

高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法解析桑椹酒渣中的酚类物质

韩雨澄^{1,2}, 刘学铭^{2*}, 杨春英², 杨春丽²

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西南昌 330045) (2. 广东省农业科学院, 蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 该研究通过研究桑椹酒渣中的酚类化合物, 为开发酒渣的价值提供一定的理论基础和数据支撑。建立云桑二号桑椹酒渣中的酚类化合物的高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法 (HPLC-Q-Time-of-Flight Mass Spectrometry, HPLC-Q-TOF-MS) 定性分析方法。液相色谱使用 ZORBAX SB-Aq (2.1 mm×100 mm, 1.8-Micron) 色谱柱, 流动相为乙腈和 0.1% (V/V) 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 采用 ESI 离子源在负离子模式进行质谱检测。最终鉴定出云桑二号桑椹酒渣中酚类物质共 14 种。然后利用标准品对照高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 对高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法鉴定出的多酚类化合物进行了定量测定, 发现桑椹酒渣中的酚类物质组成与桑椹大致相同。但各单体酚含量总体降低。其中, 花青素类酚类物质含量最高的是天竺葵素-3-葡萄糖苷 (718.30 μg/g), 非花青素类多酚物质含量最高的是儿茶素 (1 805.87 μg/g)。这些结果表明桑椹酒渣酚类含量丰富, 是开发健康食品的良好原料。

关键词: 桑椹酒渣; 酚类化合物; 高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法 (HPLC-Q-TOF-MS); ESI 离子源; 高效液相色谱 (HPLC)

文章编号: 1673-9078(2023)10-289-297

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1474

Determination of Phenolic Compounds in Mulberry Wine Pomace by HPLC-Q-time-of-flight Mass Spectrometry

HAN Yucheng^{1,2}, LIU Xueming^{2*}, YANG Chunying², YANG Chunli²

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

(2. Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: For the purpose of establishing a theoretical foundation and experimental support to improve the utilization of wine pomace, the phenolic compounds in mulberry wine pomace were analyzed by high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS). Ultimately, a technique for qualitatively analyzing the phenolic chemicals in the Yunsang No.2 mulberry wine pomace was developed. The ZORBAX SB-Aq (2.1 mm×100 mm, 1.8-Micron) chromatographic column was used in liquid chromatography, whereas an aqueous solution of acetonitrile and 0.1% (V/V) formic acid was used as the mobile phase for gradient elution. Furthermore, an ESI ion source was utilized for mass spectrometry detection in the negative ion mode. In total, 14 phenolic compounds were

引文格式:

韩雨澄, 刘学铭, 杨春英, 等. 高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法解析桑椹酒渣中的酚类物质[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10):289-297

HAN Yucheng, LIU Xueming, YANG Chunying, et al. Determination of phenolic compounds in mulberry wine pomace by HPLC-Q-time-of-flight mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 289-297

收稿日期: 2022-11-19

基金项目: 广州市对外科技合作计划项目 (201907010029)

作者简介: 韩雨澄 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性乳制品, E-mail: hanyucheng123@163.com

通讯作者: 刘学铭 (1967-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 动植物营养成分相互作用, 功能性肉制品和功能性乳制品, E-mail: liuxueming@gdaas.cn

detected in the Yunsang No.2 mulberry wine pomace. Additionally, standard samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as a control to quantitatively determine the polyphenols detected by HPLC-Q-TOF-MS. The composition of phenolic substances in mulberry wine pomace was found to be similar to that of mulberry fruits; however, the contents of each phenolic compound were lower in the former. Among the various types of anthocyanin phenols, pelargonium-3-glucoside exhibited the highest content (718.30 $\mu\text{g/g}$), meanwhile, catechin was the most abundant non-anthocyanin polyphenol (1 805.87 $\mu\text{g/g}$). These findings indicate that mulberry wine pomace has a high content of phenols and has the potential as a raw material for developing healthy food.

Key words: mulberry wine pomace; phenolic compounds; high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS); ESI ion source; high-performance liquid chromatography (HPLC)

桑椹, 又名桑果, 为桑科植物桑的成熟果穗, 属浆果类。桑椹含有丰富的糖类、有机酸、维生素、矿物质、微量元素等营养成分, 以及多糖和多酚等生物活性物质^[1], 具有抗氧化、抗炎、降血脂、神经保护等功效^[2-4], 在 2002 年被卫生部列入首批“既是食品, 又是药品”的物品名单^[5]。桑椹汁液丰富, 富含糖类、有机酸、花青素等成分, 非常适合发酵果酒的生产。桑椹酒味道醇香浓郁, 广受消费者的欢迎, 具有巨大的发展空间和市场潜力。在桑椹酒的发酵生产中会产生大量的酒渣。酒类生产是地球大部分地区的主要农业活动之一, 据国际葡萄和葡萄酒组织 2017 年数据, 全球 2016 年产葡萄酒 2.76 亿升, 表明产生了大量的酒渣。一般来讲, 酒类发酵后的酒渣多被当成废料直接丢弃, 容易造成环境污染等问题; 或作为饲料或肥料, 但总体利用率较低^[6]。事实上, 酒渣作为果酒生产中的固体副产物, 主要由果皮、果肉等组成, 富含膳食纤维、多糖类、酚类物质等成分, 具有较好的保健和药理作用, 是开发现代健康食品的良好原料。

目前生产加工中对葡萄酒渣的利用较多。红葡萄酒渣由葡萄皮和种子组成, 含酚类物质比例高, 其中葡萄皮富含花青素(如锦葵素和芍药素)、黄烷-3-醇(如儿茶素和原花青素)、黄酮醇(如槲皮素、杨梅素)、二苯乙烯和酚酸, 而葡萄籽含丰富的原花青素, 具有抗氧化、抗突变、保护心脏、预防白内障、抗高血糖、抗炎和抗癌功效^[6]。

由于桑椹产业是近年才发展起来的新产业, 因此对桑椹酒渣的研究相对较少。本文采用高效液相-时间飞行质谱法鉴定了其主要的酚类物质, 并用高效液相色谱法对它们的含量进行了测定, 为利用其开发高价值产品, 减少污染物排放和资源浪费, 提高产业效益提供基础数据和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

桑椹酒渣取自攀枝花某果酒公司, 桑椹品种为云桑二号, 为利用桑椹原浆发酵桑椹酒后得到的沉淀物, 即发酵酒泥。发酵酒泥从发酵罐底放出后经离心和冷冻干燥处理, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.1.2 主要试剂

