

高效液相色谱-二极管阵列联用技术同时检测苹果醋和甘蔗醋中 11 种酚类物质

何 洁¹, 劳水兵¹, 林 波^{2,3}, 郑凤锦², 陈赶林^{4,*}

(1. 广西农业科学院, 农产品质量安全与检测技术研究所, 广西南宁 530007;

2. 广西农业科学院, 农产品加工研究所, 广西南宁 530007;

3. 广西大学, 农学院, 广西南宁 530007;

4. 广西农业科学院, 中国农业科学院, 甘蔗研究中心, 广西南宁 530007)

摘 要: 利用高效液相色谱联合二极管阵列技术(HPLC-DAD)建立一种可以同时检测不同苹果醋和甘蔗醋中 11 种酚类物质的分析方法。使用 OMNI Hubble C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为甲醇-甲酸(100:2, v/v), B 为 10 mmol/L 磷酸氢二钾-磷酸水溶液(200:1, v/v), 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 20 μL, 梯度洗脱, 柱温为 35 ℃, 二极管阵列扫描波长范围 210~400 nm。应用本方法可以检测出不同苹果醋和甘蔗醋中香草醛、香豆素、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸、芹菜素、木犀草素、肉桂酸、山奈酚、芒柄花黄素等 11 种酚类物质, 其中甘蔗醋中富含绿原酸等 10 种酚类物质成分。本方法回收率在 84.1%~118.2% 之间, 结果准确可靠, 简单易行, 适用于各类果醋中酚类物质的分析检测。

关键词: 苹果醋, 甘蔗醋, 酚类, 高效液相色谱, 二极管阵列

Simultaneous determination of 11 phenolic compounds in apple vinegar and sugarcane vinegar by HPLC-DAD

HE Jie¹, LAO Shui-bing¹, LIN Bo^{2,3}, ZHENG Feng-jin², CHEN Gan-lin^{4,*}

(1. Research Institute of Agro-products Quality Safety and Testing Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

2. Agro-food Science and Technology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

3. College of agriculture, Guangxi University, Nanning 530007, China;

4. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Sugarcane Research Center, China Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: A new method for simultaneous determination of 11 phenolic compounds in fruit vinegar, such as different kinds of apple vinegar and sugarcane vinegar, by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) was established in this study. The phenolic compounds were separated by OMNI BOND with Hubble C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 35 ℃. The mobile phase A was MeOH-HCOOH solution (100:2, v/v) and the mobile phase B was 10 mmol/L K₂HPO₄-H₃PO₄ (200:1, v/v), eluted at a flow rate of 1.0 mL/min by a gradient elution program. The injection volume was 20 μL and the eluted components were monitored at 210~400 nm. Under the optimized condition, 11 phenolic compounds in different kinds of apple vinegar and sugarcane vinegar were separated and simultaneous determined, including coumarin, vanillin, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, apigenin, luteolin, cinnamic acid, kaempferol and formononetin, in which 10 phenolic components were found and determined in sugarcane vinegar. The recovery of the above method was 84.1%~118.2%. The method is accurate, reliable, simple, feasible and suitable for determination of phenolic compounds in fruit vinegar.

Key words: apple vinegar; sugarcane vinegar; phenolic compounds; high performance liquid chromatography; diode array detector (DAD)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)23-0210-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.23.039

收稿日期: 2017-03-10

作者简介: 何洁(1984-), 女, 硕士, 高级工程师, 主要从事食品科学与产品质量检测工作, E-mail: herb312@126.com。

* 通讯作者: 陈赶林(1980-), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事农产品加工与综合利用研究工作, E-mail: ganlin-chen@163.com。

基金项目: 国家星火计划项目(2015GA790013); 广西科技计划项目(桂科 AB16380244、桂科合 14123001-10); 南宁市西乡塘区科技计划项目(201720103); 广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科 2015YZ02); 广西农业科学院科技发展基金项目(桂农科 2017JM60)。

果醋是以水果、水果加工下脚料或浓缩水果汁(浆)为原料,经微生物发酵技术制成的液体产品^[1]。果醋饮料是果醋添加不同的辅料,经加工制成的饮料。果醋中保留了水果原有的大多数营养物质^[2],含有人体需要的碳水化合物、蛋白质、脂类、维生素、矿物质、氨基酸、有机酸和酚类物质等^[3]。果醋有缓解疲劳、促进钙吸收、预防高血压、预防心脏病和降低血清总胆固醇水平等作用^[4-5]。这些作用主要来源于有机酸、酚类物质和醇类物质的互相作用^[6]。其中酚类物质是植物次生代谢物^[7],不仅具有各种生理活性功能^[8],还影响着水果的风味和质量品质^[9]。

