos	577[M-H] ⁻ , 559[M-H-H ₂ O] ⁻ , 533[M-H-CO ₂] ⁻	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素
8	2.811	290.075 3	Neg	289[M-H] ⁻ , 245[M-H-CO ₂] ⁻ , 179[M-H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁻	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素
9	3.131	180.042 3	Neg	179[M-H] ⁻ , 162[M-H-OH] ⁻ , 134[M-H-COO] ⁻	C ₆ H ₆ O ₄	咖啡酸
10	3.389	290.076 0	Neg	289[M-H] ⁻ , 271[M-H-H ₂ O] ⁻ , 245[M-H-CO ₂] ⁻	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素
11	3.611	244.073 9	Neg/Pos	243[M-H] ⁻ , 225[M-H-H ₂ O] ⁻ , 207[M-H-2H ₂ O] ⁻	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	白皮杉醇
12	4.215	198.045 3	Neg/Pos	197[M-H] ⁻ , 180[M-H-OH] ⁻ , 243[M-H+HCOOH] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	紫丁香酸
13	4.393	302.008 9	Neg	301[M-H] ⁻ , 284[M-H-OH] ⁻ , 265[M-H-2H ₂ O] ⁻	C ₁₄ H ₆ O ₈	鞣花酸
14	4.778	478.076 0	Neg/Pos	477[M-H] ⁻ , 460[M-H-OH] ⁻ , 301[M-H-C ₆ H ₆ O ₆] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸
15	5.985	318.032 7	Neg/Pos	317[M-H] ⁻ , 299[M-H-H ₂ O] ⁻ , 281[M-H-2H ₂ O] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	杨梅素
16	7.484	302.037 9	Neg	301[M-H] ⁻ , 283[M-H-H ₂ O] ⁻ , 265[M-H-2H ₂ O] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	槲皮素
17	7.963	906.270 6	Neg	905[M-H] ⁻ , 887[M-H-H ₂ O] ⁻ , 811[M-H-C ₆ H ₆ O] ⁻	C ₅₆ H ₄₂ O ₁₂	VitisinC
18	8.587	454.132 1	Neg	453[M-H] ⁻ , 435[M-H-H ₂ O] ⁻ , 409[M-H-CO ₂] ⁻	C ₂₆ H ₂₂ O ₆	trans-ε-viniferin
19	9.004	286.039 1	Neg/Pos	285[M-H] ⁻ , 268[M-H-OH] ⁻ , 249[M-H-2H ₂ O] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山奈酚
20	11.970	317.277 7	Neg/Pos	318[M+H] ⁺ , 300[M+H-H ₂ O] ⁺ , 256[M+H-CO-2OH] ⁺	C ₁₆ H ₁₃ O ₇ ⁺	矮牵牛素
21	13.318	479.265 8	Pos	480[M+H] ⁺ , 515[M+H+Cl] ⁺ , 353[M+H+Cl-Glc] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂ ⁺	Petunidin-3-O-glucoside
22	13.733	390.364 5	Pos	391[M+H] ⁺ , 373[M+H-H ₂ O] ⁺ , 229[M+H-Glc] ⁺	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	白藜芦醇-3-O-葡萄糖苷
23	14.115	463.127 9	Pos	464[M+H] ⁺ , 498[M+H+Cl] ⁺ , 302[M+H-Glc] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁ ⁺	芍药素-3-O-葡萄糖苷

以 10 号峰为例,阐述鉴定过程。由一级质谱图可知其负离子模式下质荷比(m/z)为 289.076 0,可视其为得到一个电子,即[M-H]⁻=289.076 0,因此实际测得成分分子量应为 290.076 0。根据元素组成分析可推测其化学式应为 C₁₅H₁₄O₆,理论分子量为 290.078 5,实测值为 290.076 0。分析其二级质谱图可知,分子量为 271 的碎片可视为原结构脱离一个水分子即[M-H-H₂O]⁻;分子量为 245 的碎片可视为原结构脱离一个二氧化碳即[M-H-CO₂]⁻。根据文献报道^[9]红酒泥中含有儿茶素,其相对分子质量为 290,相同质谱条件下儿茶素对照品与其裂解规律一致,因此推断 10 号峰为儿茶素。按照此方法可推断出其它物质结构。各成分具体结构见图 2。

3 结论

本试验采用 UPLC-Q-TOF-MS 对红酒泥中所含

主要化学成分进行分析,共鉴定出 23 种化学成分。经分析发现,红酒泥中的化学成分主要分为以下几类:有机酸类(酒石酸、苹果酸),酚酸类(肉桂酸、紫丁香酸、咖啡酸等),多酚类(白藜芦醇、儿茶素、白皮杉醇等),黄酮类(山奈酚、槲皮素、杨梅素等),以及糖苷类(芍药素-3-O-葡萄糖苷、白藜芦醇-3-O-葡萄糖苷、Petunidin-3-O-glucoside 等)成分。

从图谱中可以看出,儿茶素、表儿茶素、矮牵牛素、槲皮素等黄酮成分在红酒泥中含量较高,可能作为红酒泥中的主要成分。其次,红酒泥中含有大量的邻二酚羟基、间二酚羟基结构,除了槲皮素、儿茶素等成分,原花青素、白藜芦醇等也具有强还原性,这些成分可能在红酒泥的抗氧化效果中起主要作用。此外,鞣花酸是新被证实的抗衰老的明星分子 urolithin A 的前体,当其被摄入机体后可以被肠道中生存的微生物转化成为 urolithin A。而 urolithin A 的分子可以帮助调节