乙腈、甲醇(均为质谱级), 美国 Fisher 公司; 甲酸(质谱级), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 磷酸(色谱级), 中国阿拉丁公司; 阿魏酸、儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇、原儿茶酸、隐绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、芦丁、槲皮素和对香豆酸(均为色谱级), 成都普瑞法科技开发有限公司; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-葡萄糖苷和矢车菊素-3-O-芸香糖苷(均为色谱级), 上海甄准生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

RE-5210A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; G7115A 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; Triple TOF 5600 Q-TOF 四级杆串联飞行时间质谱仪, 美国 AB-SCIEX 公司。

1.2 桑椹酒渣酚类物质的鉴定

1.2.1 样品处理

精确称取 1 g 桑椹酒渣, 加入体积分数 60% 酸性乙醇 (pH 值为 3.5), 料液比 1:25, 超声 25 min, 8 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 重复提取三次, 合并上清液。得到的上清液真空抽滤后, 在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行旋转蒸发浓缩去除乙醇, 用甲醇定容至 20 mL, 过 0.22 μm 有机滤膜, 得到桑椹酒渣多酚提取液^[7]。

1.2.2 酒渣酚类物质的高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱 (HPLC-Q-TOF-MS) 鉴定

色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX SB-Aq (2.1 mm \times 100 mm, 1.8-Micron); 流动相: A 相为 0.1% (V/V) 甲酸水, B 相为乙腈。线性梯度洗脱条件: 0~20 min, 5%~95% B; 20~23 min, 95%~95% B; 23~23.1 min, 95%~5% B; 23.1~28 min, 5% B。流速为 0.3 mL/min; 进样量 4 μL , 柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件: ESI 离子源, 负离子扫描模式, 使用

高纯度氮气做雾化气和辅助气, IDA 模式, 雾化电压: -4 500 V; 脱溶剂气温度为 600 °C; 雾化气: 50 psi; 脱溶剂气: 50 psi; 气帘气: 35 psi; 去簇电压: -80 V; 碰撞电压: -35 eV; 积累时间 45 ms, 扫描范围: 100~1 000 *m/z*。

1.2.3 高效液相色谱 (HPLC) 测定酒渣中的酚类物质

色谱条件: 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm)。测定黄酮类化合物流动相: A 为 0.4%(V/V) 乙酸水, B 为乙腈; 梯度洗脱: 0~6 min, 5%~7% B; 20~40 min, 12%~22% B; 50~60 min, 35%~60% B; 65~70 min, 100%~100% B; 75~80 min, 5% B。流速为 1 mL/min; 进样量为 20 μL; 柱温 25 °C; 检测波长 280 nm。测定花青素类化合物流动相: A 为 1.5% 磷酸, B 为磷酸: 乙酸: 乙腈: 水=1.5:20:25:53.5 (V/V/V/V); 梯度洗脱: 0~15 min, 5%~15% B; 15~21 min, 15%~28% B; 21~22 min, 28%~40% B; 22~30 min, 40%~60% B; 30~33 min, 60%~5% B; 33~36 min, 5% B; 流速为 1 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C, 检测波长 520 nm。

1.3 数据分析

数据统计和作图软件为 Origin 2021。每个样品平行测定三次, 结果表示为平均值±标准差。

2 结果与讨论

2.1 高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱 (HPLC-Q-TOF-MS) 鉴定酒渣酚类物质组成