目前,市面上的果醋饮料以苹果醋居多,它是以苹果为原料,经酒精发酵、醋酸发酵酿制而成的一种营养丰富、风味优良的酸性保健调味品,具有苹果的典型风味与口感;风味与营养均高于普通食醋,生产的醋酸饮料可直接饮用^[10]。甘蔗醋是近年来研发的一类新型果醋产品,以新鲜糖料甘蔗为原料,经压榨、灭菌、酒精发酵、醋酸发酵、陈酿、调配等工艺加工而成的一类直接饮用醋饮料^[11-12]。高效液相色谱法是常用检测酚类物质的方法^[4-5,9],而二极管阵列联合高效液相色谱可以进行全波长扫描,得到三维光谱图,更好地对复杂基质进行分析^[13]。

本文以市面上不同品种苹果醋和甘蔗醋这两类果醋为研究对象,利用高效液相色谱-二极管阵列联用技术同时检测不同品种苹果醋及新型甘蔗醋中的11种酚类物质,为果醋产品的品质综合评价、鉴别防伪及其它果醋食品开发利用提供理论基础和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苹果醋饮料:不同品牌苹果醋饮料样品 A~F,购于超市。甘蔗醋饮料:广西农科院加工研究所研制,广西石埠乳业有限责任公司生产。酚类标准物质:绿原酸(Chlorogenic acid, HPLC ≥ 98%)、芹菜素(Apigenin, HPLC ≥ 98%)、木犀草素(Luteolin, HPLC ≥ 98%)、咖啡酸(Caffeic acid, HPLC ≥ 98%)、肉桂酸(Cinnamic acid, HPLC ≥ 98%)、香草醛(Vanillin)、对香豆酸(p-Coumaric acid, HPLC ≥ 98%)、阿魏酸(Ferulic acid, HPLC ≥ 98%)、山奈酚(Kaempferol, HPLC ≥ 98%)、芒柄花黄素(Formononetin, HPLC ≥ 98%)、香豆素(Coumarin, HPLC ≥ 98%) 均购于北京世纪奥科生物技术有限公司。磷酸氢二钾、甲醇、乙腈、甲酸、磷酸等为分析纯;超纯水,自制。

Waters 2695 液相色谱仪,配备 OMNI BOND, Hubble C₁₈ 色谱柱,(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Waters 2996 二极管阵列检测器, Waters 2489 紫外检测器 沃特世科技(上海)有限公司; GR-202 分析天平 日本 A&D 有限公司; CAHT-50L 超纯水器 北京中科智恒科技有限公司; GM-0.5A 隔膜真空泵 天津津腾实验设备有限公司; D3500S-DTH 超声波清洗器 必能信超生(上海)有限公司; F-33C pH 计 北京中农高科土壤肥料测试设备有限公司; VORTEX GENIUS 3 涡旋振荡器 德国 IKA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液制备 分别称取 5.0 mg(精确至 0.01 mg)各酚类标准物质,以甲醇转移并定容至 10 mL,制得 500 mg/L 单标准储备液。移取 500 mg/L 单标准储备液 200 μL,以甲醇定容至 1 mL,配成 100 mg/L 单标准储备液,于 -18 ℃ 保存。分别移取 500 mg/L 单标准储备液 1 mL 置于 25 mL 容量瓶中,以甲醇定容成 20 mg/L 混合标准溶液,于 -18 ℃ 保存。使用时按需要逐级稀释成 0.10、0.40、2.00、10.00、20.00 mg/L 的单标准工作液和混合标准工作液,现用现配。

1.2.2 样品制备 果醋样品经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后待测。

1.2.3 色谱条件 色谱柱: OMNI Hubble C₁₈ 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 柱温: 35 ℃; 流动相 A: 甲醇-甲酸(100: 2, v/v), 流动相 B: 10 mmol/L 磷酸氢二钾-磷酸溶液(200: 1, v/v), 流速: 1.0 mL/min; 梯度洗脱程序见表 1; 进样量: 20 μL。检测器: 采用 2998 二极管阵列检测器(检测波长: 210~400 nm)。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient eluted program of HPLC

