

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241008003

高效液相色谱法同时测定发酵型杨梅酒中 11 种酚酸类化合物

张芳芳*, 徐玲萍, 朱欢智

(台州市食品药品检验研究院, 台州市特色农产品质量安全与品质提升重点实验室, 台州 318000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定发酵型杨梅酒中 11 种酚酸类化合物(没食子酸、原儿茶酸、4-羟基苯甲酸、绿原酸、龙胆酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和芥子酸)的分析方法。**方法** 试样经碱性水解液提取处理后水解为游离酚酸化合物, 采用 SunFire C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离, 甲醇-乙酸-水作为流动相梯度洗脱, 280 nm 和 320 nm 波长下检测分析, 外标法定量。**结果** 11 种酚酸类化合物在 5.0~200.0 μg/mL 各自相应的范围内线性关系良好, 相关系数(*r*)均大于 0.999, 各化合物的检出限为 0.0561~0.4428 μg/mL, 3 个不同浓度添加水平的加标回收率为 91.61%~108.40%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 1.71%~4.23%。未添加辅色剂杨梅酒中 11 种酚酸类化合物均有检出, 没食子酸含量最高, 占 11 种酚酸类化合物总量的 58%; 原儿茶酸次之, 约占 11 种酚酸类化合物总量的 35%; 对添加抗坏血酸、单宁、苯甲酸、乙二胺四乙酸、二氧化硫 5 种不同含量辅色剂开展护色工艺研究的杨梅酒进行测定, 发现添加 0.15 mg/L 单宁或添加 0.05 mg/L 抗坏血酸的杨梅酒对酚酸类化合物含量影响最小。**结论** 该方法准确度和精密度较高, 适用于发酵型杨梅酒中酚酸类化合物的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 发酵型杨梅酒; 酚酸类化合物; 护色工艺

Simultaneous determination of 11 kinds of phenolic acid compounds in fermented bayberry wine by high performance liquid chromatography

ZHANG Fang-Fang*, XU Ling-Ping, ZHU Huan-Zhi

(Taizhou Food and Drug Inspection and Research Institute, Key Laboratory of Quality Safety and Quality Improvement of Special Agricultural Products in Taizhou City, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 11 kinds of phenolic acid compounds (gallic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, gentian acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and erucic acid) in fermented bayberry wine by high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were extracted by alkaline hydrolysate and hydrolyzed to free phenolic acid compounds. The samples were separated by SunFire C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm),

基金项目: 台州市科技计划项目(22nyb04)

Fund: Supported by the Taizhou Science and Technology Plan Project (22nyb04)

*通信作者: 张芳芳, 工程师, 主要研究方向为食品检测与分析。E-mail: 236484865@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Fang-Fang, Engineer, Taizhou Food and Drug Inspection Institute, No.788 Donghai Road, Taizhou 318000, China. E-mail: 236484865@qq.com

eluted by methanol-acetic acid-water as mobile phase gradient, detected at 280 nm and 320 nm, and quantified by external standard method. **Results** The linear relationship of 11 kinds of phenolic acid compounds was good in the corresponding range of 5.0–200.0 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficient (r) was greater than 0.999. The limit of detection of each compound was 0.0561–0.4428 $\mu\text{g/mL}$, and 3 kinds of different concentrations were added to the mark. The yield was 91.61%–108.40%, and the relative standard deviations (RSDs) were 1.71%–4.23%. All 11 kinds of phenolic acids were detected in bayberry wine without additive, the content of gallic acid was the highest, accounting for 58% of the total 11 kinds of phenolic acids. Protocatechuic acid was the second, accounting for about 35% of the total 11 kinds of phenolic acid compounds. Determination of color protection technology for bayberry wine with 5 kinds of different content auxiliary colorants including ascorbic acid, tannin, benzoic acid, ethylenediaminetetraacetic acid, and sulfur dioxide added, it was found that adding 0.15 mg/L tannin or 0.05 mg/L ascorbic acid in bayberry wine had the least effect on phenolic acid compound content. **Conclusion** The method has high accuracy and precision, and is suitable for the determination of phenolic acids in fermented bayberry wine.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; fermented bayberry wine; phenolic acid compounds; color protection technology

0 引言

杨梅酒是一种以杨梅为原料发酵酿制而成的酒类饮品。随着人们对生活品质的日益重视,果香浓郁、酒精度低、营养丰富的发酵果酒越来越受消费者喜爱^[1]。不少杨梅酒生产企业逐渐将目光转向发酵型杨梅酒^[2–3]。发酵杨梅酒在发酵、陈酿和储藏的过程中,其富含的花色苷和类黄酮等成分极易氧化,致使其成品酒会出现不同程度的混浊、褐变现象,大大影响了其感官品质和经济价值^[3–6]。护色是指杨梅酒加工过程中,采用一定的措施来保持或改善颜色的工艺技术。不少学者将二氧化硫、乙二胺四乙酸、茶多酚、单宁等抗氧化剂添加到发酵果酒中用于研究减缓褐变,都取得一些有益的结果^[7–9]。励建荣^[10]、楼乐燕等^[11]研究发现,辅色素单宁对杨梅花色苷有明显辅色作用,并能增强花色苷热稳定性;钟瑞敏等^[12]使用海藻酸铝固定化酵母进行发酵,呈现出明显的护色效果。然而相关研究报告中较少涉及护色工艺对酒营养成分、活性物质等含量的影响。