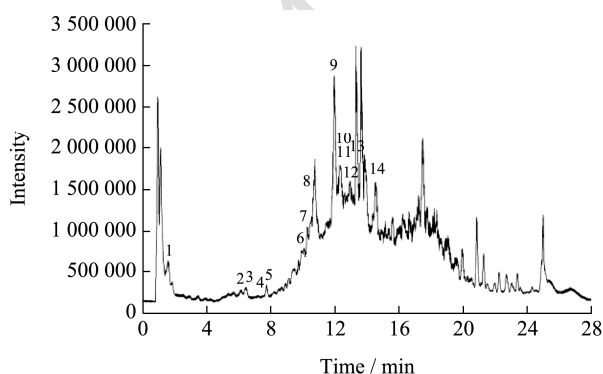


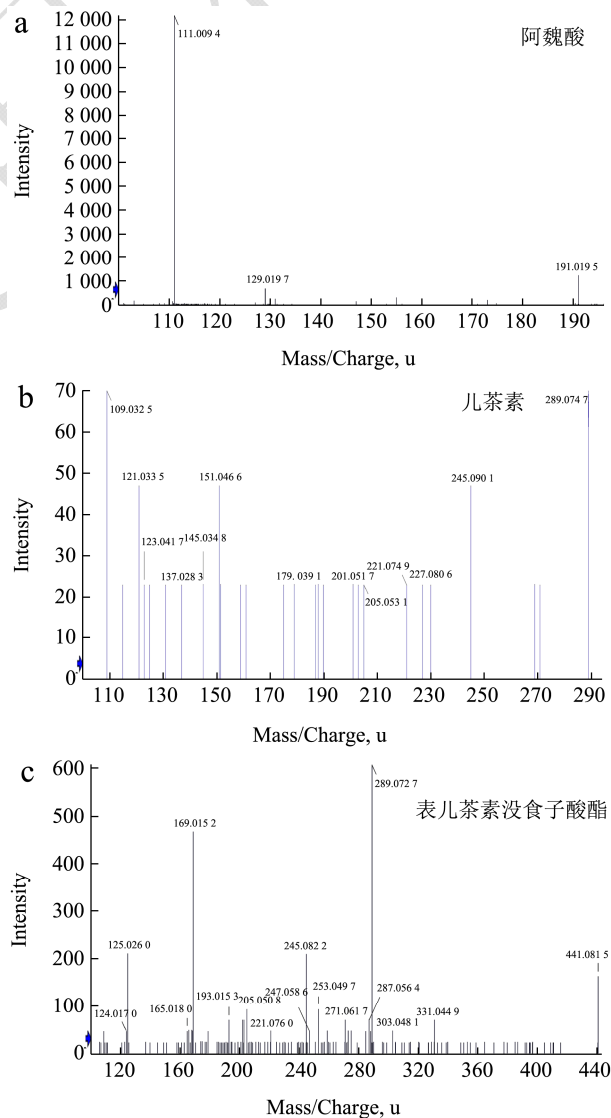
图 1 云桑二号桑椹酒渣的多酚提取液负离子模式下的总离子流图

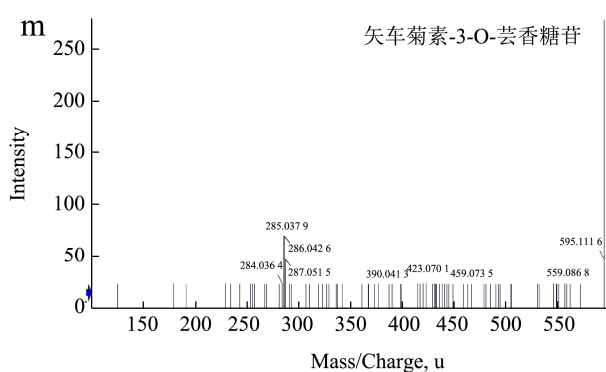
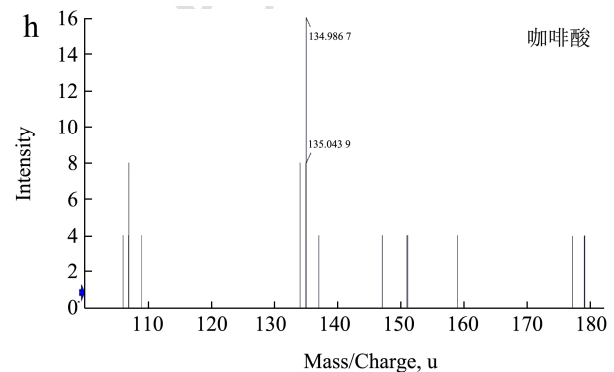
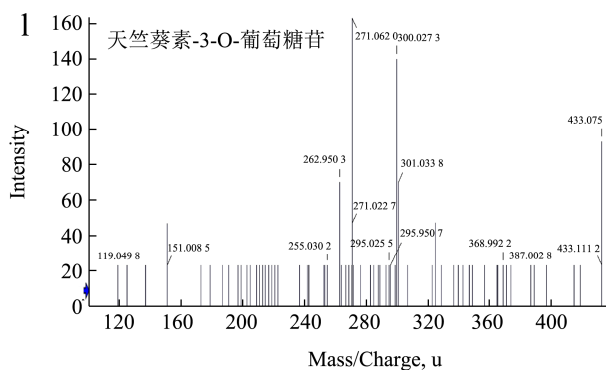
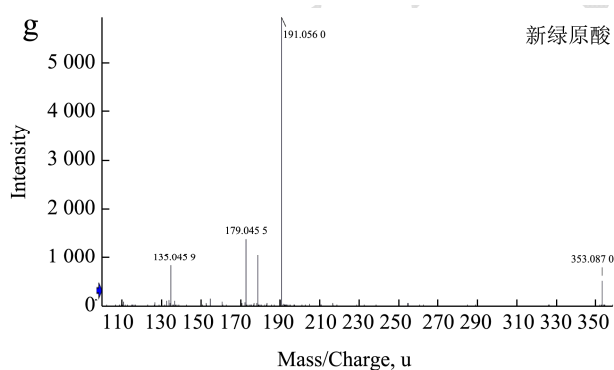
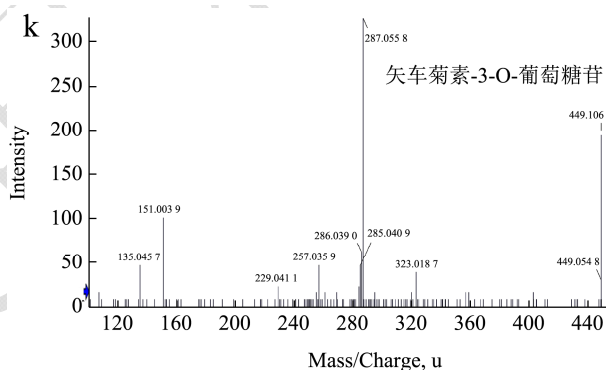
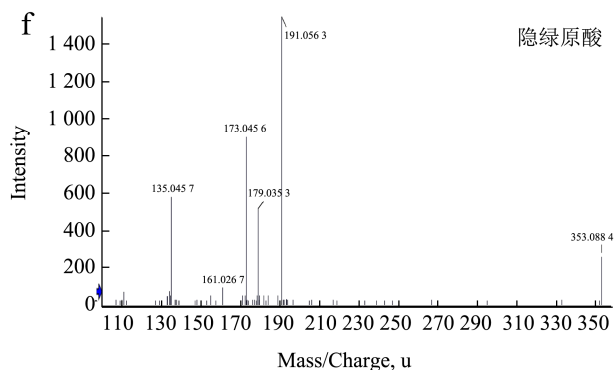
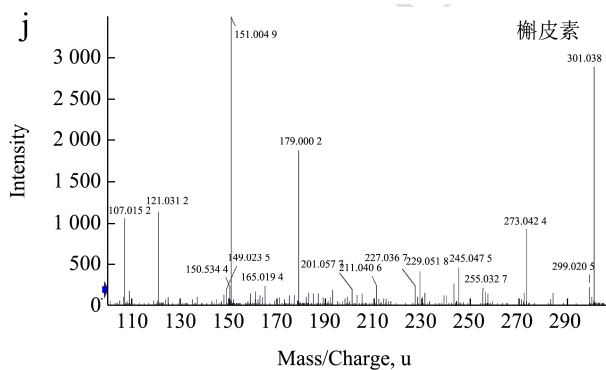
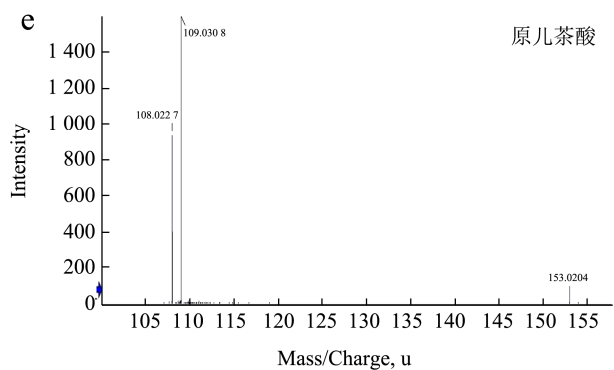
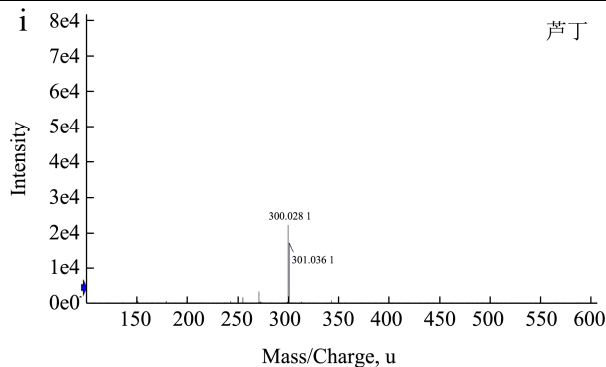
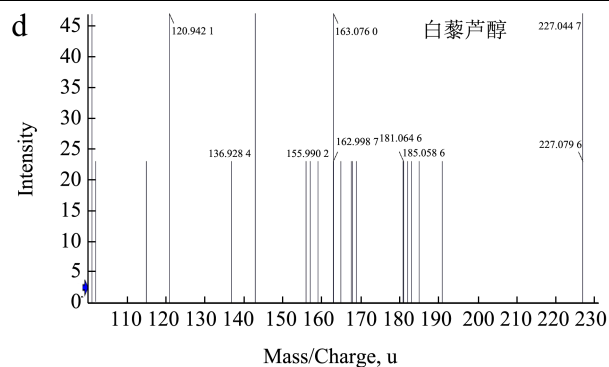
Fig.1 Total ion current diagram of polyphenol extract of mulberry wine pomace in negative ion mode