洗脱时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	95	5
12	95	5
14	78	22
28	78	22
50	50	50
75	50	50
77	95	5
78	95	5

1.3 数据分析

使用 Waters 的 Empower 软件及 Excel 软件进行数据处理。

1.4 方法检出限

方法检出限以进样最小浓度时,仪器基线的 10 倍噪音所对应的浓度来计算。

2 结果与分析

2.1 检测波长

用二极管阵列扫描单标准工作液,得到 11 种酚类物质的吸收波长谱图。通过比对不同波长下各酚类物质峰面积大小及不同波长下是否易于与周围化合物分开,得到 11 种酚类物质在紫外检测器下的最佳检测波长,见表 2。

2.2 标准曲线

分别进样 0.10、0.40、2.00、10.00、20.00 mg/L 混合标准工作液测定峰面积,利用二极管阵列检测器分析得到酚类物质 210~400 nm 的三维谱图。通过选取不同波长,得到不同波长下酚类标准物质的色谱图(图 1)。以混合标准工作液质量浓度为横坐标,各酚类物质最佳检测波长下的峰面积为纵坐标得到各酚类物质标准曲线。由各酚类物质的回归方程及相关系数(表 3)可知,11 种酚类物质的峰面积与质

表2 11种酚类物质保留时间和检测波长
Table 2 Retention time and detection wavelength of 11 phenolic compounds

实验号	酚类物质	保留时间 (min)	吸收波长点 (nm)	最佳检测波长 (nm)
1	绿原酸	23.2	325	325
2	咖啡酸	25.9	220,239,324	324
3	香草醛	29.5	230,280,308	280
4	对香豆酸	36.0	229,310	310
5	阿魏酸	39.2	236,323	323
6	香豆素	41.2	210,277	277
7	肉桂酸	53.9	226.5,277	277
8	木犀草素	56.1	210,254,350	350
9	山奈酚	61.2	264,364	364
10	芹菜素	62.6	210,267,338.5	338.5
11	芒柄花黄素	69.2	249	249

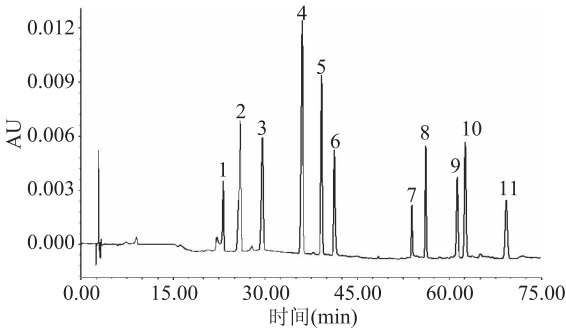


图1 酚类标准物质色谱图(310 nm)

Fig.1 HPLC chromatogram of phenolic compounds standard(310 nm)

注:1:绿原酸;2:咖啡酸;3:香草醛;4:对香豆酸;
5:阿魏酸;6:香豆素;7:肉桂酸;8:木犀草素;
9:山奈酚;10:芹菜素;11:芒柄花黄素。

量浓度存在良好的线性关系。

2.3 方法检出限

进样 0.10 mg/L 酚类物质混合标准工作液,以基

表3 11种酚类物质回归方程、最小检出限和添加回收率

Table 3 Regression equation, LOD, recoveries and R² of 11 phenolic compounds

实验号	酚类物质	回归方程	R ²	线性范围 (mg·L ⁻¹)	方法检出限 (mg·L ⁻¹)	RSD (%)	回收率 (%)
1	绿原酸	y = 57905x + 701.4	0.9990	0.104~20.720	0.010	1.39	103.8
2	咖啡酸	y = 104560x - 11043	1.0000	0.107~20.320	0.107	0.83	111.1
3	香草醛	y = 79649x - 4984.5	0.9999	0.100~20.080	0.064	1.29	114.2
4	对香豆酸	y = 148033x - 24075	0.9997	0.163~20.400	0.163	1.15	110.3
5	阿魏酸	y = 108562x - 20723	0.9998	0.192~20.320	0.192	1.45	118.2
6	香豆素	y = 87579x + 42.851	0.9999	0.103~20.640	0.002	4.05	84.1
7	肉桂酸	y = 160151x - 6308.2	1.0000	0.103~20.640	0.040	4.53	111.9
8	木犀草素	y = 83461x - 3315.4	1.0000	0.103~20.560	0.041	3.06	112.4
9	山奈酚	y = 88942x - 4009.4	1.0000	0.102~20.400	0.046	3.00	101.8
10	芹菜素	y = 92857x - 4290.8	1.0000	0.104~20.800	0.048	2.84	109.5
11	芒柄花黄素	y = 126636x - 22265	0.9997	0.177~20.560	0.177	4.59	102.6