酚酸是一类结构中带有有机羧酸官能团和酚类基团的化合物^[13],具有较高的营养价值和多种生物活性^[14–15]。植物果实中酚酸主要包括没食子酸、原儿茶酸、4-羟基苯甲酸、绿原酸、龙胆酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和芥子酸等^[16],发酵后的果酒较好地保留了这类营养成分。酚酸类物质与杨梅酒风味、色泽等感官指标密切相关,同时也兼具抗氧化、抗菌、抗肿瘤等药理特性,是评价杨梅酒品质的重要指标^[17]。酚酸在杨梅酒中以多种形式存在,包括游离型和结合型。游离酚酸可以直接提取测定;结合型酚酸存在形式较为复杂,常与蛋白质、碳水化合物、脂肪等成分紧密连接,这类酚酸需要经过适当的化学处理才能被测定^[18–20]。目前酚酸测定的方法主要有薄

层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)、气相色谱-质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS)^[21]、液相色谱-质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS)^[22–24]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[25–29]。TLC操作简单,无需复杂的仪器设备,但是其准确度差,主要用于鉴别而非定量分析。GC-MS则需要对酚酸类化合物进行衍生化处理,前处理过程烦琐,重现性差,检测酚酸化合物种类少。LC-MS能够提供更高的灵敏度和选择性,尤其适用于复杂混合物中特定化合物的定性和定量分析,但是其价格昂贵、运行成本高、操作复杂,应用场景较局限,不易推广到生产领域。HPLC是目前检测酚酸化合物最常用的方法,具有应用广泛、操作简单、灵敏度高、重现性好等特点,对高沸点、强极性的大分子化合物的分离具有一定的优势。目前各类文献主要针对植物果肉建立了不同的HPLC,如黄永健等^[29]以竹笋为基质建立了8种酚酸类物质的HPLC测定方法。任洪涛等^[30]以草果为基质建立检测4种酚酸含量的LC。酚酸类化合物是杨梅酒具有重要研究价值的物质,然而关于杨梅酒产品中酚酸类测定方法及相关含量研究鲜有报道。

本研究拟对样品的前处理方法和仪器条件进行优化,建立同时测定发酵型杨梅酒中11种酚酸化合物的HPLC。在此基础上比较发酵过程中添加不同护色剂时酚酸化合物含量的差异,优化杨梅酒的护色工艺,提升杨梅酒的品质特征,为推动杨梅酒产业高质量发展提供有力的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杨梅酒:供试品来源于自酿的不同护色工艺中的杨梅酒。按样品取样原则,分别为未添加辅色剂、添加抗坏

血酸、单宁、苯甲酸、乙二胺四乙酸、二氧化硫辅色剂 6 种供试品。

没食子酸、原儿茶酸、龙胆酸、4-羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、阿魏酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、芥子酸标准品(纯度大于 97.5%，上海安谱瑞世标准技术服务有限公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯，德国默克集团)；乙酸(分析纯，西陇科学股份有限公司)；乙酸乙酯(色谱级，赛默飞世尔科技中国有限公司)；抗坏血酸、NaOH(分析纯，国药集团化学试剂有限公司)；盐酸(优级纯，浙江汉诺化工科技有限公司)；乙二胺四乙酸(分析纯，上海润捷化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Waters Acquity ARC-2998 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器)、Waters SunFire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司)；MS204S 分析天平(精度 0.1 mg，瑞士梅特勒-托利多集团)；Microfuge20 离心机(贝克曼库尔特有限公司)；PHSJ-4F 酸度计(仪电科学仪器股份有限公司)；2150TH 超声清洗器(上海安谱实验科技股份有限公司)；Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司)；Waters SunFire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液配制

准确称取 11 种酚酸标准品各 50 mg(精确至 0.1 mg)，先加入少量的甲醇超声溶解，再用甲醇转移并定容至 50 mL 容量瓶中，配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 标准储备液(−18 °C 保存)。临用前取不同体积的标准储备液，配制成质量浓度为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 和 200.0 μg/mL 的标准工作液。

1.3.2 样品处理

称取 2.00 g 样品置于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 3 mol/L NaOH 溶液(称取 120 g NaOH，加入 10 g 抗坏血酸和 3 g 乙二胺四乙酸，纯水溶解并定容至 1 L)，40 °C 避光振荡水解 2 h，用盐酸调节 pH 至 2.0，6000 r/min 离心 5 min 后上清液移入分液漏斗，分别用 50 mL 乙酸乙酯萃取 3 次，合并乙酸乙酯萃取液，于 40 °C 旋转蒸发至干，加入 5 mL 70% 甲醇水溶液，混匀，过 0.22 μm 有机滤膜，弃去 2~5 滴初滤液，取续滤液作为待测液。