为较为全面地了解桑椹酒渣中酚类物质的组成, 采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法对桑椹酒

渣多酚提取液中的化合物进行定性分析。高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱技术能够对微量的化学成分快速地进行分离, 以及定性和定量的检测, 且灵敏度高^[8]。桑椹酒渣多酚提取液经高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱分析后的总离子流图 (负离子模式) 见图 1, 得到的各酚类化合物的二级质谱图见图 2。

出峰时间为 1.045 min, 对应的二级质谱图见图 2a, 其母离子[M-H]⁻为 *m/z* 193.050 6, 对应的化合物最佳分子式为 C₁₀H₁₀O₄。根据得到的质谱图可知, 在负离子模式下该化合物打出一个 *m/z* 134.039 1 的碎片离子和一个 *m/z* 178.0295 的碎片离子。Xiong 等^[9]研究发现阿魏酸在质谱负离子模式下, 打出来一个碎片离子, 碎片离子 *m/z* 178.031 9 是母离子[M-H]⁻为 *m/z* 193.050 6 丢失一个甲基 (-CH₃) 得到的。有文献报道^[10]的化合物阿魏酸在质谱负离子模式下打出了一个 *m/z* 134.037 7 的碎片离子和一个 *m/z* 178.026 5 的碎片离子, 结合数据库的信息, 确定该化合物为阿魏酸。





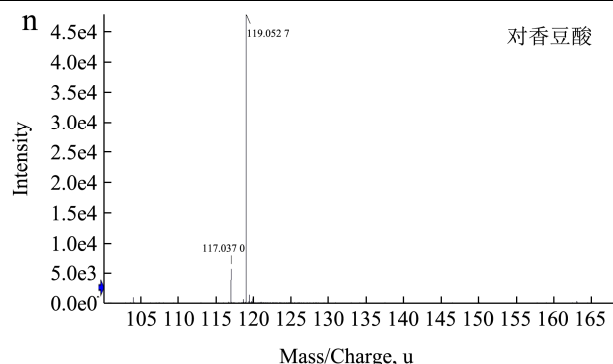


图2 桑椹酒渣中14种酚类物质的二级质谱图

Fig.2 MS² spectrum of fourteen phenolic compounds from mulberry wine pomace

出峰时间为 6.210 min, 对应的二级质谱图见图 2b, 其母离子[M-H]⁻为 m/z 289.071 7, 对应的化合物最佳分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$ 。根据得到的质谱图可知, 在负离子模式下该化合物打出一个 m/z 109.032 5 的碎片离子。郭亚卿等^[11]研究儿茶素在负离子模式下, 母离子[M-H]⁻为 m/z 289.1 打出了一个 m/z 109 的碎片离子。结合数据库信息, 可确定该化合物为儿茶素。

出峰时间为 6.367 min, 对应的二级质谱图见图 2c, 其母离子[M-H]⁻为 m/z 441.082 7, 对应的最佳分子式应为 $C_{22}H_{18}O_{11}$, 由质谱图看出该化合物产生了一个 m/z 289.072 7 的离子碎片和一个 m/z 169.015 2 的离子碎片, 有学者^[9]在研究热泵干燥和超细研磨对荔枝汁副产物结合酚类成分的影响时, 在负离子模式下, 表儿茶素没食子酸酯的母离子[M-H]⁻为 m/z 441.083 1, 并打出了两个碎片离子, 一个为 m/z 289.071 1, 另一个为 m/z 169.014 1 离子碎片。结合数据库信息, 鉴定该化合物为表儿茶素没食子酸酯。

出峰时间为 7.422 min, 对应的二级质谱图见图 2d。其母离子[M-H]⁻为 m/z 227.071 3, 对应的最佳化合物分子式为 $C_{14}H_{12}O_3$ 。根据得到的质谱图可知, 在质谱负离子模式下该化合物打出一个 m/z 185.058 6 的碎片离子。根据文献^[12]报道的白藜芦醇, 在质谱负离子模式下该化合物的母离子[M-H]⁻为 m/z 227 并打出了一个 m/z 185 的碎片离子, 再结合数据库比对以后, 可确定该化合物为白藜芦醇。

根据得到的质谱信息, 出峰时间为 7.737 min, 对应的二级质谱图见图 2e, 其母离子[M-H]⁻为 m/z 153.019 3, 对应的最佳分子式应为 $C_7H_6O_4$, 通过质谱图发现该化合物产生了一个 m/z 109.030 8 的离子碎片。根据已有的文献^[10]以及数据库的比对, 确定该化合物为原儿茶酸, 产生的 m/z 109.030 8 的离子碎片应为母离子[M-H]⁻ m/z 153.019 3 丢失了-COOH 上的一个-CO₂ 基团而产生的。

出峰时间为 10.214 min, 对应的二级质谱图见图 2f, 其母离子[M-H]⁻为 m/z 353.087 8, 对应的最佳分子式应为 $C_{16}H_{18}O_9$ 。由得到的质谱图可知, 该化合物产生了 m/z 173.045 6、 m/z 179.035 3 和 m/z 191.056 3 的碎片离子, 根据已报道的文献^[8]以及数据库的比对, 该化合物应为隐绿原酸。产生的 m/z 173.045 6 碎片离子是奎宁酸在负离子模式下失去了一个质量数为 18 的水和一个质量数为 1 的氢得到的离子碎片。碎片离子 m/z 179.035 3 是咖啡酸在负离子模式条件下丢掉了质量数为 1 的氢离子碎片而得。碎片离子 m/z 191.056 3 是在奎宁酸失去一个质量数为 1 的氢离子碎片得到的。这三个子离子碎片与文献中^[8]报道的一致, 故鉴定该物质为隐绿原酸。