线 10 倍噪音所对应的浓度计算,得到 11 种酚类物质的方法检出限,见表 3。

2.4 重复性实验

分别制备 5 个平行果醋样品,测量 11 种酚类物质的含量,得到相对标准偏差(表 3)。实验结果表明,果醋样品 11 种酚类物质的测定重复性良好。

2.5 添加回收

取 0.1 mL 1 mg/L 混合标准工作液加入 0.9 mL 已知浓度的果醋基质,混匀得到 0.1 mg/L 加标样品溶液。取 0.1 mL 1 mg/L 混合标准工作液加入 0.9 mL 甲醇,混匀得到 0.1 mg/L 标准样品溶液。取 0.1 mL 甲醇加入 0.9 mL 果醋基质,混匀得到空白基质溶液。检测溶液酚类含量,求得果醋酚类 HPLC 检测的添加回收率在 84.1%~118.2% 之间(表 3)。

2.6 实际样品测定

采用本方法对 6 种不同苹果醋和甘蔗醋样品进行分析,得到不同波长下酚类标准物质的色谱图(图 2),分析得出各种果醋中 11 种酚类物质的含量,见表 4。

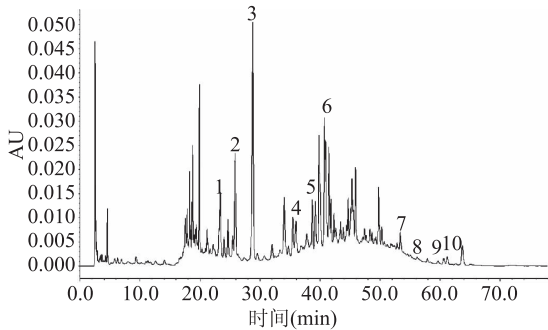


图2 甘蔗醋色谱图(310 nm)

Fig.2 HPLC chromatogram of sugarcane vinegar(310 nm)

注:1:绿原酸;2:咖啡酸;3:香草醛;4:对香豆酸;
5:阿魏酸;6:香豆素;7:肉桂酸;
8:木犀草素;9:山奈酚;10:芹菜素。

超市购买的苹果醋饮料在实验条件下检出酚类物质 5 种(绿原酸、咖啡酸、香草醛、对香豆酸、阿魏酸)。其中绿原酸、咖啡酸和对香豆酸在之前关于高

表4 果醋样品中11种酚类物质含量(mg/L)
Table 4 Eleven phenolic compounds content of fruit vinegar samples(mg/L)

实验号	酚类物质	苹果醋饮料 样品 A	苹果醋饮料 样品 B	苹果醋饮料 样品 C	苹果醋饮料 样品 D	苹果醋饮料 样品 E	苹果醋饮料 样品 F	甘蔗醋 饮料样品
1	绿原酸	2.814	4.755	2.716	0.246	1.284	6.831	4.175
2	咖啡酸	0.112	0.180	0.138	0.125	0.108	0.454	2.090
3	香草醛	ND	ND	ND	ND	0.078	ND	5.418
4	对香豆酸	0.168	ND	0.182	0.215	0.168	0.226	0.731
5	阿魏酸	0.195	ND	0.199	0.213	ND	0.205	1.175
6	香豆素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.182
7	肉桂酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.066
8	木犀草素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.072
9	山奈酚	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.063
10	芹菜素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.079
11	芒柄花黄素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注:ND,未检出。

浓度苹果醋^[5]、苹果汁和苹果渣^[14]酚类物质研究文献中也有被定量检测出。孙翔宇^[9]等从苹果醋中定量检测出没食子酸、香草酸、绿原酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、表儿茶素没食子酸酯和根皮苷。本实验测得苹果醋饮料中酚类物质的种类较少,这可能与发酵用的苹果原料来源和苹果原醋调配用量有着显著性差异,导致不同品类的苹果醋饮料酚类物质也存在着差异。