1.3.3 仪器条件

色谱柱：Waters SunFire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；进样体积：10 μL；检测波长：280 nm 和 320 nm；柱温：30 °C；流速：1.0 mL/min；流动相 A：甲醇+乙酸+水(10:2:88, V:V:V)；流动相 B：甲醇+乙酸+水(90:2:8, V:V:V)。梯度洗脱条件见表 1^[25]。

表 1 洗脱梯度表
Table 1 Elution gradient table

流动相	洗脱时间/min				
	0	25	45	53	55
流动相 A/%	0	15	50	0	0
流动相 B/%	100	85	50	100	100

1.4 数据处理

采用 Excel 2007 和 SPSS 22.0 软件进行数据处理和统计分析，Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) 检验统计量用于比较变量间简单相关系数和偏相关系数，用于判定实验数据是否适合作因子分析。实验数据重复测定 3 次，以平均值表示。

2 结果与分析

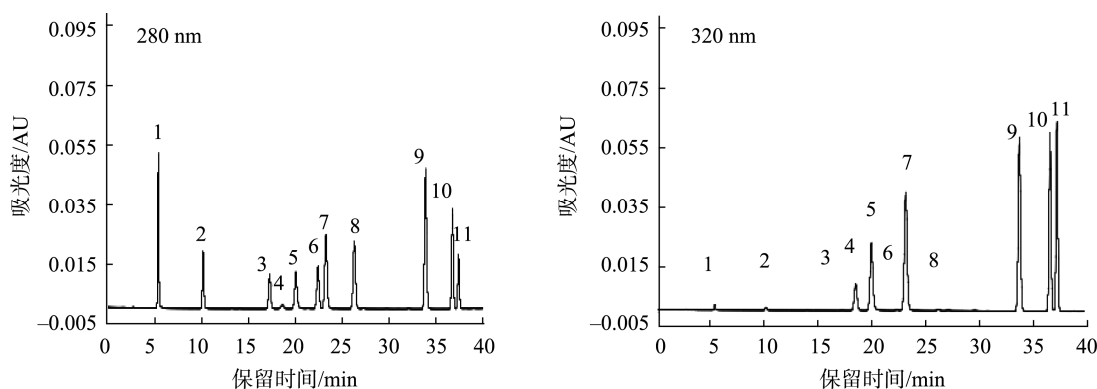
2.1 仪器条件的优化

2.1.1 检测波长的选择

采用 HPLC-二极管阵列检测器对 100 μg/mL 酚酸混合标准溶液进行 200~800 nm 范围的光谱扫描，扫描结果发现没食子酸、原儿茶酸、4-羟基苯甲酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸在 280 nm 左右有最大吸收峰，而绿原酸、龙胆酸、对香豆酸、阿魏酸和芥子酸在 320 nm 左右有最大吸收峰。因此，本研究选择 280 nm 和 320 nm 作为 11 种酚酸化合物检测波长。11 种酚酸化合物在 280 nm 和 320 nm 波长下的色谱图如图 1 所示。从图 1 可以发现，没食子酸、原儿茶酸、4-羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸这 5 种酚酸化合物在 320 nm 检测波长下几乎没有响应，在 280 nm 检测波长下响应高、峰形好，且能达到预期的分离度要求。为得到最优的检测灵敏度，本研究在 18.00~21.50 min 和 32.00~40.00 min 选用 320 nm 波长检测，其他选取 280 nm 为最终检测波长。

2.1.2 流动相的选择

反相色谱的固定相活性基团是烷基，目标物在固定相上的保留主要是疏水作用力，常用的流动相主要是甲醇和乙腈。翁芳华等^[31]在测定蓝莓酒中酚酸物质时，选用甲醇和乙酸水溶液作为流动相，发现甲醇作为有机相时目标物分离效果较佳。黄永健等^[29]在测定竹笋中 8 种酚酸类物质时，则选择乙腈和乙酸水溶液建立洗脱程序，也实现了较好的分析效果。乙腈毒性较大，本研究选择甲醇作为有机相。由于酚酸化合物带有 -OH 和 -COOH，容易发生电离。离子状态的酚酸化合物能与固定相相互作用，产生次保留效应，造成峰变宽、拖尾等现象。加入少量的乙酸能调节酚酸化合物解离，对目标化合物峰形有明显的改善作用。流动相 pH 的变化会引起化合物保留时间的改变，因此需在流动相 A 和 B 中加入等量的乙酸。综合考虑，实验选择甲醇和乙酸水溶液作为流动相，对梯度条件进行优化，优化后酚酸化合物实现较好的分离和较高响应。11 种酚酸化合物色谱图见图 2。



注: 1. 没食子酸; 2. 原儿茶酸; 3. 4-羟基苯甲酸; 4. 绿原酸; 5. 龙胆酸; 6. 香草酸; 7. 咖啡酸; 8. 丁香酸; 9. 对香豆酸; 10. 阿魏酸; 11. 芥子酸, 图 2、图 4 同。

图 1 11 种酚酸化合物在 280 nm 和 320 nm 波长下的色谱图

Fig.1 Chromatograms of 11 kinds of phenolic acid compounds under 280 nm and 320 nm wavelengths