出峰时间为 10.259 min, 对应的二级质谱图见图 2g, 其母离子[M-H]⁻为 m/z 353.103 0, 对应的最佳分子式应为 $C_{16}H_{18}O_9$ 。由质谱图可知, 该化合物在负离子模式下产生了一个 m/z 191.056 0 的离子碎片和一个 m/z 135.045 9 的离子碎片, 根据已有文献^[13]并结合数据库信息, 该化合物应为新绿原酸。产生的碎片离子 m/z 191.056 0 是由奎宁酸在负离子模式下失去一个质量数为 1 的氢离子碎片而得, 另一个碎片离子 m/z 135.045 9, 是咖啡酸在负离子模式下丢失一个中性碎片 CO₂ 得到的。汪丹等^[13]研究金钱草颗粒中的化学成分时, 发现新绿原酸在负离子模式下打出 m/z 191 和 m/z 135 的碎片离子, 故可确定该化合物为新绿原酸。

出峰时间为 10.551 min, 对应的二级质谱图见图 2h, 其母离子[M-H]⁻为 m/z 179.034 9, 对应的化合物最佳分子式应为 $C_9H_8O_4$ 。由得到的质谱图可知, 该化合物在负离子模式下产生了一个碎片离子 m/z 135.043 9, 根据已有文献^[14]和数据库的对比, 该化合物应为咖啡酸。产生的离子碎片 m/z 135.043 9 由咖啡酸在负离子模式下丢失一个中性碎片 CO₂ 得到的。结合在文献^[14]所报道的咖啡酸打出离子碎片为 m/z 135.043 8, 将其鉴定为咖啡酸。

出峰时间为 11.974 min, 对应的二级质谱图见图 2i, 其母离子[M-H]⁻为 m/z 609.146 1, 对应的化合物最佳分子式应为 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 。由质谱图可知, 该化合物在负离子模式下产生了一个 m/z 301.036 1 的碎片离子, 根据已有文献^[15-17]和数据库的对比, 鉴定该化合物为芦丁。该化合物产生的 m/z 301.036 1 离子碎片是由于由 m/z 308 损失引起的脱糖基化, 丢失了一个质量数为 308 的中性碎片而产生的, 这与芦丁的报道结果一致^[15-17]。

出峰时间为 12.314 min, 对应的二级质谱图见图 2j, 其母离子[M-H]⁻为 m/z 301.038 1, 对应的化合

物最佳分子式应为 $C_{15}H_{10}O_7$ 。由得到的质谱图可知,在负离子模式下该化合物产生了一个 m/z 179.000 2 的碎片离子和一个 m/z 151.004 9 的碎片离子,根据已有文献^[7]和数据库对比,鉴定该化合物为槲皮素。该化合物产生的离子碎片 m/z 179.000 2 由于母离子[M-H]为 m/z 301.038 1 经过断裂且转移 2 个 H 生成的。碎片离子 m/z 151.004 9 为 m/z 301 离子发生逆狄尔斯-阿尔德反应 (RAD) 反应产生的。

出峰时间为 12.434 min, 对应的二级质谱图见图 2k, 其母离子[M-H]为 m/z 449.108 9, 对应的化合物最佳分子式应为 $C_{21}H_{21}O_{11}$ 。由得到的质谱图可知,在负离子模式下该化合物产生了一个 m/z 287.055 8 的碎片离子。根据已有文献^[18]和数据库进行比对,鉴定该化合物为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷。产生的 m/z 287.055 8 的离子碎片是通过母离子[M-H]为 m/z 449.108 9 在负离子模式下丢失一个葡萄糖基形成的碎片离子,与文章^[18]得出的结论一致。

出峰时间为 12.600 min, 对应的二级质谱图见图 2l, 其母离子[M-H]为 m/z 433.044 9, 对应的化合物最佳分子式应为 $C_{21}H_{21}O_{10}$ 。由得到的质谱图可知,在负离子模式下该化合物产生了一个 m/z 271.062 0 的

碎片离子。根据已报道的文献^[19]和数据库进行比对,判断该化合物为天竺葵素-3-O-葡萄糖苷。在负离子模式下,该化合物产生的 m/z 271.062 0 碎片离子是由母离子[M-H] 433.044 9 丢失一个己糖基单元所得,和文献中结论一致^[19]。

出峰时间为 12.768 min, 对应的二级质谱图见图 2m, 其母离子[M-H]为 m/z 595.166 8, 对应的化合物最佳分子式应为 $C_{27}H_{31}O_{15}$ 。由得到的质谱图可知,在负离子模式下该化合物产生了一个 m/z 287.051 5 的离子碎片。根据文献报道和数据库对比可判断该化合物应为矢车菊素-3-O-芸香糖苷^[18]。在负离子模式下,该化合物产生的碎片离子是由母离子[M-H]为 m/z 595.166 8 在负离子模式下失去一分子的葡萄糖基形成的。

出峰时间为 14.552 min, 对应的二级质谱图见图 2n, 其母离子[M-H]为 m/z 163.040 0, 对应的化合物最佳分子式应为 $C_9H_8O_3$ 。由得到的质谱图可知,在负离子模式下该化合物打出了一个 m/z 119.052 7 的离子碎片。有研究茶叶籽中的酚类化合物时,在负离子模式下打出的对香豆酸的特征例子为 m/z 119.050 4, 鉴于此,结合数据库对比后鉴定该化合物为对香豆酸^[10]。

表 1 利用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法鉴定桑椹酒渣多酚化合物的质谱数据

Table 1 Identification of polyphenolic compounds in mulberry wine pomace by HPLC-Q-TOF-MS