甘蔗醋饮料中酚类物质种类最为丰富,共检出酚类物质10种,按含量从高到低为香草醛、香豆素、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸、芹菜素、木犀草素、肉桂酸和山奈酚,其中香草醛、香豆素、绿原酸、咖啡酸含量较高(>2.0 mg/L),芹菜素、木犀草素、肉桂酸和山奈酚含量较低(<0.1 mg/L)。其中绿原酸被认为是蔗汁氧化褐变的重要原因^[15]。芒柄花黄素存在于红车轴草^[16]、黄芪^[17]等中药中。本文首次对不同品种苹果醋和甘蔗醋中的芒柄花黄素进行检测,结果苹果醋饮料和甘蔗醋饮料中均未检出。

3 结论

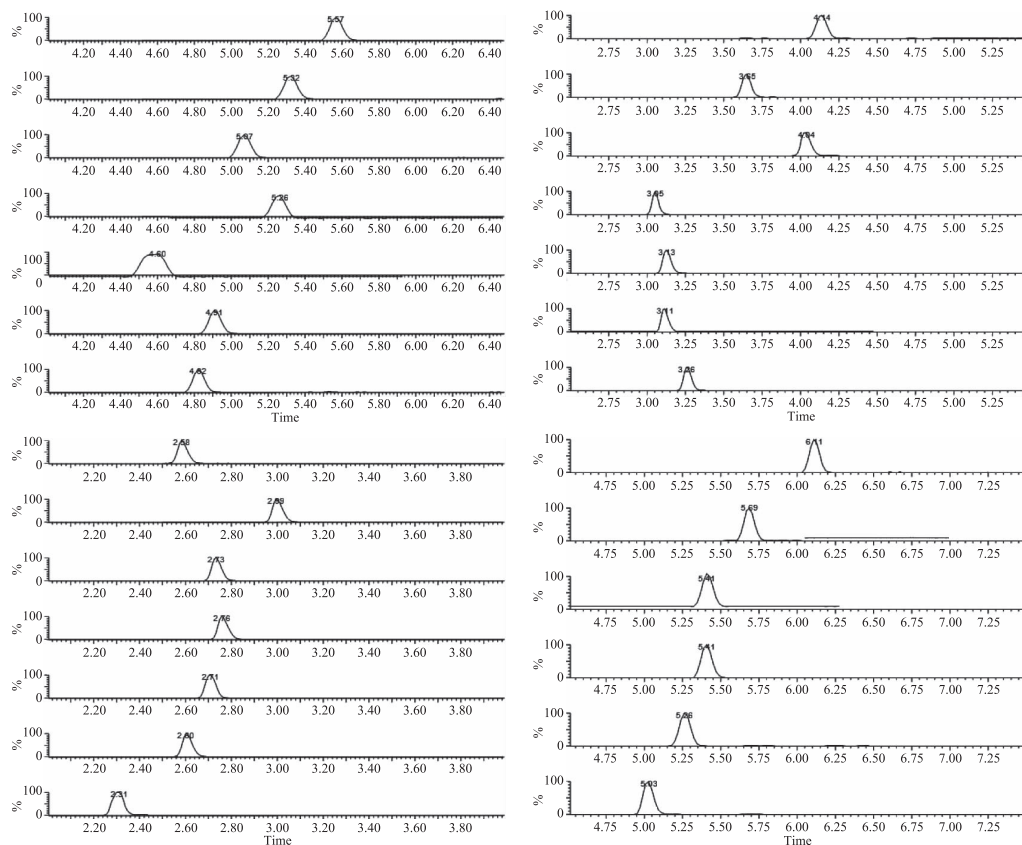
本实验以甲醇-甲酸(100:2, v/v), 10 mmol/L 磷酸氢二钾-磷酸溶液(200:1, v/v)为流动相,采用梯度洗脱方式,用HPLC-DAD法同时检测果醋中11种酚类物质的含量。11种酚类物质绿原酸、咖啡酸、香草醛、对香豆酸、阿魏酸、香豆素、肉桂酸、木犀草素、山奈酚、芹菜素、芒柄花黄素分离效果好,回收率在84.1%~118.2%之间,结果准确可靠,简单易行,适合用于果醋中酚类物质的分析。用此方法从苹果醋饮料中同时检测出5种酚类物质,甘蔗醋饮料中酚类物质种类达10种之多。甘蔗醋中相关功能性的酚类物质的生理活性有待下一步深入研究。

参考文献

[1] 向进乐. 枳椇果梗发酵特性及其果醋功能性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.
[2] 罗秀丽,杨颖,陆胜民,等. 发酵方式对柿果醋感官与营养品质的影响[J]. 食品科学,2016,37(19):154-159.