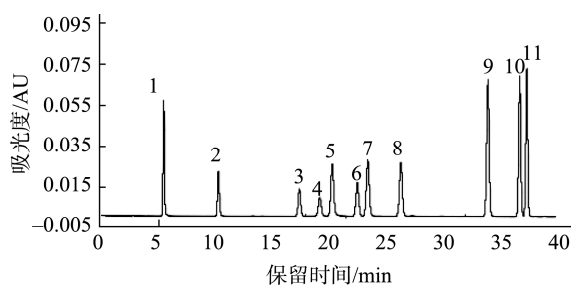


图 2 11 种酚酸化合物的色谱图

Fig.2 Chromatograms of 11 kinds of phenolic acid compounds

2.2 提取条件的优化

参照 NY/T 3949—2021《植物源性食品中酚酸类化合物的测定 高效液相色谱-串联质谱法》对杨梅酒中的酚酸进行检测。一组样品采用 3 mol/L NaOH 水解 1 h, 另一组则直接取样测定, 发现两者结果存在显著的差异。杨梅酒中酚酸为游离型、游离酯型、结合酯型共存的形态, 其中游离酯型、结合酯型酚酸需水解提取^[32]。本研究通过优化不同体积、不同时间的水解条件, 提高酚酸化合物定量的准确性。称取未添加辅色剂的杨梅酒样品, 分别加入 10、20、30、40 mL 3 mol/L NaOH 溶液, 按照 1.3.2 方法对样品进行前处理。每一种体积平行测定 3 次。以没食子酸为例, 其含量如图 3 所示。从图 3 可以看出, 没食子酸含量随 NaOH 提取液体积的增加先增大后趋于稳定, 提取液体积在 20 mL 时没食子酸含量最高。故确定 20 mL 3 mol/L NaOH 为最优的提取体积。

称取未添加辅色剂的杨梅酒样品, 加入 20 mL 3 mol/L NaOH 溶液, 分别水解 1、2、3、4 h, 按照 1.3.2 方法对样品进行前处理, 每种水解时间平行测定 3 次。以没食子酸为例, 其含量见图 3。由图 3 可知, 没食子酸含量随水解时间的增加先增大后趋于稳定, 水解时间 2 h 时其含量最高。因此确定 2 h 为最佳水解时间。

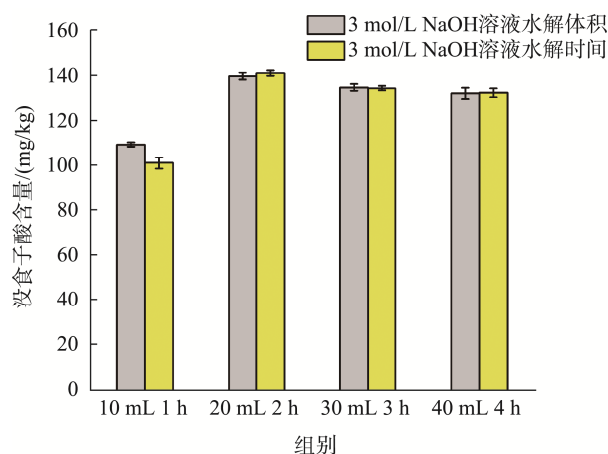


图 3 提取条件的优化(n=3)

Fig.3 Optimization of extraction conditions (n=3)

样品经过前处理后基质干扰少。2.00~7.00 min 时间段杂峰较多, 但不影响目标化合物的分离。7.00 min 之后的基线较为平整, 噪音小, 有利于目标物的准确定量和定量。杨梅酒基质加标色谱图如图 4 所示。

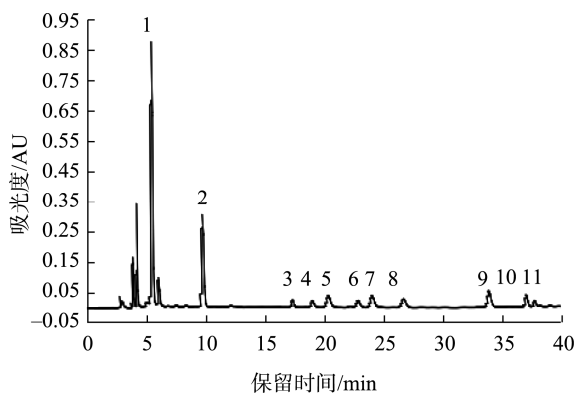


图 4 杨梅酒样品加标色谱图

Fig.4 Spiked chromatogram of bayberry wine sample

2.3 线性关系、检出限和定量限

在优化的色谱条件下,对按照 1.3.1 配制的标准工作溶液进行测定,以标准溶液质量浓度为横坐标(X , $\mu\text{g/mL}$),化合物峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。以 3 倍信噪比(S/N)计算检出限,10 倍信噪比(S/N)计算定量限。如表 2 所示,在 5.0~200.0 $\mu\text{g/mL}$ 的线性范围内,相关系数(r)均大于 0.999,证明样品含量和峰面积存在良好的线性关系。11 种酚酸化合物检出限为 0.0561~0.4428 $\mu\text{g/mL}$,定量限为 0.187~1.476 $\mu\text{g/mL}$,说明本方法具有较高的灵敏度。