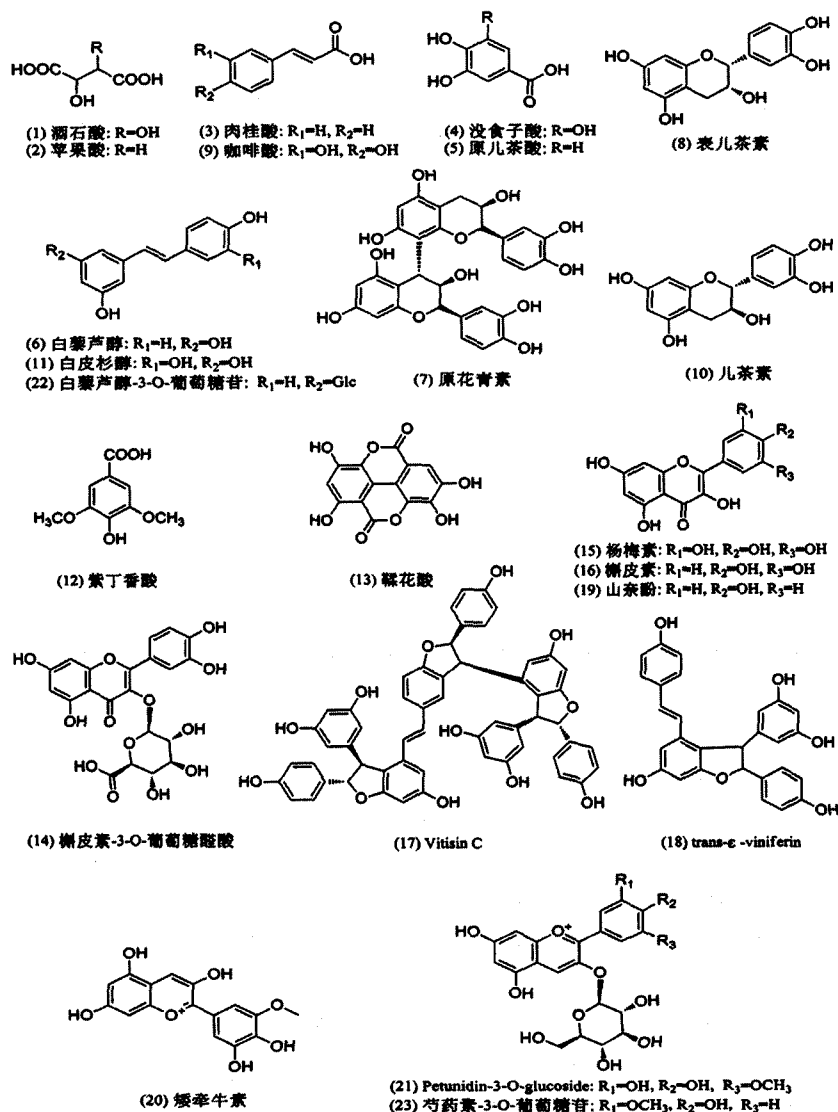


图2 红酒泥中各成分化学结构

Fig.2 The chemical structure of composition in wine lees

细胞中线粒体的功能,从而延缓机体衰老。

4 展望

随着葡萄酒产业的快速发展,我国每年会产生4万吨的葡萄酒泥,在实际生产中,大多数企业直接排放,造成资源浪费和环境污染。然而,通过上述试验对红酒泥主要化学成分的分析可知,红酒泥中富含多种对人体有益天然活性成分,如对其进行更进一步的研究开发,将其应用在化妆品,保健品以及天然药物方面,不仅可以充分利用资源、减少环境压力,还可以创造客观的经济效益。

参考文献:

[1] 高学峰,杨继红,王华.葡萄及葡萄酒生产过程中副产物的综合利用研究进展[J].食品科学,2015,36(7):289-293

[2] 郭永亮,Anthony SILVANO.现代葡萄酒陈酿工艺探讨[J].中国葡萄与葡萄酒,2012(6):51-56
[3] 杨婷,祝霞,李颖,等.葡萄酒泥酵母β-葡聚糖提取工艺条件优化[J].食品工业科技,2015,36(18):286-289
[4] 屈慧鸽,宋建强,张明.超声波辅助提取葡萄酒泥中酒石酸的工艺优化[J].食品科学,2014,35(20):83-87
[5] 杜娜,杨雪山,韩舜愈,等.超声波辅助酶法分离提取葡萄酒泥酵母SOD工艺条件的优化[J].食品科学,2014,35(2):87-90
[6] 杜娜,杨雪山,韩舜愈,等.葡萄酒泥酵母超氧化物歧化酶分离提取工艺条件优化[J].食品工业科技,2013,34(15):242-245
[7] 李双石,冀振红,李渤,等.葡萄酒废酵母胞壁多糖提取工艺的优化研究[J].酿酒科技,2014(12):85-87
[8] 李莹,苏婷婷,王战勇.葡萄加工副产品的综合利用研究[J].食品科学,2006,22(4):106-109
[9] 唐文龙.未雨绸缪——顺应行业深度调整 2012 中国葡萄酒市场回眸与展望[J].中国酒,2013(1):31-32