[3] 刘耀奎. 果醋的营养价值与保健功能[J]. 中国调味品, 2014,39(10):136-140.
[4] 李晓娇,王晓宇,袁静,等. 苹果醋、柿子醋、猕猴桃醋中酚类物质测定与比较[J]. 食品与发酵工业,2013,39(6):186-190.
[5] Nakamura K, Ogasawara Y, Endou K, et al. Phenolic Compounds responsible for the superoxide dismutase-like activity in high-Brix apple vinegar[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(18):10124-10132.
[6] 马锦锦,王晓宇,张娟,等. 三种食醋中酚类物质及抗氧化能力的比较研究[J]. 食品工业科技,2014,35(24):128-131.
[7] Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids[J]. Journal of Separation Science, 2007,30:3268-3295.
[8] Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An overview of analytical methodology[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(10):2866-2887.
[9] 孙翔宇,杜国荣,马婷婷,等. RP-HPLC法同时测定葡萄酒、果酒、果醋中16种单体酚的含量[J]. 现代食品科技, 2014,30(12):201-209.
[10] 许超群,王亚利,黄从军,等. 苹果醋的开发与研究综述[J]. 中国调味品,2011,36(2):7-10.
[11] 郑凤锦,陈赶林,方晓纯,等. 醋酸菌对甘蔗果酒的醋酸发酵作用[J]. 食品与发酵工业,2016,42(2):101-107.
[12] Gan-Lin Chen, Feng-Jin Zheng, Jian Sun, et al. Production and characteristics of high quality vinegar from sugarcane juice[J]. Sugar Tech,2015,17(1):89-93.
[13] 王骏,胡梅,张卉,等. 二极管阵列检测器在食品分析中的应用[J]. 食品与发酵工业,2008,34(8):154-157.
[14] Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 910: 265-273.
[15] 梁贤慧. 亚硫酸法澄清过程蔗汁酚类物质的变化及影响研究[D]. 南宁:广西大学,2012:1-2.

(下转第220页)

图3 空白羊奶基质中添加 5.0 $\mu\text{g/kg}$ β -受体激动剂类药物色谱图Fig.3 The chromatograms obtained from blank goat milk spiked with 5.0 $\mu\text{g/kg}$ of β -agonists

[11] Liu H C, Lin T, Cheng X L, et al. Simultaneous determination of anabolic steroids and β -agonists in milk by QuEChERS and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1043: 176–186.

[12] Li T T, Cao J J, Li Z, et al. Broad screening and identification of β -agonists in feed and animal body fluid and tissues using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry combined with spectra library search [J]. Food Chemistry, 2016, 192: 188–196.

[13] 应永飞, 朱聪英, 周炜, 等. β -受体激动剂质谱裂解特征研究 [J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(1): 52–57.

[14] GB/T22286-2008 动物源性食品中多种 β -受体激动剂残留量的测定 液相色谱串联质谱法. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准化管理委员会, 2008.08.12.

[15] GB/T21313-2007 动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准化管理委员会, 2007.10.29.

[16] 蒋万枫, 赵珊. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查动物组织中 7 种 β -受体激动剂残留 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(6): 675–680.

[17] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展 [J]. 质谱学报, 2011, 32(6): 322–329.

[18] 向平, 沈敏, 卓先义. 液相色谱-质谱分析中的基质效应 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 753–756.

[19] Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. Analytical Chemistry, 2003, 75: 3019–3030.

(上接第 213 页)

[16] 陈慧悬, 栾锋, 刘惠涛. HPLC 法测定红车轴草中大豆苷元、染料木素、芒柄花黄素的含量 [J]. 兰州大学学报(医学版), 2014, 40(2): 35–37.

[17] 李婷婷, 舒志恒, 于良, 等. 不同产地黄芪 HPLC/DAD 指纹图谱及主要黄酮成分含量测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(13): 1182–1187.