2.4 精密度和回收率

准确称取未添加辅色剂的杨梅酒样品,根据已测定的本底值不同,分别加入 3 个不同浓度水平的标准溶液。没食子酸和原儿茶酸添加水平为 10.0、20.0、50.0 mg/kg ,4-羟基苯甲酸、绿原酸、龙胆酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和芥子酸添加水平为 5.0、10.0、20.0 mg/kg ,每个浓度水平测定 6 次($n=6$)。样品的平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)见表 3。由表 3 可知,杨梅酒中 11 种酚酸化合物的平均回收率为 91.61%~108.40%,

表 2 11 种酚酸化合物的回归方程、线性范围、相关关系、检出限和定量限
Table 2 Linear equations, linear ranges, correlations, limits of detection and limits of quantitation of 11 kinds of phenolic acid compounds

化合物	线性方程	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	相关系数(r)	检出限/ $(\mu\text{g/mL})$	定量限/ $(\mu\text{g/mL})$
没食子酸	$Y=3.44\times10^4X-1.60\times10^3$	5.0~200.0	0.9992	0.0714	0.238
原儿茶酸	$Y=1.65\times10^4X+1.57\times10^3$	5.0~200.0	0.9992	0.1868	0.623
4-羟基苯甲酸	$Y=1.57\times10^4X+1.32\times10^3$	5.0~200.0	0.9992	0.3024	1.008
龙胆酸	$Y=1.27\times10^4X-4.45\times10^3$	5.0~200.0	0.9993	0.4428	1.476
绿原酸	$Y=1.71\times10^4X-1.12\times10^4$	5.0~200.0	0.9993	0.1612	0.537
香草酸	$Y=2.02\times10^4X+9.98\times10^2$	5.0~200.0	0.9992	0.2481	0.827
咖啡酸	$Y=3.72\times10^4X-8.75\times10^3$	5.0~200.0	0.9992	0.1471	0.490
丁香酸	$Y=3.24\times10^4X+7.96\times10^2$	5.0~200.0	0.9992	0.1557	0.519
对香豆酸	$Y=5.68\times10^4X+2.42\times10^3$	5.0~200.0	0.9992	0.0608	0.203
阿魏酸	$Y=3.31\times10^4X+1.04\times10^3$	5.0~200.0	0.9991	0.0591	0.197
芥子酸	$Y=1.65\times10^4X+6.18\times10^2$	5.0~200.0	0.9991	0.0561	0.187

RSDs 为 1.71%~4.23%。方法的准确度和精密度较好,适用于发酵型杨梅酒中 11 种酚酸化合物的检测分析。

表 3 方法的精密度和回收率的测定结果($n=6$)

Table 3 Determination results of precision and recovery rate of the method ($n=6$)

化合物	添加水平 $/(mg/kg)$	平均回收率 $/\%$	RSDs/ $\%$
没食子酸	10.0	92.03	3.65
	20.0	93.24	3.12
	50.0	95.15	2.51
原儿茶酸	10.0	102.00	2.47
	20.0	108.40	2.21
	50.0	102.80	1.77
4-羟基苯甲酸	5.0	92.82	4.23
	10.0	99.56	3.51
	20.0	98.78	2.41
龙胆酸	5.0	92.55	2.17
	10.0	94.24	2.41
	20.0	96.53	2.07
绿原酸	5.0	93.66	3.41
	10.0	94.73	3.18
	20.0	93.81	2.54

表 3(续)

化合物	添加水平 $/(mg/kg)$	平均回收率 $/\%$	RSDs/ $\%$
香草酸	5.0	104.20	2.47
	10.0	102.50	2.15
	20.0	106.40	2.07
咖啡酸	5.0	103.30	1.71
	10.0	107.70	2.47
	20.0	106.70	2.15
丁香酸	5.0	105.20	1.78
	10.0	104.60	2.15
	20.0	103.50	2.10
对香豆酸	5.0	108.40	2.25
	10.0	107.30	2.07
	20.0	103.70	1.88
阿魏酸	5.0	95.18	2.53
	10.0	92.64	2.41
	20.0	95.69	1.84
芥子酸	5.0	91.61	4.05
	10.0	92.66	3.25
	20.0	95.52	2.82

2.5 不同护色工艺下 11 种酚酸类化合物含量分析

取自酿的不同护色工艺中的杨梅酒, 按样品取样原则, 分别取未添加辅色剂、添加抗坏血酸(0.05、0.15、0.30 mg/L)、单宁(0.05、0.15、0.30 mg/L)、苯甲酸(0.05、0.15、0.30 mg/L)、乙二胺四乙酸(0.05、0.15、0.30 mg/L)、二氧化硫(0.05、0.15、0.30 mg/L) 5 种不同含量辅色剂共 16 种类样品。按照 1.3 方法对样品进行检测, 每种样品平行测定 3 次, 取其平均值, 结果见表 4。

从表 4 的数据可以看出, 未添加辅色剂杨梅酒 11 种酚酸类化合物均有检出, 以没食子酸和原儿茶酸为主, 其余 9 种酚酸类含量相对较少。没食子酸含量最高, 占 11 种酚酸化合物总量的 58%, 原儿茶酸次之, 约占 11 种酚酸化合物总量的 35%。