峰号	保留时间/min	标准保留时间/min	分子式	分子量	母离子 (m/z)	特征离子 (m/z)	标准特征离子 (m/z)	偏差/(mg/kg)	化合物
1	1.045	1.032	$C_{10}H_{10}O_4$	194.057 9	193.050 6	134.039 1; 178.029 5	134.038 5 178.060 1	11.90	Ferulic acid
2	6.210	6.118	$C_{15}H_{14}O_6$	290.079 0	289.071 7	109.032 5	109.031 1	2.90	Catechin
3	6.367	6.305	$C_{22}H_{18}O_{11}$	442.090 0	441.082 7	169.015 2; 289.072 7	169.018 3; 289.072 9	0.02	Epicatechingallate
4	7.422	7.381	$C_{14}H_{12}O_3$	228.078 6	227.071 3	185.058 6	185.066 9	8.70	Resveratrol
5	7.737	7.707	$C_7H_6O_4$	154.026 6	153.019 3	109.030 8	109.030 4	0.02	Protocatechuic acid
6	10.214	10.205	$C_{16}H_{18}O_9$	354.095 0	353.087 8	173.045 6; 179.035 3; 191.056 3	173.044 7; 179.038 2; 191.056 6	0.02	Cryptochlorogenic acid
7	10.259	10.252	$C_{16}H_{18}O_9$	354.110 3	353.103 0	135.045 9; 191.056 0	135.042 9; 191.061 8	0.02	Neochlorogenic acid
8	10.551	10.497	$C_9H_8O_4$	180.042 25	179.034 9	135.043 9	135.049 8	0.02	Caffeic acid
9	11.974	11.949	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.153 3	609.146 1	301.036 1	301.037 7	4.00	Rutin
10	12.314	12.311	$C_{15}H_{10}O_7$	302.042 26	301.038 1	151.004 9; 179.000 2	151.005 8; 179.001 3	0.02	Quercetin
11	12.434	12.447	$C_{21}H_{21}O_{11}$	450.116 2	449.108 9	287.055 8	287.060 9	0.60	Cyanidin-3-O-glucoside
12	12.600	12.688	$C_{21}H_{21}O_{10}$	434.052 2	433.044 9	271.062 0	271.050 9	12.60	Pelargonium-3-O-glucoside
13	12.768	12.753	$C_{27}H_{31}O_{15}$	596.174 1	595.166 8	287.051 5	286.040 5	-6.90	Cyanidin-3-O-rutinoside
14	14.552	14.554	$C_9H_8O_3$	164.047 3	163.040 0	119.052 7	119.052 7	0.02	<i>p</i> -Coumaric acid

采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法从桑椹酒渣中鉴定出 14 种单体酚类, 以酚酸、黄酮、花色苷为主。其中花青素类有 3 种, 分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷和天竺葵素-3-葡萄糖苷; 酚酸类有 6 种, 分别是阿魏酸、原儿茶酸、隐绿原酸、新绿原酸、咖啡酸和对香豆酸; 黄酮类有 5 种, 分别是儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇、芦丁和槲皮素。

花青素是桑椹最典型的酚类物质, 以矢车菊素-3-葡萄糖苷计算其在现桑椹中的含量可达 2 000 mg/kg 以上^[20]。桑椹中的主要单体花青素是矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-芸香糖苷, 通常也能被检测到少量天竺葵素-3-葡萄糖苷, 韩国学者采用液质联用技术从桑椹中检测到 16 种单体花青素^[21]。有研究发现, 在桑椹汁发酵过程中, 微生物可以降解花青素, 尤其是结构简单的矢车菊素-3-葡萄糖苷。本研究从桑椹酒渣中鉴定出 3 种单体花青素, 而有研究^[22]从桑椹酒渣提取物中只鉴定出 2 种主要的单体花青素。主要原因可能是一些本就含量很低的单体花青素在发酵和后期处理过程中被降解或被转化了。

除花青素类酚类物质外, 桑椹中还含有大量的非花青素酚类物质。早在 2006 年, 日本学者就发现桑椹中有较高含量的绿原酸及其同系物(咖啡酰奎尼酸类物质), 并随成熟度的上升而不断下降^[23]。新加坡学者与本课题组合作从广东桑椹中鉴定出绿原酸(3-咖啡酰奎尼酸)、新绿原酸(5-咖啡酰奎尼酸)、隐绿原酸(4-咖啡酰奎尼酸)、芦丁、堪菲醇-3-芸香糖苷和槲皮苷^[24]。我国台湾学者从桑椹水提取物中检测出 15 种非花青素酚类物质, 分别是没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、表没食子酸儿茶素没食子酸酯、咖啡酸、对香豆酸、芦丁、阿魏酸、棉花皮苷、橙皮素、白藜芦醇、槲皮苷、柚皮素和羟基黄素^[25]。从塞尔维亚桑椹中还检测到没食子酸儿茶素、表没食子酸儿茶素、七叶树苷、对羟基苯甲酸、没食子酸儿茶素没食子酸酯、咖啡酸、鞣花酸和龙胆酸^[26]。我国学者从桑椹中还检测到 1,3-二咖啡酰奎尼酸、云杉苷、槲皮素-3-葡萄糖苷、槲皮素-3-芸香糖苷、槲皮素-3-半乳糖苷、紫杉素、白皮杉素、堪菲醇-3-葡萄糖苷、木犀草素、鼠李素、异鼠李素和堪菲素^[20]。由此可看出, 桑椹中非花青素酚类物质种类较多, 从发酵后的酒渣中仍检测到它们中的绝大多数。但比较出乎意料的是酒渣中没有检测到绿原酸, 其中缘由值得进一步研究。

2.2 标准品验证

为进一步验证, 将已初步鉴定的化合物与标准品进行保留时间和二级质谱图比对, 在相同的质谱条件下, 经过精确的质量数提取, 得到各标准化合物保留时间、精确质量和二级质谱图, 将初步鉴定的桑椹酒渣酚类化合物与标准品的保留时间和二级碎片离子进行比较(见表 1), 所有化合物与对应标准品的保留时间差异均在 ± 0.1 min 以内。同时, 酒渣中采集到的主要二级离子碎片与标准品中的碎片离子的 m/z 十分接近。以原儿茶酸和芦丁为例, 见图 3, 桑椹酒渣实际样品二级质谱图主要特征离子 m/z 与标准品的主要特征离子吻合的很好。