利用 SPSS 22.0 主成分分析功能对添加不同种类不同浓度辅色剂的样品进行统计分析。根据相关性矩阵分析, 前 2 个公共因子解释的累计方差贡献率达 87.95%, 因此提取两个公共因子能满足统计学的要求。KMO 检验用于研究变量之间的偏相关性, 认为分析结果大于 0.9 时效果较好, 分析结果 0.5 以下则不宜作因子分析, 本研究中 KMO 分析结果为 0.745, 认为因子分析结果可以接受。对 2 个公共因子的得分进行加权求和, 权数即为方差贡献率, 取值分别为 58.89%、28.97%, 最终计算不同种类不同浓度辅色剂的样品的综合得分。如表 5 所示, 添加 0.15 mg/L 单宁的样品得分最高为 1.078, 0.05 mg/L 抗坏血酸得分次之为 0.998, 认为添加 0.15 mg/L 单宁或添加 0.05 mg/L 抗坏血酸的杨梅酒对酚酸化合物的影响最小。

表 4 未添加辅色剂杨梅酒 11 种酚酸类化合物含量(n=3)
Table 4 Content of 11 kinds of phenolic acid compounds in bayberry wine without the addition of colorants (n=3)

化合物	没食子酸	原儿茶酸	4-羟基苯甲酸	龙胆酸	绿原酸	香草酸	咖啡酸	丁香酸	对香豆酸	阿魏酸	芥子酸
含量/(mg/kg)	129.30	78.91	2.615	2.065	1.021	3.621	1.247	1.724	1.042	0.849	0.362

表 5 不同种类不同浓度辅色剂的样品 11 种酚酸类化合物的含量(n=3)及综合得分
Table 5 Content (n=3) of 11 kinds of phenolic acids compounds in samples of different kinds and different concentrations of colouring agents and their comprehensive scores

添加辅色剂 种类及浓度	11 种酚酸类化合物的含量/(mg/kg)											综合 得分
	没食子酸	原儿茶酸	4-羟基 苯甲酸	龙胆酸	绿原酸	香草酸	咖啡酸	丁香酸	对香豆	阿魏酸	芥子酸	
0.05 mg/L 抗坏血酸	125.60	76.65	2.587	2.016	1.016	3.716	1.261	1.682	1.013	0.836	0.352	0.998
0.15 mg/L 抗坏血酸	94.25	57.65	1.983	1.952	0.984	3.612	1.759	1.606	1.006	0.632	0.264	0.486
0.30 mg/L 抗坏血酸	73.15	50.96	1.806	0.000	0.784	3.286	1.346	1.230	0.895	0.499	0.203	-0.126
0.05 mg/L 单宁	102.00	66.26	2.402	0.000	0.813	3.397	1.109	1.610	1.016	0.702	0.286	0.464
0.15 mg/L 单宁	132.10	76.26	2.574	2.036	1.101	3.788	1.251	1.729	1.029	0.855	0.369	1.078
0.30 mg/L 单宁	54.63	28.59	1.103	0.000	0.544	2.659	0.542	1.081	0.765	0.382	0.000	-0.824
0.05 mg/L 苯甲酸	60.60	41.05	1.599	0.000	0.602	2.551	0.602	1.267	0.543	0.415	0.000	-0.655
0.15 mg/L 苯甲酸	82.45	53.84	1.902	1.502	0.751	2.962	0.990	1.307	0.975	0.565	0.238	0.134
0.30 mg/L 苯甲酸	79.06	52.88	1.968	1.493	0.712	2.805	0.690	1.149	0.902	0.547	0.228	0.025
0.05 mg/L 乙二胺 四乙酸	53.09	39.18	1.533	0.000	0.540	3.197	1.138	1.325	0.758	0.375	0.000	-0.597
0.15 mg/L 乙二胺 四乙酸	96.55	67.38	2.372	1.483	0.801	3.326	0.786	1.664	1.009	0.685	0.275	0.551
0.30 mg/L 乙二胺 四乙酸	41.37	30.26	1.422	0.000	0.000	2.418	0.527	1.002	0.486	0.289	0.000	-1.118
0.05 mg/L 二氧化 化硫	52.20	40.24	1.535	0.000	0.539	3.567	1.125	1.352	0.745	0.366	0.000	-0.576
0.15 mg/L 二氧化 化硫	75.91	53.20	1.938	0.000	0.688	3.565	1.151	1.402	0.911	0.527	0.204	-0.031
0.30 mg/L 二氧化 化硫	75.82	54.41	2.003	1.480	0.674	3.813	1.137	1.685	0.905	0.531	0.209	0.189

3 结 论

与现有 NY/T 3949—2021 相比, 本研究建立的检测方法可同时测定 11 种酚酸类化合物含量。该方法样品前处理简单, 准确度和精密度较高, 适用于发酵型杨梅酒中酚酸类化合物的检测分析。

发酵型杨梅酒中的酚酸类化合物主要以没食子酸和原儿茶酸为主, 其中没食子酸含量最高。但不同护色工艺处理的杨梅酒酚酸类化合物含量不同, 其中添加 0.15 mg/L 单宁或添加 0.05 mg/L 抗坏血酸的杨梅酒最利于酚酸化合物的保留。根据酿造过程不同、生产工艺不同对杨梅酒风味感官、抗氧化性质、营养成分等方面的研究尚需进一步深入, 也是杨梅酒产业健康稳定发展的积极探索。

参考文献

- [1] 赵婷, 李林波, 潘明, 等. 果酒产业的发展现状与市场前景展望[J]. 食品工业, 2019(5): 302–308.
ZHAO T, LI LB, PAN M, *et al.* Development status and market prospect of fruit wine industry [J]. Food Ind, 2019(5): 302–308.
- [2] 曹玉玺. 杨梅发酵酒风味与护色及抗氧化活性的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2020.
CAO YX. Study on flavor, color protection and antioxidant activity of *Myrica rubra* fermented wine [D]. Ningbo: Ningbo University, 2020.
- [3] 叶兴乾, 陈健初, 苏平. 荸荠种杨梅的花色苷组分鉴定[J]. 浙江农业大学学报, 1994, 20(2): 188–190.
YE XG, CHEN JC, SU P. Identification of anthocyanin components in *Myrica rubra* [J]. J Zhejiang Agric Univ, 1994, 20(2): 188–190.
- [4] 王引, 陈方永, 倪海枝, 等. 不同杨梅品种花色苷稳定性研究初探[J]. 浙江柑橘, 2014, 31(2): 39–41.
WANG Y, CHEN FY, NI HZ, *et al.* Preliminary study on the stability of anthocyanins in different *Myrica rubra* varieties [J]. Zhejiang Citrus, 2014, 31(2): 39–41.
- [5] CAVALCANTI RN, SANTOS DT, MEIRELES MAA. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview [J]. Food Res Int, 2011, 44(2): 499–509.
- [6] 闫真真. 樱桃酒褐变机理及酿造技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
YAN ZZ. Study on browning mechanism and brewing technology of cherry wine [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013.
- [7] 王华, 郭安鹏, 李华, 等. 红葡萄酒中新型抗氧化剂研究[J]. 中国食品添加剂, 2004, 15(4): 33–38.
WANG H, GUO ANQ, LI H, *et al.* Study on new antioxidants in red wine [J]. China Food Addit, 2004, 15(4): 33–38.
- [8] 段秋霞, 李定金, 段振华, 等. 红心火龙果酒贮藏过程中抗氧化活性变化的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(24): 43–49.
DUAN QX, LI DJ, DUAN ZH, *et al.* Study on the change of antioxidant activity of red heart pitaya wine during storage [J]. Food Res Dev, 2020, 41(24): 43–49.
- [9] 吉俊臣. 蓝莓果酒快速陈酿及花青素护色研究[D]. 成都: 西华大学, 2020.
- [10] 励建荣. 杨梅保鲜及深加工关键技术研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2001.
LI JR. Study on key technologies of preserving and deep processing of *Myrica rubra* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2001.
- [11] 楼乐燕, 岳阳, 尹培, 等. 单宁酸和绿原酸对杨梅花色苷的辅色作用[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(4): 74–79.
LOU LY, YUE Y, YIN P, *et al.* The complementary color effects of tannic acid and chlorogenic acid on anthocyanins in *Myrica rubra* [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(4): 74–79.
- [12] 钟瑞敏, 曾庆孝, 刘峰, 等. 海藻酸铝固定化酵母在杨梅果酒发酵中提高花色苷稳定性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 94–99.
ZHONG RM, ZENG QX, LIU F, *et al.* Study on improving the stability of anthocyanins in *Myrica rubra* fruit wine fermentation by aluminum alginate immobilized yeast with aluminum alginate [J]. Food Sci, 2005, 26(11): 94–99.
- [13] GOUFO P, PEREIRA J, MOUTINHO-PEREIRA J, *et al.* Rice (*Oryza sativa* L.) phenolic compounds under elevated carbon dioxide (CO₂) concentration [J]. Environ Exp Bot, 2014, 99: 28–37.
- [14] FANG ZX, ZHANG YH, LV Y, *et al.* Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices [J]. Food Chem, 2009, 113(4): 884–888.
- [15] 张华, 周志钦, 席万鹏. 15 种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 64–70.
ZHANG H, ZHOU ZQ, XI WP. Comparison of antioxidant activities of main phenols in 15 citrus fruits *in vitro* [J]. Food Sci, 2015, 36(11): 64–70.
- [16] 魏云潇, 余作龙, 韩超, 等. 果蔬酚酸的研究及在保鲜中应用进展[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(7): 22–26.
WEI YX, YU ZL, HAN C, *et al.* Research on fruit and vegetable phenolic acid and its application in preservation [J]. Anhui Agric Sci, 2020, 48(7): 22–26.
- [17] 曹玉玺, 吴祖芳, 翁佩芳, 等. 酚酸物质对杨梅发酵酒贮藏期间色泽和挥发性风味物质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 78–85.
CAO YX, WU ZF, WENG PF, *et al.* Effects of phenolic acids on color and volatile flavor substances of bayberry fermented wine during storage [J]. Food Sci, 2021, 42(11): 78–85.
- [18] OLUWOLE O, FERNANDO WB, LUMANLAN J, *et al.* Role of phenolic acid, tannins, stilbenes, lignans and flavonoids in human health—A review [J]. Int J Food Sci Technol, 2022, 57(10): 6326–6335.
- [19] 辛嘉英, 刘思淼, 葛恽泽, 等. 酚酸与蛋白质和碳水化合物相互作用及对面包面团的影响研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(9): 272–282.
XIN JY, LIU SM, GE YZ, *et al.* Research progress on the interaction of phenolic acid with protein and carbohydrate and its effect on bread dough [J]. Food Sci, 2018, 45(9): 272–282.
- [20] HUANG Y, SHEN B, ZHENG C, *et al.* Synthesis of chitosan–phenolic acid copolymer: Exploration of structural and physicochemical properties [J]. Int J Food Sci Tech, 2022, 57(12): 7806–7815.
- [21] 韩雪, 张富新, 邵玉宇, 等. 气相色谱-质谱联用法同时测定红枣中六种酚酸[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 220–225.
HAN X, ZHANG FX, SHAO YY, *et al.* Simultaneous determination of six phenolic acids in jujube by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(4): 220–225.
- [22] 严俊安, 谭洪兴, 唐增煦, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水