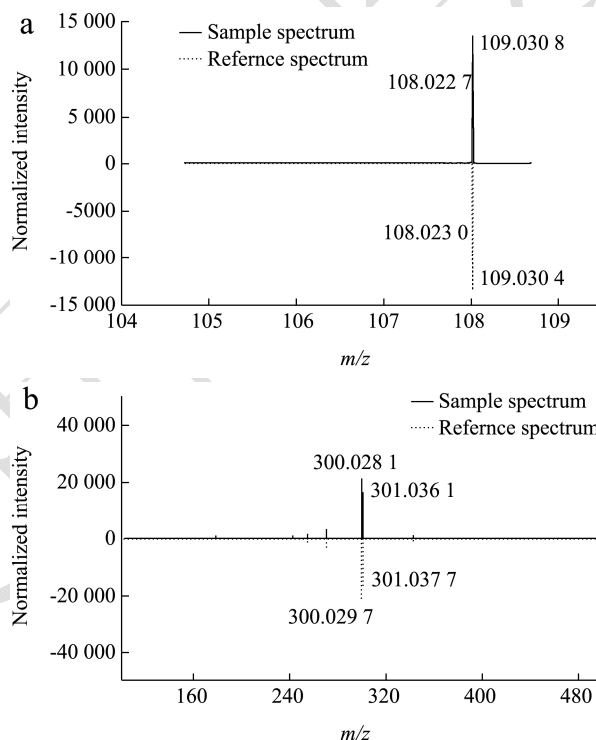


图3 原儿茶酸和芦丁在桑椹酒渣多酚提取液及标准品中的质谱图对比

Fig.3 Comparison of mass spectra of protocatechuic acid and rutin in mulberry wine residue polyphenol extract and standard

注: a: 原儿茶酸; b: 芦丁。

2.3 利用高效液相色谱法(HPLC)对酒渣中酚类物质含量的测定

前面利用 HPLC-Q-TOF-MS 从桑椹酒渣中鉴定出 14 种酚类物质。从高效液相色谱法看出, 桑椹酒渣多酚提取液含量较高的主要酚类物质有 11 种, 结果如图 4 所示。采用标准品对照法对这 11 种含量较高的酚类物质进行了定量分析, 结果如表 2 所示。

从表 2 中可以看出, 酒渣中花青素类酚类物质含量最高的是天竺葵素-3-葡萄糖苷 (718.30 μg/g), 其次为矢车菊素-3-葡萄糖苷 (474.62 μg/g), 再次是矢车菊素-3-葡萄糖苷 (377.64 μg/g), 非花青素类多酚物质含量最高的是儿茶素 (1 805.87 μg/g), 其次为芦丁 (788.45 μg/g)、槲皮素 (554.18 μg/g) 和咖啡酸 (34.58 μg/g)。陈亮等^[27]研究发现桑椹主要含有三种花色苷, 分别为矢车菊素-3-葡萄糖苷 (1 037.47 μg/g), 矢车菊素-3-芸香糖苷 (482.71 μg/g) 和天竺葵素-3-葡萄糖苷 (16.35 μg/g)。李妍等^[28]在研究不同果桑品种桑椹成熟过程中非花青素酚类物质的含量变化时, 发现桑椹中多酚含量最高的是儿茶素 7 570~927.7 μg/g, 其次为芦丁 3 621.3~708.3 μg/g, 槲皮素含量在 702.6~186 μg/g, 咖啡酸的含量在 156.5~40.2 μg/g。桑椹酒发酵会影响酚类物质的含量, 大部分呈现降低趋势。刘学铭等^[29]在研究桑椹汁乙醇发酵过程中主要成分和功能成分的动态变化时发现单聚花青素总的变化趋势是随着发酵的进行而不断下降, 矢车菊素-3-葡萄糖苷下降速度比矢车菊素-3-芸香糖苷快, 发酵结束后后者含量比前者要高, Wang 等^[30]发现了类似的现象。而本研究在酒渣中没有发现相似情况, 可能是攀枝花的桑椹花青素含量很高, 显著超过了酵母的转化能力, 导致其单体花青素含量顺序不发生改变。还有一种可能是一些细微的果渣发酵后从果浆中沉淀下来, 将其中的花青素等酚类物质一起沉淀下来, 而酵母对果渣中的花青素影响较小。

表 2 桑椹酒渣多酚类成分的定量分析结果

Table 2 Quantitative results of phenolic components of mulberry wine pomace

化合物	保留时间/min	标准曲线	相关系数	含量/(μg/g)
原儿茶酸	10.374	$y=32\ 372x-92.92$	$R^2=0.994\ 5$	278.06±6.08
新绿原酸	11.906	$y=27\ 331x-29.605$	$R^2=0.996\ 6$	111.59±5.49
儿茶素	18.061	$y=7\ 978x-12.233$	$R^2=0.999\ 1$	1 805.87±13.91
隐绿原酸	19.819	$y=15\ 838x-98.564$	$R^2=0.993\ 4$	538.48±8.29
咖啡酸	24.775	$y=57\ 302x+40.771$	$R^2=0.998\ 9$	34.58±1.88
芦丁	35.609	$y=15\ 480x-42.816$	$R^2=0.994\ 6$	788.45±6.67
表儿茶素没食子酸酯	37.249	$y=22\ 854x+59.391$	$R^2=0.996\ 2$	88.97±5.28
槲皮素	51.255	$y=11\ 901x-6.63$	$R^2=0.997\ 2$	554.18±17.25
矢车菊素-3-葡萄糖苷	25.643	$y=17\ 650x-140.24$	$R^2=0.999\ 2$	474.62±14.99
矢车菊素-3-芸香糖苷	25.986	$y=12\ 484x-106.38$	$R^2=0.998\ 3$	377.64±10.63
天竺葵素-3-葡萄糖苷	26.269	$y=9\ 003.8x+36.445$	$R^2=0.998\ 3$	718.30±13.95

3 结论

本实验利用高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法对桑椹酒渣中的酚类物质进行色谱分离以及结构鉴定。在负离子模式下, 根据各个色谱峰的质谱信息、自建的酚类化合物数据库以及有关的参考文献,

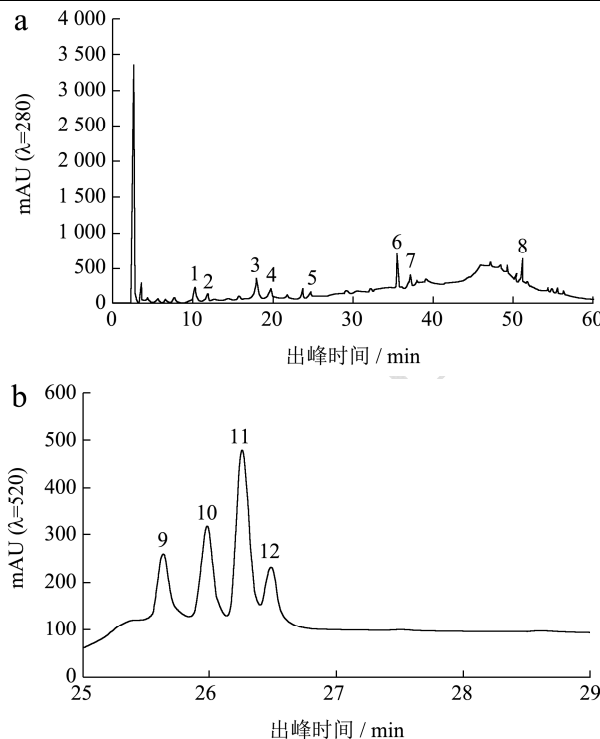


图 4 桑椹酒渣多酚提取液 HPLC 分析色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of mulberry wine pomace polyphenol extract

注: 1.原儿茶酸; 2.新绿原酸; 3.儿茶素; 4.隐绿原酸; 5.咖啡酸; 6.芦丁; 7.表儿茶素没食子酸酯; 8.槲皮素; 9.矢车菊素-3-葡萄糖苷; 10.矢车菊素-3-芸香糖苷; 11.未知化合物; 12.天竺葵素-3-葡萄糖苷。

成功鉴定出 14 种酚类物质。再结合高效液相色谱法定量测定桑椹酒渣中酚类化合物, 含量较高的花青素类酚类物质有天竺葵素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷, 含量较高的非花青素类酚类物质有儿茶素、芦丁、槲皮素等。这些结果表明桑椹酒渣是开发健康食品的良好原料。

参考文献

- [1] 汪荷澄.新疆三种桑葚理化品质及挥发性成分分析[D].新疆:塔里木大学生,2020.
- [2] 赵红宇,陈敦洪,邓良,等.桑葚果酒全渣发酵过程中生物活性物质及其抗氧化活性变化的研究[J].食品工业科技,2015,36(23):182-185.
- [3] Peng W, Tenggen H, Linhardt R J, et al. Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83: 138-158.
- [4] Dan L, Shuai M, Zhonghuai X, et al. Antimicrobial mechanism of reaction products of *Morusnotabilis* (mulberry) polyphenol oxidases and chlorogenic acid [J]. Phytochemistry, 2019, 163: 1-10.
- [5] 陈成花,张婧,刘炳杰,等.蓝莓果渣营养成分分析及评估[J].食品与发酵工业,2016,42(9):223-227.
- [6] Christina D, Konstantina K, Andreas B, et al. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts [J]. Industrial Crops & Products, 2015, 75: 141-149.
- [7] 李巨秀,王柏玉.福林—酚比色法测定桑椹中总多酚[J].食品科学,2009,30(18):292-295.
- [8] 李辰辰,陆小腾,童华荣.HPLC-Q-TOF-MS-MS 测定桑椹中多酚类物质[J].食品科学,2015,36(2):101-104.
- [9] Xiong X, Xuejiao C, Qingzhu Z, et al. Effects of heat pump drying and superfine grinding on the composition of bound phenolics, morphology and microstructure of lychee juice by-products [J]. LWT, 2021, 144: 111206.
- [10] 赖国银,王俐娟,卢鹤,等.超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱定性研究茶叶籽中的酚类化合物[J].色谱,2017,35(5):502-508.
- [11] 郭亚卿,王晓明,潘桂湘,等.LC-MS/MS 法同时测定养血清脑颗粒中 14 种成分[J].中成药,2017,39(8):1616-1620.
- [12] Sunsong R, Du T, Etim I, et al. Development of a novel UPLC-MS/MS method for the simultaneously quantification of polydatin and resveratrol in plasma: Application to a pharmacokinetic study in rats [J]. Journal of Chromatography B, 2021, 1185: 123000.
- [13] 汪丹,蔡甜,吴志军,等.HPLC-ESI-Q-TOF-MS 法分析金钱草颗粒的化学成分[J].中国药房,2016,27(12):1651-1654.
- [14] 马悦,赵乐凤,吕子燕,等.高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱分析桑葚中黄酮类和多酚类物质[J].质谱学报,2017,38(1):45-51.
- [15] Lv Q, Si M, Yan Y, et al. Effects of phenolic-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 621-629.
- [16] 史贺,张巧月,杨浩天,等.HPLC-MS/MS 法同时测定健胃消食片中 8 种化学成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(9):1606-1611.
- [17] 支旭然,苑霖,生宁,等.HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分[J].中草药,2013,44(22):3231-3235.
- [18] Avula B, Katragunta K, Wang Y, et al. Chemical profiling and UHPLC-QToF analysis for the simultaneous determination of anthocyanins and flavonoids in *Sambucus* berries and authentication and detection of adulteration in elderberry dietary supplements using UHPLC-PDA-MS [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 110: 104584.
- [19] Mikulic P M, Schmitzer V, Slatnar A, et al. Investigation of anthocyanin profile of four elderberry species and interspecific hybrids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(24): 5573-5580.
- [20] Jin Q, Yang J, Ma L, et al. Comparison of polyphenol profile and inhibitory activities against oxidation and α -glucosidase in mulberry (genus *Morus*) cultivars from China [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(11): C2440-C2451.
- [21] Kim I, Lee J. Variations in anthocyanin profiles and antioxidant activity of 12 genotypes of mulberry (*Morus* spp.) fruits and their changes during processing [J]. Antioxidants, 2020, 9(3): 242.
- [22] Zhang L X, Fan G J, Khan M A, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues [J]. Food Chemistry, 2020, 323: 126714.
- [23] Oki T, Kobayashi M, Nakamura T, et al. Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation [J]. Journal of Food Science, 2006, 71(1): C18-22.
- [24] Isabelle M, Lee B L, Ong C N, et al. Peroxyl radical scavenging capacity, polyphenolics, and lipophilic antioxidant profiles of mulberry fruits cultivated in southern China [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(20): 9410-9416.
- [25] Ou T T, Kuo C Y, Chyau C C, et al. Improvement of lipopolysaccharide-induced hepatic injuries and inflammation with mulberry extracts [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(8): 1880-1886.
- [26] Natić M M, Dabić D Č, Papeti A, et al. Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia [J]. Food Chemistry, 2015, 171: 128-136.
- [27] 陈亮,辛秀兰,袁其朋.野生桑葚中花色苷成分分析[J].食品工业科技,2012,33(15):307-310.
- [28] 李妍,刘学铭,刘吉平,等.不同果桑品种桑椹成熟过程中非花青素酚类物质的含量变化[J].蚕业科学,2008,34(4):711-717.
- [29] 刘学铭,吴继军,廖森泰,等.桑椹汁乙醇发酵过程中主要成分和功能成分动态变化[J].食品与发酵工业,2006,32(12):138-141.
- [30] WANG Lihua, SUN Xiangyu, LI Fan, et al. Dynamic changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity of mulberry wine during alcoholic fermentation [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 254-265.