- 果中 13 种酚酸[J]. 卫生研究, 2024, 53(5): 790–796.
- YAN JAN, TAN HX, TANG ZX, *et al.* Simultaneous determination of 13 phenolic acids in fruits by HPLC-MS [J]. Health Res, 2024, 53(5): 790–796.
- [23] 李茜, 张珂, 李婷, 等. 利用三级质谱与二级质谱匹配策略鉴定丹参中酚酸类成分[J]. 分析化学, 2024, 52(2): 267–285.
- LI H, ZHANG K, LI T, *et al.* Identification of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* by matching strategy of tertiary mass spectrometry and secondary mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2024, 52(2): 267–285.
- [24] 王远, 刘洋, 张金磊, 等. HPLC-MS/MS 法测定黑枸杞中 9 种酚酸[J]. 农产品加工, 2023(15): 53–55.
- WANG Y, LIU Y, ZHANG JL, *et al.* Determination of 9 kinds of phenolic acids in *Lycium barbarum* by HPLC-MS/MS/MS [J]. Farm Prod Proce, 2023(15): 53–55.
- [25] MATTILA P, KUMPULAINEN J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(13): 3660–3667.
- [26] 李飞飞, 朱杰, 李智宁, 等. 同时测定亚麻荠植株中酚酸和黄酮含量的方法研究[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(5): 158–162.
- LI FF, ZHU J, LI ZN, *et al.* Study on the method of simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in flax plants [J]. Cere Oils, 2024, 37(5): 158–162.
- [27] 傅春燕, 刘璐, 柏智颖, 等. 百合高效液相色谱指纹图谱的建立及 3 种酚酸甘油酯活性成分含量的测定[J]. 理化检验-化学分册, 2023, 59(7): 825–832.
- FU CY, LIU L, BAI ZY, *et al.* Establishment of HPLC fingerprint of lily and determination of active components of three phenolic glycerides [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2023, 59(7): 825–832.
- [28] 李芳杰, 郝俊光, 林敏清, 等. 高效液相色谱法测定香芽蕉酒发酵过程 11 种酚酸和槲皮素的变化[J]. 食品科技, 2022, 47(3): 297–302.
- LI FJ, HAO JG, LIN MQ, *et al.* Determination of 11 phenolic acids and quercetin during the fermentation of banana wine by HPLC [J]. Food Sci Technol, 2022, 47(3): 297–302.
- [29] 黄永健, 苟航, 张保, 等. HPLC 同时测定竹笋中 8 种酚酸类物质含量的方法研究及其应用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2024, 48(3): 237–244.
- HUANG YJ, XUN H, ZHANG B, *et al.* Research on the method of simultaneous determination of eight phenolic acid compounds in bamboo shoots by HPLC and its application [J]. Fore Nanjing Univ (Nat Sci), 2024, 48(3): 237–244.
- [30] 任洪涛, 谭年文, 周恒苍, 等. 高效液相色谱法测定草果中 4 种酚酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3694–3699.
- REN HT, TAN NW, ZHOU HC, *et al.* Determination of four phenolic acids in *Amomum tsaoko* by HPLC [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(9): 3694–3699.
- [31] 翁芳华, 陈建业, 温鹏飞, 等. 蓝莓中 11 种酚酸的高效液相色谱测定[J]. 食品科学, 2006, 27(9): 223–226.
- WENG FH, CHEN JY, WEN PF, *et al.* Determination of 11 phenolic acids in blueberry by HPLC [J]. Food Sci, 2006, 27(9): 223–226.
- [32] 张今君, 夏慧丽, 方如意. 超高效液相色谱-串联质谱法测定红美人中 8 种酚酸化合物[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(9): 169–175.
- ZHANG JJ, XIA HL, FANG RY. Determination of 8 phenolic acids in red beauty by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2022, 43(9): 169–175.

(责任编辑: 于梦娇 安香玉)

作者简介



张芳芳, 工程师, 主要研究方向为食品检测与分析。
E-mail: 236484865@qq.com